20/0266/49

PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES BY PLANT TISSUE CULTURES AND BIOLOGICAL TECHNOLOGY

*Supawan Bunrathep**

Abstract

In general secondary metabolites, which almost are biological active compounds, are produced by intact plants by taking long time for years. Plant tissue cultures along with biological technology techniques have been chosen to be the new source for theirs production. The use of these techniques are better than that producing by intact plants because they could produce secondary metabolites in shorter time and some techniques also have been succeeded to produce higher yield than that of intact plants. The example of these techniques which has been used in plant tissues are cell immobilization, morphological modification, biotransformation of precursors, elicitation, permeabilisation, and two-phase system. In addition, genetic engineering techniques might be used with these techniques in order to produce selected secondary metabolites in large scale.

Key words: secondary metabolites, plant tissue cultures, biological technology

*To whom correspondence should be address. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Rangsit University, Patumthani 12000 Tel: 0 2997 2222 ext. 1422 Fax: 0 2997 2222 ext. 1403, E-mail: supawan@rangsit.rsu.ac.th

การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และเทคโนโลยีชีวภาพ

*ศุภวรรณ บุญระเทพ**

บทคัดย่อ

โดยทั่วไปแล้ว สารทุติยภูมิซึ่งเป็นสารที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถถูกสร้างขึ้นโดยพืชได้เองตามธรรมชาติโดยต้องอาศัยเวลานานนับเป็นปี ดังนั้นจึงมีการเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้เทคโนโลยีชีวภาพมาใช้เพื่อเป็นแหล่งใหม่ในการผลิตสารทุติยภูมิ วิธีการเหล่านี้มีข้อดีเหนือกว่าวิธีทางธรรมชาติที่สามารถผลิตสารทุติยภูมิที่ต้องการได้ในระยะเวลาสั้น และบางวิธียังสามารถเพิ่มผลผลิตให้ได้มากกว่าตามธรรมชาติอีกด้วย ตัวอย่างของวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ถูกนำมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต่าง ๆ ได้แก่ การตรึงเซลล์ การพัฒนาให้เป็นอวัยวะที่เหมาะแก่การสร้างหรือสะสมสารทุติยภูมิ การเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์และการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ การเติมสารซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้น การรบกวนสภาพการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวคิวโอเพื่อให้มีการปลดปล่อยสารทุติยภูมิออกมา รวมทั้งสร้างแหล่งสะสมเทียมในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อให้เป็นที่สะสมสารทุติยภูมิที่อาจเป็นพิษต่อเซลล์ ในทำนองเดียวกัน เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมอาจนำมาใช้ร่วมกับเทคนิคเหล่านี้ เพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่ต้องการในปริมาณมากขึ้นได้

คำสำคัญ: สารทุติยภูมิ, การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช, เทคโนโลยีชีวภาพ

*ติดต่อได้ที่ ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี 12000 โทรศัพท์ 0 2997 2222 ต่อ 1422 โทรสาร 0 2997 2222 ต่อ 1403, supawan@rangsit.rsu.ac.th

สารทุติยภูมิ (secondary metabolites)

หมายถึง สารเคมีที่พืชสร้างขึ้นตามธรรมชาติโดยไม่ได้มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช แต่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต การกระจายตัวของสารเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามวงศ์พืชซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัว ในธรรมชาติสารทุติยภูมิทำหน้าที่ปกป้องพืชจากการทำลายของศัตรู เช่น แมลง หรือสัตว์ต่าง ๆ ส่วนใหญ่แล้วเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงถูกแยกสกัดออกมาจากส่วนต่าง ๆ ของพืช เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะทางเภสัชกรรมต่อไป

การสร้างและสะสมสารทุติยภูมิในต้นไม้แต่ละชนิด ส่วนใหญ่แล้วจะต้องใช้เวลานานนับปี และสารที่สกัดได้มานั้นมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาตั้งแต่เพาะปลูกและจำนวนต้นไม้ที่ถูกโค่นลง ดังนั้นเพื่อที่จะลดการทำลายต้นไม้ในธรรมชาติ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์หลายท่านจึงมีแนวคิดที่จะหาแหล่งผลิตรวมถึงวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพใหม่ ๆ เพื่อผลิตสารทุติยภูมิเหล่านั้นให้มีปริมาณมากกว่าที่ได้จากต้นไม้ในธรรมชาติ วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อให้ผลิตสารทุติยภูมิจึงเป็นแนวคิดที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากเซลล์พืชมีลักษณะที่เป็นหน่วยรวม (totipotency) จึงหมายความว่าในแต่ละเซลล์ของพืชนั้น มีข้อมูลทางพันธุกรรมครอบคลุมทั้งหมด และสามารถควบคุมหน้าที่ต่าง ๆ รวมถึงชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิด้วย ดังนั้นในแต่ละเซลล์ของพืชจึงสามารถที่จะเกิดไปเป็นต้นใหม่ได้ และเป็นไปได้ที่จะสร้างสารทุติยภูมิได้เหมือนกับต้นจริง[1-2]

การผลิตสารทุติยภูมิโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช[3]

ทำได้โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนของพืชสมุนไพรซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเจริญ บนสูตรอาหารที่เหมาะสมแล้วเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงตามที่ต้องการ จากนั้นจึงหาวิธีที่เหมาะสมที่ทำให้เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงนั้นสามารถผลิตสารทุติยภูมิตามที่ต้องการได้

โดยทั่วไปเนื้อเยื่อเจริญที่นำมาเพาะเลี้ยงมักถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นแคลลัส (callus culture) ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์พาเรนไคมาที่ไม่สามารถบอกได้ว่าเปลี่ยนแปลงมาจากส่วนใดของต้นพืช และยังไม่ถูกกำหนดว่าจะเจริญไปเป็นอวัยวะใดและทำหน้าที่ใด (undifferentiated cells) หลังจากนั้นแคลลัสจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อที่มีคุณสมบัติตามต้องการ หรืออาจทำให้งอกเป็นต้นใหม่ (regenerate) จำนวนมากเพื่อเพาะปลูกลงดินต่อไป

ดังนั้นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช นอกจากชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงจะต้องเป็นเนื้อเยื่อเจริญแล้ว จะต้องเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปลอดเชื้อและควรมีการเปลี่ยนถ่ายเนื้อเยื่อลงในอาหารใหม่ (subculture) ตามเวลาอันเหมาะสม

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อพืชสมุนไพร[3]

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้มีชีวิตรอด สามารถเจริญเติบโตและสร้างสารทุติยภูมิตามที่ต้องการนั้น จะต้องมีปัจจัยหลายประการมาเกี่ยวข้อง ทั้งปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน

ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง ได้แก่ แสงสว่าง และ อุณหภูมิ การให้แสงสว่างนั้นมิได้มีจุดมุ่งหมายเพื่อให้เนื้อเยื่อเกิดการสังเคราะห์แสง แต่เพื่อช่วยควบคุมการเกิดลักษณะทางสัณฐานมากกว่า ซึ่งจะต้องคำนึงถึงความเข้มของแสง ระยะเวลาของการให้แสง และคุณภาพของแสงด้วย ส่วนอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับเนื้อเยื่อแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วมักจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง $25 \pm 2\ ^{\circ}C$

ส่วนปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง และอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงจะต้องมีขนาดที่พอเหมาะ (โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร) เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและไม่มีโอกาสติดเชื้อจุลินทรีย์ได้ง่าย ควรเป็นเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายยอดหรือปลายราก และจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวก่อนที่จะนำมาเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงนั้นมี 2 ชนิด คือ อาหารชนิดกึ่งแข็งที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงแคลลัสและ/หรืออวัยวะต่าง ๆ และอาหารชนิดเหลวที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอย อาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 2 ชนิดนั้นประกอบด้วยสารอาหาร แร่ธาตุ และสารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืช ซึ่งปริมาตรของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงควรเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และถูกควบคุมสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้อยู่ในช่วง 5.0-6.0

สารควบคุมการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมนพืช ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งเซลล์ การขยายเซลล์ และการเกิดเป็นอวัยวะ สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมี 5 กลุ่ม ได้แก่ auxins, cytokinins, gibberllins, ethylene และ absicic acid โดยทั่วไป auxins และ cytokinins เป็นกลุ่มที่ถูกนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมากที่สุด นอกจากนี้ความสมดุลระหว่าง auxins และ cytokinins ในอาหารเพาะเลี้ยง จะมีผลต่อการควบคุมการเกิดสัณฐานของเนื้อเยื่อพืชด้วย

ข้อจำกัดของการผลิตสารทุติยภูมิโดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร[2-5]

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ผลิตสารทุติยภูมิที่มีประโยชน์ทางเภสัชกรรมและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของพืชบางชนิดสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ในปริมาณมากกว่าต้นจริง และใช้เป็นแหล่งผลิตสารทุติภูมิในระดับอุตสาหกรรม เช่น *Lithospermum erythrorhizon* (shikonin), *Panax ginseng* (ginsenoside), *Coleus blumeii* (rosmarinic acid) และ *Coptis japonica* (berberine) แต่ส่วนใหญ่แล้วสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชมักจะมีปริมาณน้อยกว่าที่พบในต้นจริง เนื่องจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงเหล่านี้เป็น undifferentiated cells ซึ่งขาดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารทุติยภูมิ หรือแม้ว่าเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงบางอย่างจะมีความสามารถที่จะสร้างสารทุติยภูมิได้ แต่เนื่องจากลักษณะของ undifferentiated cells ซึ่งมีแวคิวโอขนาดเล็กและกระจัดกระจายทั่วไป จึงทำให้ไม่มีบริเวณที่จะสะสมสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นมานั้น ดังนั้นสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นจึงถูกขับออกจากเซลล์และมาสะสมอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง

และทำให้สกัดสารทุติยภูมิออกมาจากเซลล์ได้ปริมาณน้อยกว่าความเป็นจริง หรือ การสะสมของสารทุติยภูมิบางชนิดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง อาจทำให้เซลล์ตายได้

ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรเพื่อการผลิตสารทุติยภูมิ นอกจากจะต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้สารที่ต้องการปริมาณสูง หรือการปรับปรุงสูตรอาหารเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมแล้ว ยังมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพหลายวิธีมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร เพื่อทำให้สามารถผลิตสารทุติยภูมิจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงได้ตามที่ต้องการ

เทคโนโลยีชีวภาพ (biological technology) ที่นำมาใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร[1-6]

1. Cell immobilization

เป็นวิธีการตรึงให้เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน เพื่อเพิ่ม degree of cell-to-cell contact และทำให้เซลล์ที่ถูกตรึงอยู่นั้นมีลักษณะเหมือนเป็นอวัยวะหนึ่ง ๆ หรือมีความเป็น differentiated cells เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิได้คล้ายกับต้นจริงมากกว่า undifferentiated cells

วิธีการที่ใช้ตรึงเซลล์มีหลายวิธี เช่น gel entrapment, biofilms, adsorption, film immobilization หรือ membranes เป็นต้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้อาจทำให้ประสบความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิจากเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยง แต่ขณะเดียวกันก็มีต้นทุนค่อนข้างสูง หรือสารที่ใช้ตรึงเซลล์บางชนิดอาจมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์และอาจทำให้เซลล์ตายได้

Gel entrapment โดยใช้ calcium alginate เป็นวิธีตรึงเซลล์ที่ได้รับความนิยมมากที่สุด เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) ที่ถูกตรึงใน calcium alginate สามารถผลิต ajmalicine ได้เพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า[7]หรือเมื่อตรึงเซลล์เพาะเลี้ยง *Lithospermum erythrorhizon* ด้วย calcium alginate จะสามารถเพิ่มปริมาณการผลิต shikonin ได้เพิ่มขึ้นเป็น 2.5 เท่า[8] เป็นต้น

2. Morphological modification

โดยทั่วไปเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยจะมีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว แต่จะสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้น้อยเมื่อเทียบกับต้นจริง ดังนั้นการทำให้เกิดลักษณะที่เป็น differentiated cells โดยการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงให้กลายเป็นอวัยวะที่สร้างหรือสะสมสารทุติยภูมิที่ต้องการ จะสามารถเพิ่มปริมาณสารทุติยภูมิจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้[9]

อวัยวะเพาะเลี้ยงที่เกิดขึ้นเรียกว่า organized plant culture ซึ่งส่วนใหญ่นิยมเปลี่ยนแปลงเซลล์ให้มีลักษณะเป็นยอดหรือรากเพิ่มขึ้น โดยขึ้นอยู่กับว่าสารทุติยภูมิที่ต้องการนั้นมีการสร้างหรือสะสมที่อวัยวะใด วิธีการนี้เรียกว่า organogenesis ซึ่งสามารถทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง หรือโดยการใช้ *Agrobacterium rhizogenes* หรือ *A. tumefaciens* เพื่อทำให้เกิดเป็น transformed roots (hairy roots) หรือ transformed shoots ตามลำดับ

ตัวย่างเช่น สาร saikosaponins ได้จาก *Bupleurum falcatum* L. ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านการแพ้ ระงับอาการปวดและต้านการอักเสบได้ แม้ว่าในแคลลัสของพืชชนิดนี้จะไม่สามารถผลิตสารนี้ได้ แต่เมื่อเปลี่ยนแปลงแคลลัสให้มีลักษณะเป็น adventitious roots แล้ว จะสามารถผลิตสารนี้ได้ 0.02-0..1% ของน้ำหนักแห้ง และเมื่อเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของไนโตรเจน ($NH_4 : NO_3$ = 1 : 11) ในอาหารเพาะเลี้ยง จะสามารถผลิตสารนี้ได้จาก adventitious roots เพิ่มขึ้นเป็น 2% ของน้ำหนักแห้ง[10] หรือ hairy roots ของ *Hyssopus officinalis* สามารถผลิต rosmarinic acid ได้สูงสุด 8.03% ซึ่งมากกว่าในส่วนใบของต้นจริงถึง 8 เท่า[11] เป็นต้น

3. Biotransformation of precursors

คือการเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสารที่ต้องการ ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ (biotransformation) แล้ว จะได้ผลผลิตคือสารทุติยภูมิที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น

สารตั้งต้นที่เติมลงไปจะต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ไม่ถูกย่อยสลายในอาหารเพาะเลี้ยง และเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์แล้วจะไปอยู่ในส่วนใด ๆ ของเซลล์ที่ไม่ทำให้สารสลายตัว นอกจากนี้อัตราการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพควรจะมากกว่าอัตราของการเปลี่ยนแปลงหรือสลายตัวต่อไป จึงจะทำให้ได้ปริมาณสารทุติยภูมิมากขึ้นตามที่ต้องการ

ตัวอย่างเช่น เซลล์เพาะเลี้ยงของระย่อม (*Rauwolfia serpentina*) สามารถเปลี่ยน hydroquinone โดยปฏิกิริยา glycosylation ไปเป็น arbutine ซึ่งเป็นสารที่ใช้ฆ่าเชื้อในทางเดินปัสสาวะได้ และสามารถผลิต arbutine ได้สูงถึง 18 g/l ภายใน 7 วัน หรือการผลิต codeine ในเซลล์เพาะเลี้ยงของฝิ่น (*Papaver somniferum*) ซึ่งโดยทั่วไป undifferentiated cells จะไม่สามารถสร้าง codeine ได้ เนื่องจากไม่มี specialized latex cells แต่สามารถพบ thebaine ซึ่งเป็น precursor ของ codeine ได้ ดังนั้นเมื่อเติม thebaine ลงในอาหารเพาะเลี้ยง จึงสามารถผลิต codeine ได้สำเร็จ และนอกจากนี้ยังพบสารใหม่ คือ tetrahydrothebaine และ thebainone ได้อีกด้วย

นอกจากใช้เซลล์แล้ว ยังใช้วิธีแยกเอาเฉพาะเอนไซม์ (cell-free) มาศึกษา biotransformation ได้อีกด้วย เช่น เอนไซม์ที่ถูกสกัดออกจากเซลล์ของแพงพวยฝรั่ง (*C. roseus*) และถูกตรึงอยู่ในคอลัมน์ จากนั้นเติม precursor คือ catharanthine และ vindoline พบว่าวิธีนี้สามารถผลิต vinblastine ซึ่งเป็นสารต้านมะเร็งได้[12]

4. Elicitation

คือการเติมสารซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดชีวสังเคราะห์ของสารทุติยภูมิที่เป็น phytoalexin ได้ พบว่าหลังจากเติมสารเหล่านี้ลงไปในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงแล้ว จะทำให้ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ของเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมินั้นเพิ่มขึ้นด้วย จึงเป็นผลให้ปริมาณของสารทุติยภูมิเพิ่มขึ้นได้ สารที่เติมลงไปเรียกว่า elicitor ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ biotic elicitors เช่น จุลชีพ หรือส่วนต่าง ๆ ของจุลชีพ และ abiotic elicitors เช่น สารเคมี หรือโลหะหนัก เป็นต้น

ตัวอย่างเช่น ในเพาะเลี้ยงเซลล์ของ *Ruta graveolens* พบว่ากิจกรรมของ phenylalanine ammonia lyase (PAL) เพิ่มขึ้นภายใน 8-12 ชั่วโมงหลังจากการเติมยีสต์ชนิด *Rhootorula rubra* ลงในเซลล์เพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจึงมีการสะสมของ acridone epoxide, furoquinolines และ furano coumarins เพิ่มขึ้นตามลำดับ[13] หรือในเซลล์เพาะเลี้ยงของฝิ่น (*Papaver somniferum*) พบว่ากิจกรรมของ tyrosine/dopa decarboxylase เพิ่มขึ้น และมีการสะสมของ sanguinarine เพิ่มขึ้นถึง 80 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม[14]

5. Permeabilisation

คือการรบกวนการเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวคิวโอให้เสียสภาพไป ดังนั้นสารทุติยภูมิที่สร้างขึ้นและเก็บสะสมอยู่ภายในเซลล์จึงถูกปลดปล่อยออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงมากขึ้น และทำให้แยกเก็บสารทุติยภูมิได้เพิ่มมากขึ้น

วิธีรบกวนการเลือกผ่านโดยการใช้กระแสไฟฟ้า (electroporation) ทำให้สารทุติยภูมิภายในเซลล์ถูกปล่อยออกมาในอาหารเพาะเลี้ยงได้มากถึง 100% โดยขึ้นอยู่กับปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่ปรับใช้[15] นอกจากนี้อาจใช้ตัวทำละลาย เช่น dimethylsulfoxide (DMSO)[16] หรือใช้สารลดแรงตึงผิว เช่น polyoxyethylenesorbitane monolaurate (Tween-20)[17] เพื่อรบกวนการเลือกผ่านได้อีกด้วย

ข้อดีของวิธีนี้ คือ สามารถแยกเก็บสารทุติยภูมิได้โดยไม่ทำลายเซลล์และยังสามารถนำเซลล์กลับมาเพาะเลี้ยงต่อไปได้อีก ยกเว้นบางกรณีที่ตัวทำละลายอาจเป็นสารที่สามารถรบกวนการเลือกผ่านได้ อาจทำให้เซลล์ตายและไม่สามารถนำกลับมาเลี้ยงอีกได้

6. Two-phase system

เป็นวิธีการเติมแหล่งสะสมเทียม ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อให้เป็นบริเวณที่ใช้สะสมสารทุติยภูมิที่ถูกสร้างขึ้น ดังนั้นสารทุติยภูมิที่มากเกินกว่าจะเก็บไว้ในแวคิวโอและถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ จะถูกเก็บอยู่ในแหล่งสะสมเทียมนี้ โดยไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ และทำให้สามารถแยกเก็บสารทุติยภูมิเหล่านี้ได้ง่ายอีกด้วย

แหล่งสะสมเทียมนี้จะไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันกับอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้มองเห็นแยกเป็น 2 ส่วนชัดเจน จึงเป็นที่มาของคำว่า two-phase และจะต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นแหล่งสะสมเทียมได้แก่ n-hexadecane และ Miglyol® (triglyceride) หรืออาจใช้ lipophillic carrier ion exchanger หรือ neutral resin เช่น XAD[18] ได้อีกด้วย

Miglyol® เป็น non-toxic triglyceride เมื่อเติมลงไปจะเกิดเป็นชั้นบาง ๆ ห่อหุ้มเซลล์ไว้ ไม่มีผลต่ออาหารเพาะเลี้ยงและการแลกเปลี่ยนก๊าซ[19] มีรายงานว่า Miglyol® ใช้เพื่อสะสมสารกลุ่ม monoterpenes ที่ระเหยไปหมดจากเซลล์เพาะเลี้ยงแขวนลอยของ *Thuja occidentalis* ได้ ซึ่งปริมาณของสารเพิ่มขึ้นจาก 0.8 mg/g.l เป็น 3.0 mg/g.l [20]

นอกจากสารนี้จะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมเทียมแล้ว บางครั้งยังใช้ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เพื่อช่วยปกป้องเซลล์จากความเป็นพิษของสารตั้งต้น (precursor) บางชนิด ทำให้กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเกิดได้เสร็จสมบูรณ์ และได้ผลิตผลเป็นสารทุติยภูมิตามที่ต้องการเพิ่มขึ้น เช่น เมื่อใช้ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง *Vitis vinifera* สามารถเพิ่มปริมาณของผลิตผลได้มากขึ้นถึง 5 เท่า[21]

ส่วนการใช้ amberlite resin เช่น XAD-4 หรือ XAD-7 นอกจากจะช่วยดูดซับสารทุติยภูมิที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว ในบางครั้งยังช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตทั้งหมดอีกด้วย เช่น การใช้ XAD-7 เพื่อดูดซับ anthraquinones ที่ผลิตโดยเซลล์เพาะลี้ยงของ *Cinchona ledgeriana* และยังช่วยใช้ปริมาณการผลิตเพิ่มขึ้นอีก 15 เท่าอีกด้วย[22]

การผลิตสารทุติยภูมิปริมาณมาก (large scale production) โดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร[2,4]

สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพรปริมาณมากนั้น จะใช้เทคนิคในการเลี้ยงเซลล์เหมือนกับวิธีเพาะเลี้ยงจุลชีพในระดับอุตสาหกรรม แต่มีข้อแตกต่างกัน คือ ต้องใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชมากกว่าของจุลชีพ ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์พืชน้อยกว่าจุลชีพ และเซลล์พืชจะไวต่อแรงที่เกิดจากใบพัดในถังเพาะเลี้ยง ดังนั้นเซลล์พืชจึงตายง่ายกว่าจุลชีพและตกตะกอนลงมาในถังเพาะเลี้ยงได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งในสภาวะถังเพาะเลี้ยงนั้นมีอาหารและออกซิเจนจำกัด การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อได้ยากกว่าการเพาะเลี้ยงจุลชีพและมีโอกาสปนเปื้อนมากกว่า

สำหรับการผลิตสารทุติยภูมิปริมาณมากโดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง ดังนั้นถ้าต้องการให้ความสามารถในการผลิตเพิ่มขึ้นแล้ว ควรจะคงปริมาณของเซลล์เพาะเลี้ยงไว้ในขณะที่ปริมาณสารที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น จึงจะคุ้มกับการลงทุนการผลิต ซึ่งโดยทั่วไปแล้วปริมาณเซลล์ 40-60 g/l ควรที่จะได้ปริมาณสารทุติยภูมิอย่างน้อย 2% ของน้ำหนักแห้ง

ถึงแม้ว่าเซลล์เพาะเลี้ยงส่วนมากจะสามารถผลิตสารทุติยภูมิได้ แต่มักจะไม่ประสบความสำเร็จเมื่อต้องการขยายการผลิตในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามสารทุติยภูมิบางอย่างก็สามารถผลิตปริมาณมากโดยเซลล์เพาะเลี้ยงได้ เช่น rosmarinic acid (21.4%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Coleus blubeii*, anthraquinone (18%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Morinda citrifolia*, benzylisoquinolines (15%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Coptis japonica*, shikonin (12%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Lithospermum erythrorhizon*, berberine (10%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Berberis wilsonae*, shikimic acid (10%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Gallium mollugo*, diosgenin (8%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Dioscorea deltoidea*, และ nicotine (5%) จากเซลล์เพาะเลี้ยงของ *Nicotiana tabacum* เป็นต้น

ความคาดหวังของการผลิตสารทุติยภูมิโดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร[3,4]

แนวคิดของการผลิตสารทุติยภูมิปริมาณมากโดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงพืชสมุนไพร มีพื้นฐานมาจากการเพาะเลี้ยงจุลชีพ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าพืชใดก็ตามที่สามารถเจริญในสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมได้ เมื่อถูกคัดเลือกให้คงเหลือแต่เซลล์เพาะเลี้ยงที่ผลิตสารปริมาณมากได้แล้ว จะสามารถผลิตสารทุติยภูมิที่ต้องการปริมาณมากได้ อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณมากในสภาวะที่ถูกจำกัดอาหารและอากาศนั้นมักเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลชีพได้ง่าย เป็นผลให้เซลล์พืชตายและไม่ประสบความสำเร็จในการสร้างสารทุติยภูมิดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้น จึงมีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เช่นการตัดต่อยีนเข้าในเซลล์พืช มาใช้ร่วมกับเซลล์พืชเพาะเลี้ยง และใช้สารกระตุ้นหรือเติมสารตั้งต้นของกระบวนการชีวสังเคราะห์ เพื่อกระตุ้นให้กระบวนการชีวสังเคราะห์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ เนื่องจากการตัดต่อยีนสามารถทำระหว่างพืชต่างชนิดกันได้ ดังนั้นถ้าตัดต่อยีนลงไปในเซลล์ของพืชที่เจริญเติบโตได้ดี เช่น เซลล์ของ *Nicotiana tabaccum* จึงน่าจะเป็นแหล่งผลิตสารทุติยภูมิแหล่งใหม่ได้ อย่างไรก็ตาม การคาดการณ์ต่าง ๆ ยังคงต้องการข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมอีกมาก เช่น การเกิดสารตัวกลางขึ้นก่อนสารทุติยภูมิที่ต้องการ เอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจงหรือเอนไซม์ที่ควบคุมกระบวนการชีวสังเคราะห์สารทุติยภูมิ รวมทั้งการตอบสนองของยีนที่ตัดต่อเข้าไปต่อเอนไซม์เหล่านั้นด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Buitelaar RM. and Tramper J. 1992. Strategies to improve the production of secondary metabolites with plant cell cultures: a literature review. J Biotechnol 23: 111-141.
2. Banthorpe BV. 1994. Secondary metabolism in plant tissue culture: scope and limitations. Nat Prod Rep 11(3): 303-328.
3. Mulabagal V. and Tsay HS. 2004. Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int J Appl Sci Eng 2(1): 29-48.
4. Colin HA. 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. Plant Growth Reg. 34: 119-134.
5. Collin HA. and Edwards S. 1998. Secondary product synthesis by plant tissue cultures. in Plant cell culture. pp 103-120. Oxford: Bios Scientific Publisher.
6. Hunter CF. 1993. Secondary plant metabolites from tissue culture. in *In vitro* cultivation of plant cells. pp. 132-149. Oxford: Butterworth-Heinemann.

7. Asada M. and Shuler ML. 1989. Stimulation of ajmalicine production and excretion from *Catharanthus roseus*: effects of adsorption *in situ*, elicitors and alginate immobilization. Appl Microbiol Biotechnol 30: 475-481.
8. Kim DJ. and Chang HN. 1990. Enhanced shikonin production from *Lithospermum erythrorhizon* by in situ extraction and calcium alginate immobilization. Biotechnol. Bioeng. 36: 460-466.
9. Wink M. 1989. Genes of secondary metabolism: Differential expression in plants and *in vitro* cultures and functional expression in genetically transformed micro organisms. In: Kurs W. G. W. (ed.). Primary and secondary metabolism in plant cell cultures II. pp. 239-251. Berlin: Springer Verlag.
10. Yamamoto O. and Kamura K. 1997. Production of saikosaponin in cultured roots of *Bupleurum falcatum* L. Plant Tissue Cult. Biotechnol. 3: 138-147.
11. Murakami, Y., Omoto T, Asai, I., Shimomura, K. Yoshihira, K., and Ishimara K. (1998). Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 53: 75-78.
12. Kutney JP. 1996. Plant cell cultured combined with chemistry a powerful route to complex natural products. Pure and Appl Chem 68: 2073-2080.
13. Bohlmann J., Gibraltarskaya E. and Eilert U. 1995. Elicitor induction of furano coumarin biosynthetic pathway in cell cultures of *Ruta graveolens*. Plant Cell Tissue Organ Cult 43: 155-161.
14. Facchini PJ. 1998. Temporal correlation of tyramine metabolism with alkaloid and amide biosynthesis in elicited opium poppy cell cultures. Phytochemistry 49: 481-490.
15. Brodelius PE., Funk C. and Shillito RD. 1988. Permeabilization of cultivated plant cells by electroporation for release of intracellularly stored secondary products. Plant Cell Rep 7: 186-188.
16. Park CH. and Martinez BC. 1992. Release of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in two-phase culture systems. World J Microbiol Biotechnol 17(4): 417-421.
17. Boitel-Conti M., Gontier E., Laberche JC., Ductocq C. and Sangwa-Norreel BS. 1995. Permeabilisation of *Datura innoxia* hairy roots for release of stored tropane alkaloids. Planta Med 61: 287-290.

18. Wong PL., Royce AJ. and Lee-Parsons CWT. 2004. Improved ajmalicine production and recovery from *Catharanthus roseus* suspensions with increased product removal rates. Biochem Eng J 21(3): 253-258.

19. Cormierand F. and Ambid' C. 1987. Extractive bioconversion of geraniol by a *Vitis vinifera* cell suspension employing a two-phase system. Plant Cell Rep 6(6): 427-430.

20. Berlin J., Witte L., Schubert W. and Wray V. 1984. Determination and quantification of monoterpenoids secreted into the medium of cell cultures of *thuja occidentalis* Phytochemistry 23(6): 1277-1279.

21. Cormier F. and Ambid C. 1987. Extractive and bioconversion of geraniol by *Vitis vinifera* cell suspension employing a two-phase system. Plant Cell Rep 6: 427-430.

22. Robin RJ. and Rhodes MJC. 1986. The stimulation of anthraqinone production by *Cinchona ledgeriana* cultures with polymeric adsorbents. Appl Microbiol Biotechnol 24: 35-41.