การผลิตสารสีในกลุ่มบีทาเลนจากเซลล์แขวนลอยของต้นสร้อยไก่

Production of Betalain Pigments from Cell Suspension Cultures of *Celosia argentea*

ฐาปกรณ์ แสงอรุณ[1] อธิยา เตชะปารินทร์[1,2] พรเทพ ถนนแก้ว[1,2] จิรวรรณ อภิรักษากร[1,2] และ ปรีย์กมล กลั่นฤทธิ์[1,2*]

Thapagorn Sang a roon[1], Atiya Techaparin[1,2], Pornthap Thanonkeo[1,2], Jirawan Apiraksakorn[1,2] and Preekamol Klanrit[1,2*]

[1]สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[2]ศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University

[2]Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products, Khon Kaen University

[*]E-mail : kpreek@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันสารสีที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ที่พบในตลาดส่วนใหญ่เป็นสีสังเคราะห์ ซึ่งก่อให้เกิดความกังวลที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงเมื่อใช้หรือบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เช่น ก่อให้เกิดอาการแพ้หรือเป็นสารก่อมะเร็ง เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตสีธรรมชาติจากเซลล์พืชโดยชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของต้นสร้อยไก่และคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่ผลิตสารบีทาเลน รวมถึงศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตสารบีทาเลนจากเซลล์แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหรือเซลล์แขวนลอยของต้นสร้อยไก่ จากผลการวิจัยพบว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชบนอาหารแข็ง Murashige and Skoog (MS) สูตรชักนำแคลลัสที่เติมฮอร์โมน 2,4-Dichlorophenoxylacetic acid (2,4-D) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 6-Benzylaminopurine (BAP) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นสร้อยไก่ที่มีอายุ 7 วัน ให้เกิดแคลลัสได้ โดยลักษณะของแคลลัสที่ชักนำได้มีทั้งลักษณะที่เซลล์เกาะกันหลวม ๆ และเซลล์เกาะกันแน่น จากการนำเซลล์แคลลัสที่ได้ไปเพาะเลี้ยงเพื่อคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่สามารถเจริญและผลิตสารบีทาเลนได้สูง พบว่าสามารถคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการได้ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสบนอาหารแข็ง MS สูตรชักนำแคลลัส และถ่ายเซลล์ลงสู่อาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นจำนวน 48 รอบ เมื่อนำเซลล์ไลน์ที่เพิ่มปริมาณได้ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MS สูตรชักนำแคลลัส จากการศึกษารูปแบบการเจริญและการผลิตสารบีทาเลน พบว่าเซลล์มีการเจริญและมีการผลิตสารบีทาเลนสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน โดยมีค่าน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 17.69 กรัมต่อลิตร และปริมาณบีทาเลนรวมสูงสุดเท่ากับ 34.07 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยของต้นสร้อยไก่เพื่อผลิตสารบีทาเลนสำหรับการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป

คำสำคัญ : บีทาเลน แคลลัส เซลล์แขวนลอย ต้นสร้อยไก่

Abstract

Most of the colorants in the products on the market nowadays are synthetic colors, which raises concerns about the risk factors when using or consuming such products, such as causing allergies or carcinogens. Therefore, this research aims to produce natural pigments from plant cells by inducing callus from *Celosia argentea* and selecting cell lines that produce betalain. The growth and production patterns of betalain were

also studied from callus cells cultured in liquid medium or cell suspensions of *C. argentea*. The results showed that callus was successfully induced when using 7-day-old hypocotyls as explants and cultured on the solid Murashige & Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-Dichlorophenoxylacetic acid (2,4-D) at a concentration of 1 mg/L and 6-Benzylaminopurine (BAP) at a concentration of 0.1 mg/L (callus induction medium). Characteristics of induced callus included both friable callus and compact callus. Cell line capable of growing and producing high betalain content was obtained by culturing on a callus induction medium and sub-cultured into a new callus induction medium every 2 weeks for 48 cycles. The growth patterns and betalain production were then investigated using the proliferated cell line cultured in the callus induction liquid MS medium. The highest biomass and betalain production were observed after 15 days of culture, with a maximum dry weight of 17.69 g/L and a maximum total betalain content of 34.07 mg/L. Results obtained from this research can be applied as a guideline for establishing cell suspension cultures of *C. argentea* plants to produce betalain for further industrial use.

Keywords : Betalain, Callus, Cell Suspension, *Celosia argentea*

บทนำ

ต้นสร้อยไก่ (*Celosia argentea*) จัดอยู่ในวงศ์บานไม่รู้โรย (Amaranthaceae) เป็นต้นไม้ที่มีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชีย อเมริกา และแอฟริกา เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีความสูงประมาณ 2-3 เมตร แตกกิ่งก้านจำนวนมาก ใบเดี่ยวและหน้าใบมีสีเขียว ส่วนด้านหลังมีเส้นกลางใบที่เด่นชัด โดยปกติต้นสร้อยไก่ออกดอกในช่วงฤดูหนาว ดอกมีหลากหลายสี เช่น เหลือง ส้ม ชมพู และแดง เป็นต้น ขึ้นกับพันธุ์ นิยมใช้ต้นสร้อยไก่เป็นไม้ประดับสถานที่และจัดสวนเพื่อความสวยงาม นอกจากนี้ในบางประเทศเช่น ประเทศจีนหรือประเทศในทวีปแอฟริกา มีการนำต้นอ่อนและดอกของต้นสร้อยไก่มาประกอบอาหารได้เช่นเดียวกันกับผักทั่วไป (Palada and Crossman, 1999; Lock et al., 2004)

ต้นสร้อยไก่นอกจากจะถูกจัดเป็นไม้ประดับที่สวยงามแล้ว ยังสามารถสร้างและสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญในกลุ่มบีทาเลน ซึ่งเป็นสารสีที่โมเลกุลประกอบด้วยธาตุไนโตรเจนและละลายในน้ำได้ดี โดยสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มหลัก ได้แก่ บีทาไซยานิน (betacyanin) ที่ให้สีแดงถึงสีม่วง ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 535-540 นาโนเมตร และบีทาแซนทิน (betaxanthin) ที่ให้สีในโทนส้มเหลือง และมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 475-480 นาโนเมตร (Moreno et al., 2008; Lystvan et al., 2018) งานวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาสารสกัดบีทาเลนจากบีทรูท (*Beta vulgaris*) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันสามารถพบสารบีทาเลนที่สะสมในพืชชนิดต่าง ๆ อีกหลายชนิด เช่น ผลของแก้วมังกรพันธุ์เนื้อแดงเปลือกแดง (*Hylocercus costaricensis*) (ชุติมา และคณะ, 2561) ผลของต้นกระบองเพชร (*Cactaceae hexagonus*) (Barkociová et al., 2021) เมล็ดควินัว (*Chenopodium quinoa* Willd) และไม้ดอกชนิดต่าง ๆ เช่น เฟื่องฟ้า (*Bougainvillea glabra*) (Strack et al., 2003) และบานไม่รู้โรย (*Gomphrena globose*) (Ravichandran et al., 2021) เป็นต้น เนื่องจากสารบีทาเลนมีโทนสีที่หลากหลาย จึงทำให้ได้รับความสนใจและนำไปใช้เป็นสารให้สีในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม (กลุ่มสี E162) อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและสีย้อม เป็นต้น (Kumorkiewicz-Jamro et al., 2021)

จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าบีทาเลนเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ มีคุณสมบัติเด่นในการช่วยต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลชีพ และต้านมะเร็ง (Smeriglio et al., 2019; Madadi et al., 2020) นอกจากนี้ ยังพบว่าสารสกัดบีทาเลนจากบีทรูทสามารถยับยั้งการลำเลียงน้ำตาลกลูโคสในลำไส้ได้ ซึ่งอาจมีประโยชน์ในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Madadi et al., 2020) ในปัจจุบัน สารที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ที่พบในตลาดส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค และเนื่องจากผู้บริโภคให้ความสนใจกับสุขภาพและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติมากขึ้น จึงมีการใช้ประโยชน์จากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากพืช และด้วยคุณประโยชน์หลายประการที่กล่าวข้างต้น ประกอบกับเป็นสารที่มีโทนสีที่แตกต่างกัน จึงเหมาะที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิด ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาสารสกัดบีทาเลนจากพืชหลายชนิดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ เช่น ด้านอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ด้านการแพทย์ อุตสาหกรรมยา รวมถึงผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีการผลิตออกมาจำหน่ายตามท้องตลาด อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและสีย้อม เพื่อตอบสนองต่อกลุ่มคนที่ต้องการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มาจากธรรมชาติและต้องการหลีกเลี่ยงการใช้สีสังเคราะห์ทางเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ (Delgado-Vargas et al., 2000)

อย่างไรก็ตาม การใช้ชิ้นส่วนพืชตามธรรมชาติเพื่อสกัดสารสำคัญและใช้ประโยชน์จากสารสกัดในปัจจุบันนั้น อาจพบปัญหาและข้อจำกัดทั้งในเรื่องของปริมาณสารที่ผลิตไม่เพียงพอและความปลอดภัยของสารสกัด ปริมาณของสารที่สกัดได้จากพืชในแต่ละต้นและการสกัดในแต่ละครั้งมีปริมาณสารมากน้อยแตกต่างกันไป ซึ่งลักษณะภูมิประเทศ พื้นที่และสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อปริมาณของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พืชผลิตได้ ประกอบกับในบางกรณี อาจพบสารบางอย่างในพื้นที่เพาะปลูกซึ่งส่งผลให้พืชผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพลดลงได้ และหากสกัดโดยตรงจากส่วนต่าง ๆ ของพืช อาจปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินหรือในสภาพแวดล้อม ดังนั้น การใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอย เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้ เนื่องจากไม่ได้สกัดจากชิ้นส่วนพืชโดยตรง และการเพาะเลี้ยงแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของพืชในหลอดทดลองสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้ดี ทำให้พืชมีการผลิตและสะสมสารในปริมาณที่คงที่เมื่อทำการผลิตแต่ละครั้ง รวมทั้งยังสามารถทำการควบคุมการผลิตสารสำคัญได้ตลอดทั้งปี โดยไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศและไม่มีความจำเป็นต้องใช้พื้นที่เพาะปลูกขนาดใหญ่ นอกจากนี้ ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นมีความสะอาด ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ส่งผลให้สารที่ผลิตได้มีความสะอาดและปลอดภัย

โดยทั่วไปแคลลัสของพืชจะสามารถผลิตและสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มเดียวกันกับที่พบในชิ้นส่วนตามธรรมชาติของพืช อย่างไรก็ตามต้องมีกระบวนการเฉพาะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สูตรอาหารที่มีฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน ในสัดส่วนที่เหมาะสม เพื่อชักนำและคัดเลือกเซลล์แคลลัสหรือเซลล์ไลน์ที่สามารถผลิตและสะสมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการ มีรายงานการศึกษาการผลิตสารบีทาเลนจากต้นสร้อยไก่ โดยนำชิ้นส่วนพืชมาวางบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมฮอร์โมนพืชได้แก่ 2,4-D ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถชักนำแคลลัสที่สร้างและสะสมสารกลุ่มบีทาเลนภายในเซลล์ได้ (Guadarrama-Flores et al., 2015) นอกจากนี้ ยังพบรายงานการใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อชักนำแคลลัสจากต้นหงอนไก่ (*Celosia cristata*) ได้เช่นเดียวกัน (Warhade and Badere, 2018) นอกจากต้นสร้อยไก่แล้วยังพบรายงานการชักนำแคลลัสและเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเพื่อผลิตสารบีทาเลนจากพืชชนิดอื่น เช่น ต้นแก้วมังกร โดยใช้สูตรอาหารที่เสริมด้วยฮอร์โมนพิโคลแรม (4-amino-3,5,6-trichloropyridine-2-carboxylic acid, picloram) และ 2,4-D (Winson et al., 2020) รวมถึงเมล็ด ควินัว โดยใช้ 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้น (Henarejos-escudero et al., 2018)

แม้ว่าจะพบรายงานการชักนำแคลลัสและเซลล์แขวนลอยของต้นสร้อยไก่ อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบการรายงานการติดตามรูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย ควบคู่กับการศึกษาปริมาณเซลล์และปริมาณสารบีทาเลนที่ผลิตสูงสุดในช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยงเซลล์ในแต่ละรอบ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นประโยชน์อย่างมากหากต้องการนำสารบีทาเลนไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนของต้นสร้อยไก่ คัดเลือกเซลล์ไลน์ที่ผลิตสารบีทาเลนและเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยจากต้นสร้อยไก่ รวมถึงศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอยและวิเคราะห์ปริมาณสารบีทาเลนทั้งหมด

วิธีการวิจัย

1. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดต้นสร้อยไก่

นำเมล็ดต้นสร้อยไก่มาล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที จากนั้นล้างด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70% โดยปริมาตร (v/v) เป็นเวลา 5 นาที และล้างด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0.6% โดยปริมาตร ที่มีการเติมสารลดแรงตึงผิว (APSA-80) 2-3 หยด เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเมล็ดไปล้างด้วยน้ำกลั่น และนำไปซับน้ำออกและวางเมล็ดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 3% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) และไฟตาเจล (phytagel®) ความเข้มข้น 0.4% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.8 โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 25±2 องศาเซลเซียส มีความเข้มแสงที่ 2,000-3,000 ลักซ์ และช่วงเวลาในการให้แสงเท่ากับ 16 ชั่วโมงต่อวัน

2. การชักนำแคลลัส

จากการทดลองก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ใช้ชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ใบ ลำต้นใต้ใบเลี้ยง และราก มาทดสอบการชักนำให้เกิดแคลลัส ซึ่งผลการศึกษาพบว่าลำต้นใต้ใบเลี้ยงมีการตอบสนองต่ออาหารสูตรชักนำแคลลัสที่มีการเติมฮอร์โมน 2,4-D และ BAP ดีกว่าชิ้นส่วนอื่น ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นสร้อยไก่ที่เจริญบนอาหารแข็งเป็นเวลา 7 วัน มาตัดส่วนของใบและรากออก และตัดเฉพาะส่วนของลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่มีสีแดงให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร จากนั้นวางชิ้นส่วนพืชลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยดัดแปลงจาก Guadarrama-Flores et al. (2015) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงที่ 2,000-3,000 ลักซ์ และช่วงเวลาการให้แสงคือ 16 ชั่วโมงต่อวัน สังเกตการเกิดแคลลัสและบันทึกข้อมูล ได้แก่ สี และชนิดของแคลลัส

3. การคัดเลือกและการเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ผลิตสารบีทาเลน

คัดเลือกแคลลัสที่มีการผลิตสารบีทาเลนจากกลุ่มเซลล์แคลลัสทั้งหมด โดยพิจารณาจากลักษณะแคลลัสที่มีการเกาะตัวแบบหลวม ๆ และสามารถเจริญอย่างรวดเร็วทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว จากนั้นแยกกลุ่มเซลล์ที่มีการสร้างสารบีทาเลนโดยเลือกเฉพาะแคลลัสที่มีสีแดง นำมาวางบนอาหารใหม่ที่เติมฮอร์โมนพืช 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 2,000-3,000 ลักซ์ ให้แสงสว่างเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อได้แคลลัสที่มีคุณลักษณะตามที่ต้องการแล้ว เพิ่มปริมาณแคลลัสโดยการย้ายลงอาหารสังเคราะห์ที่เติมฮอร์โมนพืชทุก ๆ 2 สัปดาห์

4. การศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์แขวนลอย

นำเซลล์ที่คัดเลือกและเพิ่มปริมาณได้สำเร็จบนอาหารแข็งมาเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้แคลลัสเริ่มต้นปริมาณ 2 กรัมน้ำหนักสด เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร pH 5.8 และเสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงเซลล์แบบเขย่าที่ความเร็ว

รอบ 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส สภาวะความเข้มแสงที่ 2,000-3,000 ลักซ์ ช่วงเวลาการให้แสงคือ 16 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 30 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างเซลล์พืชทุก ๆ 3 วัน จากนั้นนำไปวัดการเจริญโดยการวิเคราะห์น้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และปริมาณบีทาเลนทั้งหมด โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

5. การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณบีทาเลนทั้งหมด

ในการสกัดสารบีทาเลนใช้น้ำเป็นตัวทำละลายโดยดัดแปลงวิธีการจาก Lystvan et al. (2018) และ Das et al. (2019) โดยใช้แคลลัสเริ่มต้น 5% โดยน้ำหนักแห้งต่อปริมาตร นำตัวอย่างไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองและแยกเศษแคลลัสออกจากสารสกัด

ปริมาณสารบีทาเลนวิเคราะห์ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงของบีทาแซนทินและบีทาไซยานินที่ความยาวคลื่น 483 และ 535 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer, AS ONE ASV11D-H, Japan) จากนั้นคำนวณหาปริมาณบีทาเลนโดยใช้สมการที่ 1 และ 2 (Castellanos-Santiago and Yahia, 2008) และนำเสนอข้อมูลปริมาณสารบีทาเลนต่อปริมาณเซลล์เพาะเลี้ยง โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

$$\text{BX or BC (mg/g)} = \frac{A \times DF \times MW \times V}{\varepsilon \times L \times m} \qquad (1)$$

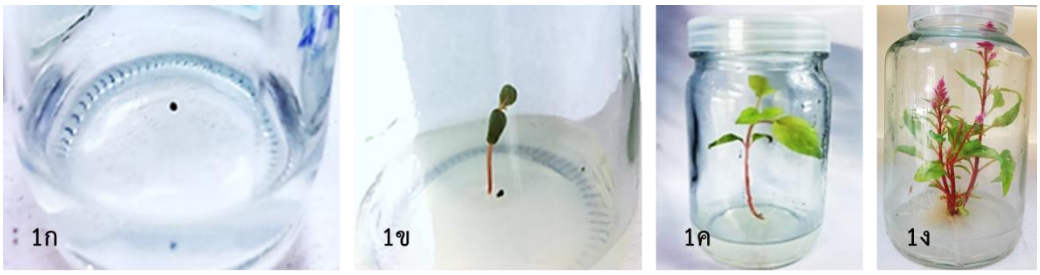
$$\text{Total betalain content (mg/g)} = BX + BC \qquad (2)$$

โดยที่ A คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 483 และ 535 นาโนเมตร สำหรับบีทาแซนทิน (BX) และบีทาไซยานิน (BC) ตามลำดับ DF คือค่าการเจือจาง MW คือมวลโมเลกุลของบีทาแซนทินและบีทาไซยานิน 308 กรัมต่อโมล และ 550 กรัมต่อโมล V คือ ปริมาตรของสารตัวอย่างที่นำมาวัด (มิลลิลิตร) ε คือ ค่าคงที่การดูดกลืนแสงของสารแต่ละชนิด (extinction coefficient) บีทาแซนทินเท่ากับ 48,000 L mol^{-1} cm^{-1} และบีทาไซยานินเท่ากับ 60,000 L mol^{-1} cm^{-1} L คือ ระยะทางที่แสงผ่านตัววัด มีค่าเท่ากับ 1 เซนติเมตร และ m คือ น้ำหนักของผงสารตัวอย่าง (น้ำหนักแห้ง) ที่มีหน่วยเป็นกรัม

ผลการวิจัย

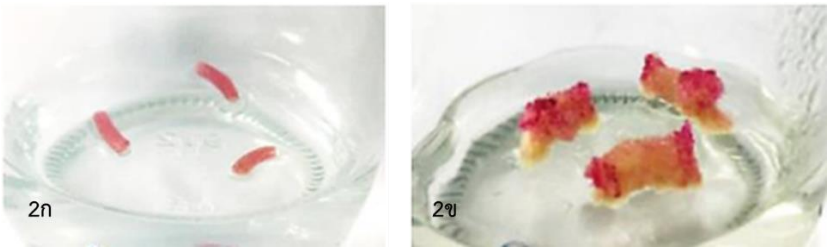
1. การฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดและการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนต้นสร้อยไก่

จากการนำเมล็ดต้นสร้อยไก่มาฟอกฆ่าเชื้อตามวิธีการที่กล่าวแล้วในข้อ 1 พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เจริญบนอาหารสูตร MS (ภาพที่ 1ก) โดยเมล็ดสามารถงอกและพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ และมีใบเลี้ยง 1 คู่ (ภาพที่ 1ข) เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นต้นสร้อยไก่จะมีการแตกยอดและใบใหม่ (ภาพที่ 1ค) และสามารถเกิดดอกได้เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 1ง)



ภาพที่ 1 การชักนำและเพาะเลี้ยงต้นสร้อยไก่ในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร MS 1ก) เมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อบนอาหารสังเคราะห์ 1ข) ต้นอ่อนสร้อยไก่ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ 1ค) ต้นอ่อนสร้อยไก่อายุ 2 สัปดาห์ และ 1ง) ต้นสร้อยไก่อายุ 3 เดือน (ดอกสีแดง)

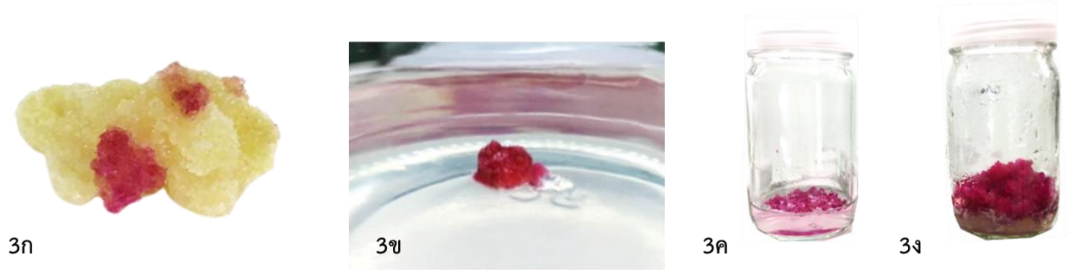
จากการชักนำแคลลัสโดยใช้ชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงที่มีสีแดงของต้นสร้อยไก่ที่มีอายุ 1 สัปดาห์ มาใช้สำหรับการชักนำแคลลัส โดยตัดเป็นชิ้นให้มีความยาว 0.5 เซนติเมตร วางบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมฮอร์โมน 2,4-D และ BAP ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าชิ้นส่วนพืชยังคงมีสภาพที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 2ก) และเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่ามีแคลลัสเกิดขึ้นบนชิ้นลำต้นสร้อยไก่ ซึ่งลักษณะเซลล์แคลลัสมีสีขาวและสีแดง (ภาพที่ 2ข) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของฮอร์โมนดังกล่าวสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสบนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นสร้อยไก่ได้



ภาพที่ 2 การชักนำแคลลัสของต้นสร้อยไก่บนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัส 2ก) ชิ้นส่วนลำต้นสร้อยไก่บนอาหารแข็ง อายุ 0 วัน และ 2ข) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดขึ้นบนชิ้นส่วนลำต้นสร้อยไก่ที่มี อายุ 2 สัปดาห์

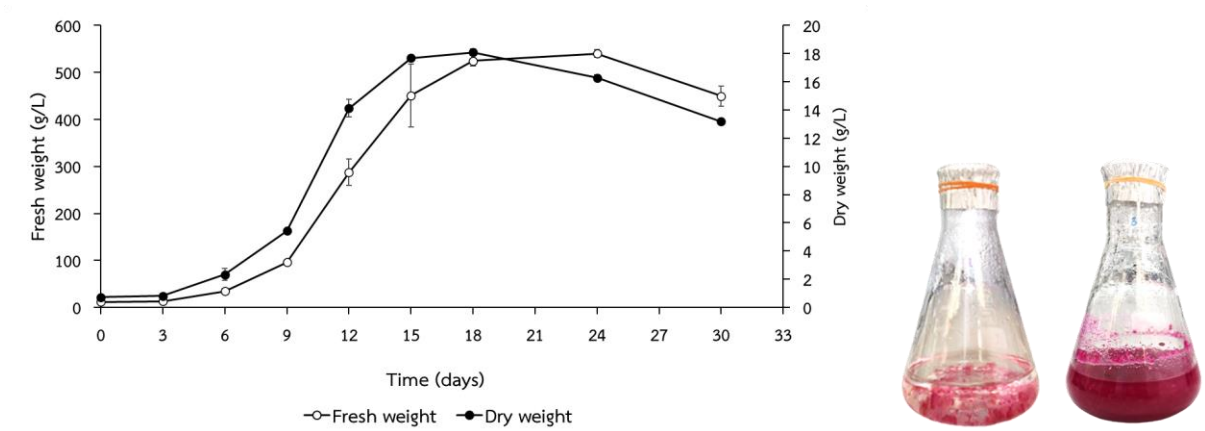
2. การคัดเลือกและเพิ่มปริมาณแคลลัสที่ผลิตสารบีทาเลน

สำหรับการคัดเลือกแคลลัสที่มีการสร้างสารบีทาเลน ทางผู้วิจัยเริ่มจากการนำเอากลุ่มเซลล์แคลลัสสีแดงจากแคลลัสบนลำต้นสร้อยไก่มาวางบนอาหารใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยแคลลัสเริ่มต้นยังคงมีลักษณะแข็งและเกาะกันแน่น ประกอบด้วยเซลล์ที่สร้างและไม่สร้างสารสีแดงอยู่ในชิ้นส่วนเดียวกัน (ภาพที่ 3ก) เมื่อย้ายเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่มีสีแดงไปวางบนอาหารแข็ง (ภาพที่ 3ข) ทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวมทั้งหมด 48 ครั้ง จากเซลล์แคลลัสสีแดงที่มีลักษณะแข็ง สามารถพัฒนาเป็นแคลลัสที่มีลักษณะนิ่มและเจริญบนอาหารแข็งได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ต้องการ เมื่อนำแคลลัสอายุ 14 วันวางลงบนอาหารใหม่ (ภาพที่ 3ค) พบว่าเซลล์ยังคงมีสีแดงและเมื่อเซลล์มีอายุครบ 14 วัน จะมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3ง) และแคลลัสมีการเจริญอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 3 การคัดเลือกและการเจริญของแคลลัสบนอาหารสังเคราะห์สูตรชักนำแคลลัส 3ก) แคลลัสที่ชักนำได้จากชิ้นส่วนลำต้นอ่อนสีแดงของต้นสร้อยไก่ 3ข) แคลลัสบางส่วนที่มีการสร้างสารบีทาเลนในอาหารแข็ง 3ค) แคลลัสอายุ 14 วันที่เจริญบนอาหารแข็ง และ 3ง) แคลลัสที่เจริญบนอาหารแข็งเป็นเวลา 14 วัน

จากการศึกษาการเจริญของเซลล์แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS พบว่าเซลล์เริ่มมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วงวันที่ 0 และ 12 โดยมีน้ำหนักแห้งคือ 0.73 และ 14.11 กรัมต่อลิตร และน้ำหนัดสดคือ 12.03 และ 287.43 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในวันที่ 15 พบว่ามีปริมาณเซลล์มากที่สุดโดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 17.69 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักสดเท่ากับ 451.01 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นปริมาณเซลล์มีแนวโน้มลดลง โดยพบว่าน้ำหนักแห้งและน้ำหนักสดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน มีค่าเท่ากับ 13.19 และ 449.53 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4ก) สำหรับลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวนั้น พบว่าในวันที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง เซลล์ยังมีการเกาะกลุ่มเล็ก ๆ กระจายตัวในอาหารเหลว (ภาพที่ 4ข) แต่เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์พืชจะมีปริมาณมากขึ้น และมีลักษณะการกระจายตัวในอาหารเหลวและเซลล์ยังคงมีสีแดง (ภาพที่ 4ค)



4ก 4ข 4ค

ภาพที่ 4 การเจริญของเซลล์แขวนลอยของต้นสร้อยไก่ 4ก) น้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเซลล์แขวนลอย 4ข) ลักษณะของเซลล์แคลลัสในวันเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง และ 4ค) ลักษณะของเซลล์แคลลัสที่เจริญในอาหารเหลวเป็นเวลา 14 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง และ bars ที่แสดงในภาพหมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง

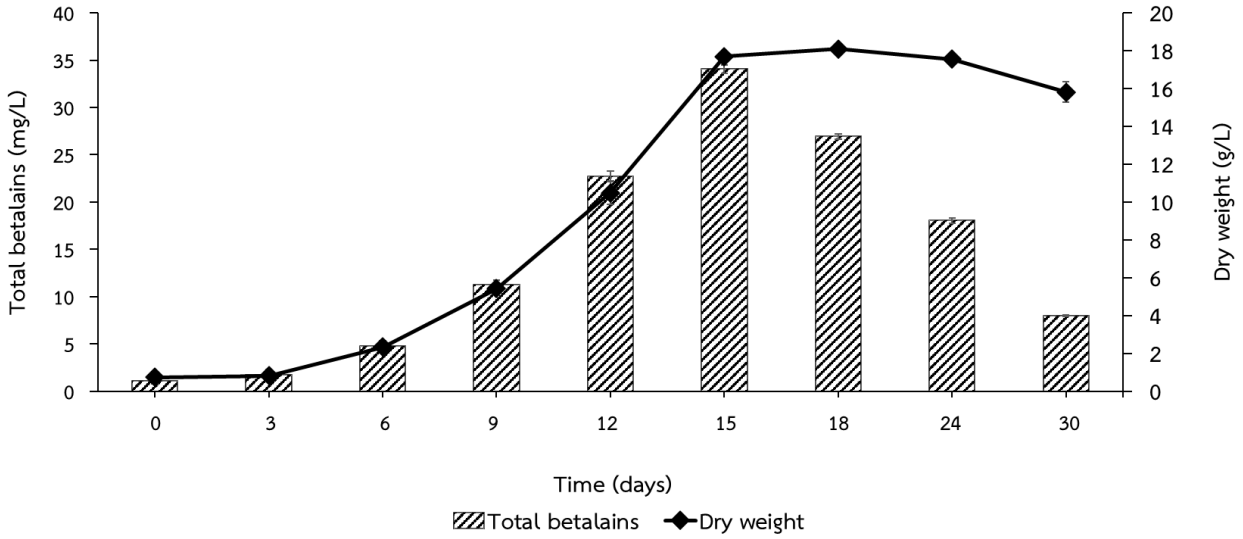
3. การศึกษาการผลิตบีทาเลนของเซลล์แขวนลอย

จากการศึกษาการผลิตสารบีทาเลนของเซลล์แคลลัสที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS พบว่าแคลลัสมีการผลิตและสะสมสารบีทาเลนเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่เพิ่มขึ้น โดยวันที่ 0 และ 12 มีสารบีทาเลนรวมเท่ากับ 1.07 และ 22.71 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณบีทาเลนมีค่าสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.07 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีปริมาณลดลงโดยในวันที่ 30 มีค่าเท่ากับ 7.98 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 5 กราฟแท่ง) ซึ่งลักษณะการผลิตสารบีทาเลนของแคลลัสมีความสัมพันธ์กับรูปแบบการเจริญ (ภาพที่ 5 กราฟเส้น) แสดงให้เห็นว่าการผลิตและสะสมสารบีทาเลนเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญของเซลล์พืช

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เมล็ดที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 70% ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 0.6% ไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ รวมทั้งเมล็ดยังคงความมีชีวิตและสามารถเจริญเป็นต้นอ่อนได้ปกติโดยมีลักษณะที่แข็งแรง ซึ่งมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะแก่การเจริญและไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ซึ่งต้นอ่อนที่งอกขึ้นนั้นสามารถนำไปใช้ในการทดลองการชักนำแคลลัสได้ แสดงให้เห็นว่าวิธีฟอกฆ่าเชื้อ

ดังกล่าวสามารถกำจัดและยับยั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับเมล็ดได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Guadarrama-Flores et al. (2015) ซึ่งพบว่าการฟอกเมล็ดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70% เวลา 30 วินาที ร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้น 1.8% ที่ผสมสารลดแรงตึงผิว (Tween-20) ความเข้มข้น 0.2% เวลา 30 นาที สามารถกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ของเมล็ดสร้อยไก่ได้เช่นกัน ทั้งนี้ระยะเวลาหรือความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้นั้น อาจแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของพืชและชิ้นส่วนพืชที่นำมาทำการทดลอง



ภาพที่ 5 การเจริญและการผลิตสารบีทาเลนของแคลลัสต้นสร้อยไก่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS เป็นระยะเวลา 30 วัน โดยทำการทดลองทั้งสิ้น 3 ซ้ำในแต่ละช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง และ bars ที่แสดงในภาพหมายถึงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง

ความสำเร็จในการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนพืชขึ้นกับปัจจัยหลายประการ และการใช้สูตรอาหารที่มีฮอร์โมนพืชในกลุ่มออกซินและไซโทไคนิน ในสัดส่วนที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญ ในงานวิจัยนี้ ใช้ฮอร์โมน 2,4-D ร่วมกับ BAP ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าสูตรอาหารดังกล่าวสามารถกระตุ้นการเกิดของแคลลัสตามบริเวณชิ้นส่วนที่ได้จากลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นสร้อยไก่ จากการศึกษาของ Guadarrama-Flores et al. (2015) พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำแคลลัสบนชิ้นส่วนต้นสร้อยไก่ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ ยังพบรายงานว่า 2,4-D และ BAP ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สามารถชักนำแคลลัสที่มีการสะสมบีทาเลนจากเมล็ดควินัวได้สำเร็จ (Henarejos-escudero et al., 2018)

จากการทดลองดังกล่าวพบว่าฮอร์โมน 2,4-D และ BAP นั้นสามารถใช้ในการชักนำแคลลัสต้นสร้อยไก่ได้ ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ต่างกันนั้นอาจขึ้นอยู่กับการตอบสนองของชิ้นส่วนพืชแต่ละชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนของ 2,4-D และ BAP ยังมีผลต่อกลไกการควบคุมการสังเคราะห์บีทาเลนในพืช (Girod and Zryd, 1991)

ถึงแม้แคลลัสที่ได้จากการชักนำชิ้นส่วนของต้นสร้อยไก่จะมีทั้งลักษณะที่เซลล์เกาะกันแน่นและเกาะกันหลวม ๆ แต่เมื่อนำแคลลัสไปทำการคัดเลือกเพื่อหาเซลล์ที่สามารถเจริญและผลิตสารบีทาเลนได้ดี โดยการย้ายแคลลัสลงบนอาหารใหม่ที่มีการเติม

2,4-D และ BAP ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทุก ๆ 2 สัปดาห์ สามารถคัดเลือกแคลลัสที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการคือ แคลลัสเกาะกันแบบหลวม ๆ เจริญได้ทั้งในอาหารแข็งและเหลว และมีการสร้างและสะสมบีทาเลนโดยแคลลัสนั้นมีสีแดง (ภาพที่ 3 และ 4) การชักนำและพัฒนาแคลลัสจนกระทั่งได้เซลล์ไลน์ที่มีคุณลักษณะเหมาะสมและผลิตสารสีได้อย่างคงที่นั้นเป็นกระบวนการที่ใช้ระยะเวลานาน ทั้งนี้ระยะเวลาและเทคนิคในการคัดเลือกแคลลัสนั้นจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์พืช

สำหรับการสกัดสารกลุ่มบีทาเลนจากแคลลัสและเซลล์แขวนลอยนั้นทำได้หลายวิธี สารที่ได้รับความนิยมในการสกัดคือเมทานอล เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและสามารถสกัดบีทาเลนได้ในปริมาณมาก และสามารถช่วยในการแยกโปรตีนละลายน้ำออกได้ดี (ทัตดาว, 2557) การใช้เมทานอลร่วมกับกรดไฮโดรคลอริก สามารถใช้ในการสกัดบีทาเลนได้เช่นกัน ซึ่งวิธีที่จะเลือกใช้นั้นต้องเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่แพง และไม่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารกลุ่มบีทาเลน จากการใช้น้ำเป็นตัวสกัด ตามวิธีการของ Lystvan et al. (2018) พบว่าสามารถสกัดบีทาเลนจากเซลล์แขวนลอยได้ สารสกัดที่ได้นั้นยังคงความเป็นสีชมพูอมม่วงและสามารถนำไปวัดปริมาณบีทาเลนได้เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าขั้นตอนการสกัดที่ใช้นั้นไม่ส่งผลต่อสารบีทาเลน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณบีทาเลนสูงสุดที่ได้จากการทดลองนี้คือ 1.93 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง หรือคิดเป็น 0.04 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด กับปริมาณบีทาเลนสูงสุดของ Lystvan et al. (2018) คือ 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเหมือนกัน พบว่าปริมาณบีทาเลนจากการทดลองนี้มีค่าน้อยกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่ใช้ในการทดลอง อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบปริมาณของสารกลุ่มบีทาเลนจากการทดลองของ Guadarrama-Flores et al. (2015) ที่ใช้ตัวทำละลายคือ 10 มิลลิโมลาร์บัฟเฟอร์ฟอสเฟต ที่ pH 6.0 ร่วมกับการใช้ 10 มิลลิโมลาร์ของกรดแอสคอร์บิกพบว่าปริมาณบีทาเลนสูงสุดเท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณบีทาเลนที่น้อยกว่าการทดลองนี้ ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับระยะเวลาหรืออุณหภูมิที่แตกต่างกันของการสกัดจึงทำให้ได้ปริมาณของบีทาเลนที่ไม่เท่ากัน นอกจากใช้น้ำเป็นตัวทำละลายแล้ว เมทานอล 1% ร่วมกับกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) สามารถสกัดบีทาเลนจากแคลลัสต้นหงอนไก่ (Warhade and Badere, 2018) และ 20 มิลลิโมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ pH 5.0 ร่วมกับการใช้ 10 มิลลิโมลาร์กรดแอสคอร์บิก สามารถสกัดสารกลุ่มบีทาเลนจากแคลลัสเมล็ดควินัวได้เช่นกัน (Henarejos-escudero et al., 2018) ทั้งนี้ผู้วิจัยควรเลือกวิธีและสารที่ใช้สำหรับการสกัดให้เหมาะกับชนิดของพืชหรือชิ้นส่วนพืชที่นำมาสกัด หากมีการนำสารสกัดดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในมนุษย์ ควรเลือกวิธีที่ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายหรือไม่ทิ้งสารตกค้างที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย (Cai et al.,2005)

จากกราฟรูปแบบการเจริญในอาหารเหลวนั้นทำให้ทราบว่าเซลล์มีการเพิ่มปริมาณขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่ามีปริมาณเซลล์และปริมาณบีทาเลนที่สะสมภายในเซลล์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 15 วัน และหลังจากวันที่ 15 เป็นต้นไป พบว่าปริมาณเซลล์และสารกลุ่มบีทาเลนนั้นมีปริมาณที่ลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากเซลล์เริ่มมีอายุมากรวมถึงเริ่มมีการตายของเซลล์ทำให้มีการปลดปล่อยสารชีวโมเลกุลรวมถึงบีทาเลนออกสู่อาหารที่ใช้เลี้ยง ส่งผลให้ปริมาณเซลล์ลดลงหลังจากวันที่ 15 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Guadarrama-Flores et al. (2015) ที่พบว่าเซลล์มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตามค่าน้ำหนักแห้งของงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่าประมาณ 7 กรัมต่อลิตร (Guadarrama-Flores et al., 2015)

จากงานวิจัยนี้พบว่าฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ BAP ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมสำหรับการชักนำแคลลัสจากชิ้นส่วนลำต้นใต้ใบเลี้ยงของต้นสร้อยไก่ ถึงแม้แคลลัสที่ชักนำได้จะมีความหลากหลาย แต่เทคนิคการย้ายเซลล์พืชลงสู่อาหารใหม่ในหลาย ๆ รอบ ทำให้สามารถคัดเลือกเซลล์แคลลัสที่มีการเจริญและผลิตและสะสมสารบีทาเลนได้ในปริมาณที่สูง และแคลลัสที่คัดเลือกได้ในงานวิจัยนี้สามารถผลิตสารบีทาเลนได้สูงสุดเท่ากับ 34.07 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรชักนำแคลลัส เป็นระยะเวลา 15 วัน ซึ่งผลการวิจัยที่ได้นี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อการผลิตสารบีทาเลนสำหรับใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ชุติมา ถนอมสิทธิ์, ธิพรพงษ์ เจริญยิ่ง และจักรพันธ์ นาน่วม. (2018). Batalain: Dragon fruit (*Hylocereus* spp.) extract for skin color development in aquatic animal. *Koch Cha Sarn Journal of Science*, *40*(2), 1-10.

ทัตดาว ภาษีผล. (2557). Betalain: Extraction and analysis. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.*, *42*(4), 718–729.

Barkociová, M., Tóth, J., Sutor, K., Drobnicka, N., Wybraniec, S., Dudík, B., Bilková, A. and Czigle, S. (2021). Betalains in edible fruits of three Cactaceae taxa—*Epiphyllum*, *Hylocereus*, and *Opuntia*—their LC-MS/MS and FTIR identification and biological activities evaluation. *Plants*, *10*(12), 2669. https://doi.org/10.3390/plants10122669

Cai, Y. Z., Sun, M. and Corke, H. (2005). Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. *Trends in Food Science and Technology*, *16*(9), 370–376. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.03.020

Castellanos-Santiago, E. and Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(14), 5758–5764. https://doi.org/10.1021/JF800362T

Das, M., Saeid, A., Hossain, M. F., Jiang, G. H., Eun, J. B. and Ahmed, M. (2019). Influence of extraction parameters and stability of betacyanins extracted from red amaranth during storage. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(2), 643–653. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3519-x

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. and Francis, F. J. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40*(3), 173-289. https://doi.org/10.1080/10408690091189257

Girod, P-A. and Zryd, J-P. (1991). Secondary metabolism in cultured red beet (*Beta vulgaris* L.) cells: Differential regulation of betaxanthin and betacyanin biosynthesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *25*, 1-12. https://doi.org/10.1007/BF00033905

Guadarrama-Flores, B., Rodriguez-Monroy, M., Cruz-Sosa, F., Garcia-Carmona, F. and Gandia-Herrero, F. (2015). Production of dihydroxylated betalains and dopamine in cell suspension cultures of *Celosia argentea* var. *plumosa*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(10), 2741–2749. https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.5B00065

Henarejos-escudero, P., Guadarrama-flores, B. and Guerrero-rubio, M. A. (2018). Development of betalain producing callus lines from colored quinoa varieties (*Chenopodium quinoa* Willd). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*, 467–474. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04642

Kumorkiewicz-Jamro, A., Świergosz, T., Sutor, K., Spórna-Kucab, A. and Wybraniec, S. (2021). Multi-colored shades of betalains: Recent advances in betacyanin chemistry. *Natural Product Reports, 38*, 2315–2346. https://doi.org/10.1039/d1np00018g

Lock, M., Grubben, G. J. H. and Denton, O. A. (2004). Plant resources of tropical Africa 2. vegetables. *Kew Bulletin*, *59*(4), 650. https://doi.org/10.2307/4110929

Lystvan, K., Kumorkiewicz, A. and Szneler, E. (2018). Study on betalains in *Celosia cristata* Linn. callus culture and identification of new malonylated amaranthins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*, 3870–3879. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01014

Madadi, E., Mazloum-Ravasan, S., Yu, J. S., Ha, J. W., Hamishehkar, H. and Kim, K. H. (2020). Therapeutic application of betalains: A review. *Plants*, *9*(9), 1–27. https://doi.org/10.3390/plants9091219

Moreno, D. A., García-Viguera, C., Gil, J. I. and Gil-Izquierdo, A. (2008). Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochemistry Reviews*, *7*(2), 261–280. https://doi.org/10.1007/s11101-007-9084-y

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*, 473-497

Palada, M. C. and Crossman, S. M. A. (1999). Evaluation of tropical leaf vegetables in the Virgin Islands. *Perspectives on New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA*, 388–393. http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/pdf/v4-388.pdf

Ravichandran, R., Lashmanasamy, A., Vinayagam, A., Nair, A. and Tilton, F. (2021). Estimation of apoptosis-inducing compounds present in *Gomphrena globosa* by molecular docking. *BioScience and Biotechnology*, *10*, 1–8.

Smeriglio, A., Bonasera, S., Germanò, M. P., D'Angelo, V., Barreca, D., Denaro, M., Monforte, M. T., Galati, E. M. and Trombetta, D. (2019). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. fruit as source of betalains with antioxidant, cytoprotective, and anti-angiogenic properties. *Phytotherapy Research*, *33*(5), 1526–1537. https://doi.org/10.1002/ptr.6345

Strack, D., Vogt, T. and Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, *62*, 247–269. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2

Warhade, M. I. and Badere, R. S. (2018). *Fusarium oxysporum* cell elicitor enhances betalain content in the cell suspension culture of *Celosia cristata*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *24*(2), 285–293. https://doi.org/10.1007/s12298-018-0511-x

Winson, K., Chew, B. and Sathasivam, K. (2020). The establishment of callus and cell suspension cultures of *Hylocereus costaricensis* for the production of betalain pigments with antioxidant potential. *Industrial Crops and Products*, *155*, https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112750