

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิธีการผลิตสารประกอบอะชาติแรคตินซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มไตรเทอร์ปีนอยด์ที่พบในพืชกลุ่มสะเดาในตระกูล Meliaceae หลายชนิดโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์พืช เมื่อทำการพัฒนาเทคนิคทางโครมาโตกราฟฟีของเหลวที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดเฟสย้อนกลับ (RP-HPLC) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณอะชาติแรคตินชนิดต่าง ๆ ที่สะสมในเซลล์สะเดาข้างเพาะเลี้ยงได้ และทำการศึกษานิตขององค์ประกอบอาหารเพาะเลี้ยง สภาพการเพาะเลี้ยงตลอดจน การใช้สารเริ่มต้นทางวิธีการสังเคราะห์ (precursors) ตลอดจนอีลิซีเตอร์ (elicitors) บางชนิด เพื่อเพิ่มผลผลิตของมวลเซลล์และสารประกอบอะชาติแรคตินในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ชักนำจากใบของสะเดาข้าง พบว่า เซลล์สะเดาข้างเพาะเลี้ยงสามารถผลิตและสะสมอะชาติแรคติน A, B, H และ M ได้ เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งมีอัตราการเจริญ และผลผลิตของอะชาติแรคตินมวลรวมสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาพแขวนลอยในการเพาะเลี้ยงแบบขวดเขย่า เมื่อใช้อาหารสูตร MS เปรียบเทียบกับอาหารสูตร Gamborg-B5 และ LS เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาพแขวนลอยมีประสิทธิภาพการใช้ยูโครสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนได้ดีกว่ากลูโคสและเจริญในที่ที่มีแสงสว่าง 2,000 ลักซ์ ได้สูงกว่าในที่มืดเล็กน้อย อัตราส่วนของสารเร่งการเจริญ 2,4-D และ BA มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญของเซลล์สะเดาข้างเพาะเลี้ยงและผลผลิตรวม ตลอดจนองค์ประกอบของอะชาติแรคติน (A, B, H และ M) พบว่าเมื่ออายุของเซลล์แคลล์ที่ใช้เป็นแหล่งเริ่มต้นของเซลล์ในการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยสูงขึ้นจะมีผลในทางเพิ่มอัตราการเจริญ ผลผลิตและองค์ประกอบของสารกลุ่มอะชาติแรคตินรวม การเพาะเลี้ยงเซลล์สะเดาข้างที่มีการเติมสารประกอบ farnesyl pyrophosphate และ squalene เป็นสารตั้งต้นของวิธีการสังเคราะห์มีผลในการเพิ่มผลผลิตของอะชาติแรคติน เมื่อใช้ความเข้มข้นต่ำ ๆ สารสกัดจากยีสต์สามารถเพิ่มผลผลิตของอะชาติแรคตินรวมได้เล็กน้อย แต่เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงจะไปยับยั้งการเจริญและผลผลิตของอะชาติแรคตินอย่างชัดเจน การเพาะเลี้ยงเซลล์สะเดาข้างในระดับขวดเขย่าที่สภาวะมาตรฐานในอาหารเหลวสูตร MS เมื่อใช้ 30 เปอร์เซ็นต์ ยูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมด้วย 2,4-D และ BA 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยการให้แสง 2000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน จะให้เซลล์ที่มีการเจริญสูงสุดโดยมีระยะเวลาเพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 2 เท่า 2 วัน และสังเคราะห์อะชาติแรคติน A, B, H และ M 0.0017, 0.0017, 0.0014 และ 0.0016 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน โดยมีค่าผลผลิตโดยรวมของอะชาติแรคตินสูงที่สุด 0.0077 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงสะเดาข้างไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift ขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการให้อากาศ 0.25 vvm พบว่า เซลล์สามารถผลิตสารประกอบอะชาติแรคตินโดย มีระยะเวลาการเพิ่มจำนวน 2 เท่า เพียง 0.3 วัน ซึ่งมีการเจริญเร็วกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโดยอัตราการให้อากาศเป็น 0.50 vvm ถึง 4 เท่า ค่าผลผลิตของอะชาติแรคตินรวมสูงที่สุดมีค่าถึง 0.0175 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะขวดเขย่าถึง 2.5 เท่า เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดอะชาติแรคติน จากเซลล์เพาะเลี้ยงสะเดาข้างด้วยค่า LD_{50} ต่อนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) พบว่า มีค่าต่ำกว่าสารมาตรฐานอะชาติแรคติน A เล็กน้อย

Azadirachtins, a triterpenoids biopesticides obtained from several species of neem trees in the family Meliaceae, was subjected to study for production in plant cell culture. The reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) methods was developed to permit the rapid qualitative and quantitative analysis of various forms of azadirachtins in cell line of *Azadirachta excelsa*. Studies were carried out to evaluate the media and conditions optimization including precursors and elicitor manipulation for maximum biomass and production of azadirachtins. *Azadirachta excelsa* cell line which was established from leaves can produce azadirachtin A, B, H and M. Cells cultivated in solid medium produced higher growth rate and yielded of total azadirachtins in comparison cell suspension cultured in shake-flask condition using MS medium in comparison to Gamberg-B5 and LS medium. The higher biomass and total azadirachtins level was significantly shown when cultivated in MS medium using sucrose in comparison to glucose. The cell line of *A. excelsa* has slightly higher growth rate in the presence of white light. 2,4-Dichloroacetic acid (2,4-D) and benzyl adenine (BA) ratio also affects both rate of cell growth and yielded of azadirachtins accumulated in the cell cultured. Using higher age of stock callus starter to establish cell suspension produced higher cell biomass, growth rate and total azadirachtins. The total content of azadirachtins was partially stimulated by farnesyl pyrophosphate and squaline at lower concentration. Higher level of yeast extract supplemented to cultivation medium showed growth inhibitory effect and resulted to lower production of azadirachtins. The standard condition for cell suspension of *A. excelsa* cultivated in shake-flask was established in MS medium using 30% sucrose as carbon source supplemented with 1 mg/l of 2,4-D and 2 mg/l BA 200 rpm shaking frequency at 25 ± 2 °C under illumination of 2,000 luxes light produced cells with 2.00 days doubling time and 0.0017, 0.0017, 0.0014 and 0.0016 mg per liter per day of azadirachtin A, B, H and M respectively. The maximum productivity of total azadirachtin was 0.0077 mg/l/day. The cell line of *A. excelsa* cultivated in 2 liters Air-lift bioreactor under the establish conditions using 0.25 vvm aerate provided doubling time of 0.03 days which was higher than the results obtained using higher agitating productivity was found at 0.0175 mg/l/day which was over 2.5 fold increase over the shake-flask cultivation. The toxicity of crude azadirachtin when injected to *Plutella xylostella* demonstrated by LD₅₀ was found slightly lower than the valued of standard azadirachtin A.