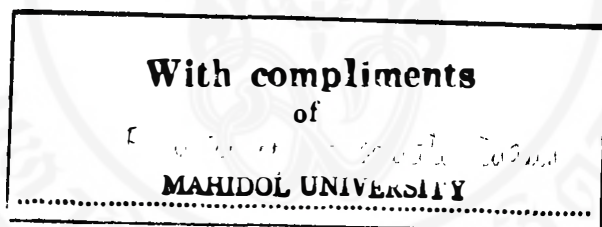




b1025.007

**PRODUCTION OF DIOSGENIN BY *IN VITRO* CULTURES OF
*MOMORDICA SP.***

SOMCHAI PANUWATSUK



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1998

ISBN 974-589-919-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

3636204 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORD : DIOSGENIN / *MOMORDICA CHARANTIA* L. / STEROIDAL
SAPONINS

SOMCHAI PANUWATSUK : PRODUCTION OF DIOSGENIN BY *IN VITRO* CULTURES OF *MOMORDICA SP.* THESIS ADVISOR : JARUNYA NARANGAJAVANA, D.Agr.Sc., SKORN MONGKOLSUK, Ph.D, HERVÉ CHRESTIN, Ph.D. 104 p. ISBN 974-589-919-4

The present study aims to investigate the potential of the Thai medicinal plants, focussing on *Momordica sp.*, to be used as the source for diosgenin production both direct and through the *in vitro* cultures. We had developed the small scale extraction method and established the TLC to examine the diosgenin content. The defatted acid hydrolysis method and the 2-D TLC technique were performed to examine the distribution of diosgenin in various genera. Several species of *Costus sp.*, *Dioscorea sp.*, *Tribullus sp.* and *Trigonella sp.* which are found in Thailand have also been investigated and were found to contained different amounts of diosgenin. The diosgenin content in fruit and seed of *M. charantia* cv. Chinese gourd were 1.02 mg/g and 0.48 mg/g dry wt., respectively. The diosgenin content in fruit and seed of *M. charantia* cv. Siamese gourd were 0.71 mg/g and 0.28 mg/g dry wt., respectively, while diosgenin was not produced on roots obtained from hydroponically grown *M. charantia* L., the *in vitro* root culture of cv. Chinese gourd and Siamese gourd were found to contain 3.97 and 5.02 mg/g dry wt., respectively. The potential of diosgenin production in *in vitro* cultures of the *M. charantia* L. cv. Chinese gourd and Siamese gourd had been investigated. High callus induction rates in both cultivars of were obtained from media containing 1 ppm of 2,4-D. The MS containing 1.0 ppm of BA was found to be suitable for multiple shoot induction; however, those shoots were unable to produce diosgenin. The formed callus at the base of shoots from both cultivars produced an interesting amount of diosgenin. The diosgenin production of cv. Chinese gourd callus culture was found to be synthesized at the level of 5.31 mg/g within 7 days after inoculation and gradually decreased. For the cultivar Siamese gourd, diosgenin synthesis started 21 days after inoculation and peaked sharply at level of 6.28 mg/g after 28 days. The present results suggest that the potential of diosgenin production by *in vitro* cultures of *Momordica sp.*, however, the further investigation should be focussed on improvement of culturing condition as well as diosgenin formation condition.

3636204 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สมชาย ภาณุวัฒน์สุข : การสร้างสารไดออกซิจีนินโดยเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของ *Momordica sp.*

(Production of diosgenin by *in vitro* cultures of *Momordica sp.*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : จริญญา

ณรงค์ชวณะ D. Agr. Sc., ศกรณ์ มงคลสุข Ph.D., แอร์เวย์ เกรสแดง Ph.D. 104 หน้า. 974-589-919-4

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสร้างสารไดออกซิจีนินโดยเซลล์เพาะเลี้ยงของพืชในกลุ่ม *Momordica* มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและวิเคราะห์พืชสมุนไพรของไทย ที่มีศักยภาพในการใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตสารไดออกซิจีนิน โดยมุ่งเน้นศึกษามะระ (*Momordica charantia* L.) 2 สายพันธุ์ คือ มะระจีน และมะระไทย (มะระจีน) ผู้วิจัยได้พัฒนาวิธีการสกัดแยกและตรวจสอบสารในกลุ่มสเตียรอยด์ซาโปนิน โดยทำให้สามารถตรวจสอบจากเนื้อเยื่อพืชปริมาณน้อย ๆ ระดับ 100 มิลลิกรัมได้ เริ่มต้นจากการสกัดเอาไขมันออก, ข่อยด้วยกรด, สกัดสารสเตียรอยด์ และวิเคราะห์ปริมาณโดยวิธี 2-dimensional TLC และ spectrophotometry เมื่อตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวในส่วนต่าง ๆ ของพืชสมุนไพรตัวอย่าง พบว่า พืชสมุนไพรจำพวกเอื้องหมายนา, หนามกระสุน, ลูกชัศ และมะระ มีปริมาณไดออกซิจีนิน ในระดับที่น่าสนใจ โดยเนื้อผล และเมล็ดของมะระจีน มีปริมาณไดออกซิจีนิน 1.02 และ 0.48 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้งตามลำดับ ในขณะที่เนื้อผลและเมล็ดของมะระไทย มีปริมาณ 0.71 และ 0.28 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้งโดยที่ไม่พบสารไดออกซิจีนินในส่วนราก ส่วนมะระจีนและมะระไทย ที่เจริญในอาหาร MS และ RT จะมีรากซึ่งสามารถสร้างสารไดออกซิจีนิน ได้สูงถึง 3.97 และ 5.02 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะระทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 ppm มีความเหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดแคลลัสของมะระทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วน BA ที่ความเข้มข้น 1.0 ppm ในสูตรอาหาร MS มีความเหมาะสมในการกระตุ้นให้เกิดยอดมากขึ้น และในกรณีหลังยังพบการเกิดแคลลัสอีกด้วย โดยแคลลัสจากมะระทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถสร้างสารไดออกซิจีนินได้ในปริมาณที่น่าสนใจ จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแคลลัสดังกล่าวเพื่อตรวจสอบศักยภาพในการผลิตสารไดออกซิจีนินพบว่า ในเนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของมะระจีนเริ่มสร้างสารได้ภายใน 7 วัน โดยสามารถสร้างสารนี้ได้สูงสุด 5.31 มิลลิกรัม/กรัม แล้วค่อย ๆ ลดลง ในขณะที่เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงของมะระไทย สามารถสร้างสารนี้ได้โดยมีปริมาณสูงสุดถึง 6.28 มิลลิกรัม/กรัม ภายในเวลา 28 วัน ผลการวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของการใช้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของมะระใน *in vitro* เพื่อการผลิตสารไดออกซิจีนิน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในทิศทางต่าง ๆ เพื่อผลักดันให้เกิดการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรไทยต่อไป