บทที่ 1
บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา

จิบเบอเรลลิน (gibberellin) เป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ค้นพบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ.1895 ว่าเป็นสารที่ทำให้เกิดโรคในต้นข้าวที่มีลักษณะลำต้นยืดยาวผิดปกติ สีเหลืองซีด และไม่สร้างเมล็ดในระยะเจริญพันธุ์หรือสร้างเพียงเล็กน้อย เกษตรกรชาวญี่ปุ่นเรียกโรคนี้ว่า บากานี (baganae) จากการตรวจเอกสารที่เกี่ยวกับจิบเบอเรลลิน พบว่ามีการศึกษามาอย่างต่อเนื่องโดยลำดับดังนี้

Hori (1898) ได้เผยแพร่ถึงสาเหตุของโรคบากานีว่าเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราสกุล *Fusarium sp.*

Kurosawa (1926) ศึกษาสาเหตุของโรคบากานีพบว่าเกิดจากเชื้อ *Gibberella fujikuroi* จะปล่อยสารพิษ (toxin) ชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์กระตุ้นการยืดยาวของพืช ยับยั้งการสร้างคลอโรฟิลล์ และการเจริญในส่วนของปลายราก

Yabuta (1934) สามารถแยกผลึกของสารชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จากน้ำหมักที่เลี้ยงเชื้อราที่แยกได้จากต้นข้าวที่เป็นโรคบากานีได้สำเร็จ และพบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของพืช จึงเรียกชื่อว่า กรดฟูซาริก (fusaric acid) มีโครงสร้างเป็น 5-เอ็น-บิวทิลพิโคลินิก แอซิด (5-n-butylpicolinic acid)

Yabuta (1935) ทำการปรับปรุงอาหารและสภาวะสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา และสามารถแยกของแข็งที่มีลักษณะไม่เป็นผลึกจากน้ำหมักของเชื้อราได้ และพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงจึงเรียกว่า จิบเบอเรลลิน (gibberellin)

Yabuta and Sumiki (1938) สามารถแยกผลึกของแข็งสีเหลืองซีด 2 ชนิด คือ จิบเบอเรลลิน เอ และ บี ต่อมาพบว่าจิบเบอเรลลิน เอ ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

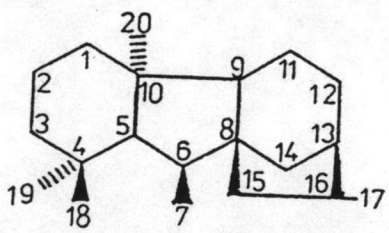
ภายหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 สิ้นสุดลงการศึกษาเกี่ยวกับจิบเบอเรลลินได้รับความสนใจทั้งในประเทศอังกฤษและสหรัฐอเมริกา จนกระทั่งในปี ค.ศ.1954 ที่ประเทศอังกฤษ คณะทำงานของบริษัท Imperial Chemical Industries Ltd.(ICI)ได้คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลิน และสามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงชนิดใหม่ แต่มี

สมบัติทางเคมี และทางกายภาพแตกต่างจากสารที่ได้จากการวิจัยในญี่ปุ่น จึงเรียกว่า กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) (Curtis and Cross,1954)

นับแต่ปี ค.ศ.1960 รายงานการค้นพบจิบเบอเรลลินทั้งจากพืชและเชื้อรา มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นโดยลำดับ ทำให้เกิดความสับสนในการเรียกชื่อ จึงได้กำหนดหมายเลขของจิบเบอเรลลินโดยเริ่มจาก $GA_1, GA_2, GA_3, .., GA_n$ (MacMillan and Takahashi,1968) จนกระทั่งปี ค.ศ.1989 มีรายงานว่าค้นพบจิบเบอเรลลินทั้งหมด 72 ชนิด (Brueckner et al. ,1989)

2. ชนิดและโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลินเป็นสารอินทรีย์กลุ่มไดเทอร์พีน (diterpene) ที่ประกอบด้วยไอโซพรีน (isoprene) 4 โมเลกุล มาเรียงเป็นโครงสร้าง 3 วง โครงสร้างนี้เรียกว่า ent-gibberellane ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของจิบเบอเรลลิน (Rowe, 1968) มีโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1 จิบเบอเรลลินหรือเรียกว่า GA ซึ่งมีหมายเลขกำกับตามลำดับการค้นพบคือ $GA_1, GA_2, GA_3, .., GA_n$ โดยแต่ละชนิดต่างกันที่ตำแหน่งของพันธะคู่ (double bond) และหมู่ไฮดรอกซี (hydroxy group) สำหรับจิบเบอเรลลินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงคือ GA_3 รองลงมาคือ GA_4 และ GA_7 นอกจากนี้ยังพบว่า GA_4 และ GA_7 เป็นสารตั้งต้นของ GA_3 ด้วย (Brueckner et al., 1989)



รูปที่ 1 โครงสร้างของ ent-gibberellane

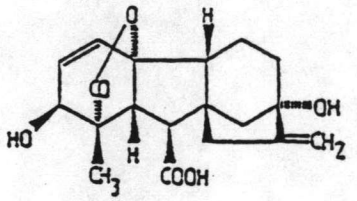
จิบเบอเรลลินแบ่งตามจำนวนอะตอมของธาตุคาร์บอนได้ 2 กลุ่ม

ก. กลุ่มที่มีคาร์บอน 20 อะตอม (C_{20}-gibberellin) เป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นไดเทอร์พีนที่สมบูรณ์

ข. กลุ่มที่มีคาร์บอน 19 อะตอม (C_{19}-gibberellin) เป็นกลุ่มที่ขาดคาร์บอนอะตอมที่ 20 เนื่องจากมีพันธะแลคโตนระหว่างคาร์บอนที่ 19 และ 10 (19,10-α-lactone

structure) และเป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง

จิบเบอเรลลินที่นิยมใช้ในทางเกษตรกรรมมากคือ GA_3 จากการศึกษาสมบัติของ GA_3 พบว่า มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทธานอล เมทธานอล เอทธิลอะซิเตต บิวทิลอะซิเตต ละลายได้ยากใน คลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และปิโตรเลียมอีเธอร์ (Yabuta and Hayashi, 1939) GA_3 ละลายในน้ำได้สูงสุด 5 กรัมต่อลิตร จิบเบอเรลลินจะเสถียรในสภาวะที่แห้งและสลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย โดยมีค่าครึ่งชีวิต 14 วัน และ 2 ชั่วโมง ที่ 20 และ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ (Palmer, 1971) GA_3 มีชื่อสามัญว่า กรดจิบเบอเรลลิก มีชื่อทางเคมีว่า ent-3α,10,13-trihydroxy-20-nor-gibberella-1(2),16(17)dien-7,19-dicarboxy-19,10-lactone มีโครงสร้างดังรูปที่ 2 สูตรโมเลกุล $C_{19}H_{22}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 346 จุดหลอมเหลว 234-236 องศาเซลเซียส เมื่อ GA_3 อยู่ในรูปสารละลายจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 3-4 (Bruckner et al., 1991)



รูปที่ 2 โครงสร้างของ GA_3

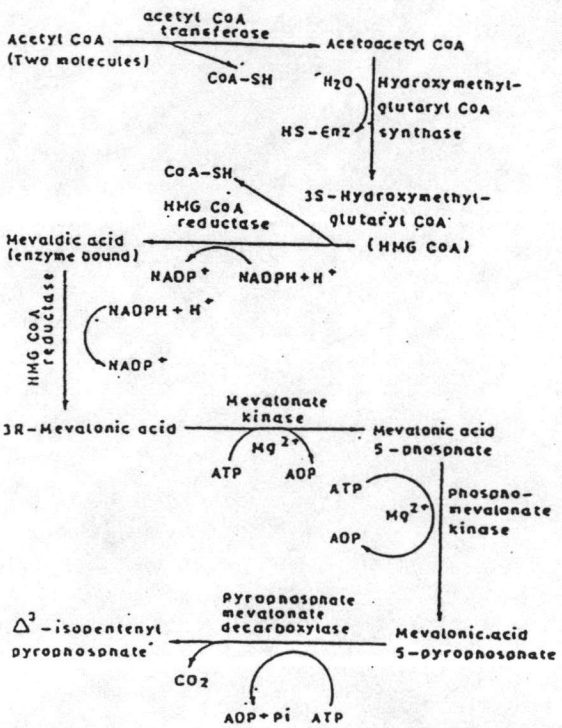
3. การสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน

การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินเกิดขึ้นโดยอาศัยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

3.1 การเกิดสารประกอบไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต (Isopentenyl pyrophosphate)

การสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน จะผ่านกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของสารไอโซพรีนอยด์(isoprenoid biosynthesis pathway) เริ่มจากการเปลี่ยนแปลงของกรดเมวาโลนิก(mevalonic acid) ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของอะเซทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl co A) 2 โมเลกุล โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคเอนไซม์เอทราน

สเฟอเรส(acetyl coA transferase) เกิดเป็นสารประกอบอะซิโตอะเซติลโคเอนไซม์เอ (acetoacetyl coA) (Birch et al.,1975) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไฮดรอกซีเมทธิลกลูตามิลโคเอนไซม์เอ (hydroxymethyl glutamyl coA ,HMG coA) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทธิลกลูตามิลโคเอนไซม์เอซินเทส (HMG coA synthase) จากนั้นเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทธิลกลูตามิลโคเอนไซม์เอรีดักเทส(HMG coA reducthase) จะเร่งให้มีการสร้างกรดเมวาโลนิกผ่านกรดเมวาลดิก(mevaldic acid) ดังแสดงในรูปที่ 3 จากนั้นกรดเมวาโลนิกจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดเมวาโลนิก-5-ฟอสเฟต (mevalonic acid-5-phosphate) และกรดเมวาโลนิก-5-ไพโรฟอสเฟต (mevalonic acid-5-pyrophosphate) โดยการทำงานของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนส (mevalonate kinase) และฟอสโฟเมวาโลเนทไคเนส (phosphomevalonate kinase) ตามลำดับ (Birch et al., 1975) จากนั้นเอนไซม์ไพโรฟอสเฟตเมวาโลเนทดีคาร์บอกซิลเลส (pyrophosphate mevalonate decarboxylase) จะเปลี่ยนกรดเมวาโลนิก-5-ไพโรฟอสเฟต ไปเป็นไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต($\triangle$ 3-isopentenyl pyrophosphate,IPP) (Kumar and Lonsane,1989)

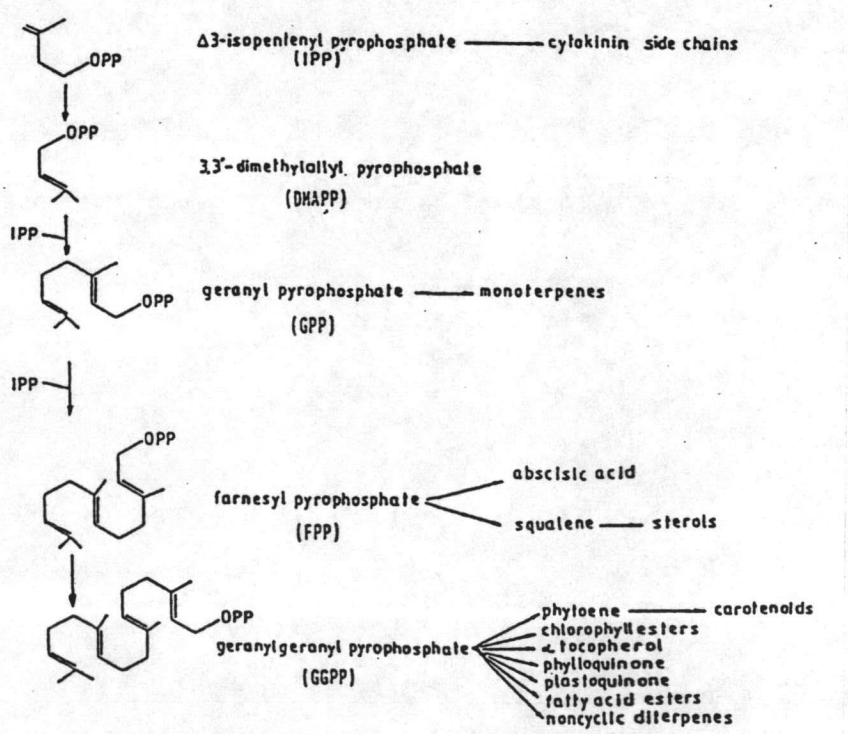


รูปที่ 3 ขั้นตอนการสร้างไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟตจากอะเซทิลโคเอนไซม์เอ

ที่มา : Kumar and Lonesane(1989)

3.2 การสังเคราะห์เทอร์พีนและเทอร์พีนนอยด์ (Terpene and terpenoid biosynthesis)

IPP เป็นสารตั้งต้นที่สามารถจะเปลี่ยนเป็นเทอร์พีน และเทอร์พีนนอยด์ได้ โดย IPP จะถูกเปลี่ยนเป็นไดเมทธิลอัลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethyl-allyl pyrophos phate, DMAPP) ด้วยเอนไซม์ซัลไฮดริล(sulhydryl enzyme) ที่ชื่อ ไอพีพีไอโซเมอเรส (IPP isomerase) จากนั้น DMAPP จะรวมตัวกับ IPP โดยการทำงานของเอนไซม์พีนิล ไพโรฟอสเฟต (phenyl pyrophosphate) ได้เป็นเจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranyl pyrophosphate,GPP) ซึ่งเป็นโมโนเทอร์พีน (monoterpene) ตัวแรกที่มีคาร์บอนเป็น โครงสร้าง 10 อะตอม GPP สามารถรวมตัวกับ IPP เกิดเป็นฟาร์เนซิล ไพโรฟอสเฟต (farnesyl pyrophosphate, FPP) ซึ่งเป็นสารที่มีคาร์บอนเป็นโครงสร้าง 15 อะตอม และเปลี่ยนต่อไปเป็น เจอรานิล เจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranyl geranyl pyrophos phate,GGPP) ซึ่งมีคาร์บอนในโครงสร้าง 20 อะตอม (Kumar and Lonsane,1989) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 ขั้นตอนการสังเคราะห์เทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์

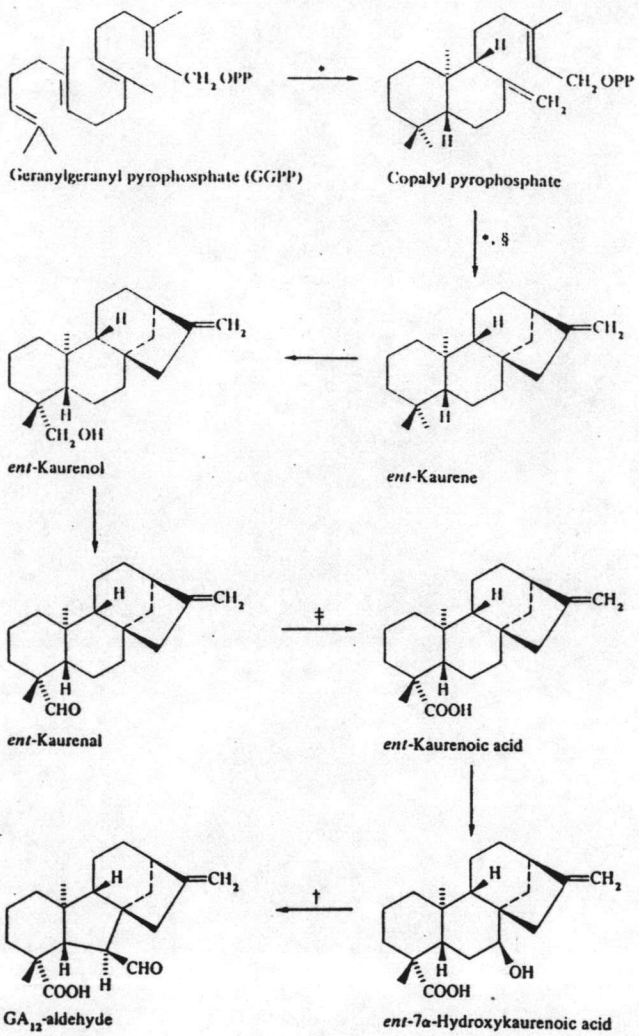
ที่มา : Brueckner et al. (1989)

3.3 การสังเคราะห์เอนท์-คอรีน(Ent-kaurene biosynthesis)

การเกิดวงแหวนของเอนท์คอรีน เริ่มจาก GGPP ถูกเปลี่ยนเป็นโคพาลีลไพโรฟอสเฟต(copalyl pyrophosphate)โดยการเกิดอิเลคโตรฟิลิค(electrophillic) ที่ตำแหน่ง C-14 ของเจอรานิล เจอรานิลไพโรฟอสเฟต พร้อมกันแยกไพโรฟอสเฟต อิออน (pyrophosphate ion) ออกไป โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ อีแนนทิโอเมอร์-คอรีนซินเทส(ent-kaurene synthase)จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของหมู่เมทธิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 19 กลายเป็นโครงสร้าง อีแนนทิโอเมอร์-คอรีนอล (ent-kaurenol) , อีแนนทิโอเมอร์-คอรีนาล (ent-kaurnal) และอีแนนทิโอเมอร์-คอรีโนอิกเอซิด (ent-kaurenoic acid) ตามลำดับ (Shechter and West,1969) หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิลเลชั่นที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 ได้สารประกอบที่เรียกว่าอีแนนทิโอเมอร์-บีตา-ไฮดรอกซีคอรีโนอิกเอซิด (ent-7-β - hydroxykaurenoic acid) (West, 1973 ; Bearder et al., 1975) ดังแสดงในรูปที่ 5 และพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ในการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนของ อีแนนทิโอเมอร์-คอรีน จนได้เป็น อีแนนทิโอเมอร์-7-บีตา-ไฮดรอกซีคอรีโนอิกเอซิด นั้นอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ไมโครโซมอล โมโนออกซีจีเนส (microsomal monooxygenase) เอนไซม์นี้ต้องการ NADP เป็นโคเฟคเตอร์ (cofactor) และมีไซโตโครม พี-450(cytochrome P-450) ร่วมด้วย (Graebe,1987) นอกจากนี้ยังพบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเปลี่ยน อีแนนทิโอเมอร์-คอรีน ไปเป็น อีแนนทิโอเมอร์-คอรีนอล และอีแนนทิโอเมอร์-คอรีนาล ไปเป็นเอนท์-คอรีโนอิกเอซิด จะถูกยับยั้งการทำงานด้วยคาร์บอนโมโน (carbon monoxide) (Murphy and West, 1969)

3.4 การสังเคราะห์ GA_{12}-อัลดีไฮด์ (GA_{12}-aldehyde biosynthesis)

อีแนนทิโอเมอร์-7-บีตา-ไฮดรอกซีคอรีโนอิกเอซิด ซึ่งเป็นโครงสร้างวงแหวน 3 วง เรียงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่วงแหวน บี(ring B) โดยการลดจำนวนคาร์บอนอะตอมลงเหลือ 5 อะตอม กลายเป็นวงแหวน 5 เหลี่ยม โดยที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 กลายเป็นหมู่อัลดีไฮด์ ดังนั้นคาร์บอนอะตอมที่ตำแหน่ง 6 และ 8 จะเกิดพันธะที่ต่อวงแหวนเข้าด้วยกันอีกครั้งเกิดเป็นจิบเบอเรลลิน-12-อัลดีไฮด์ (GA_{12}-aldehyde) (Birch et al., 1975)



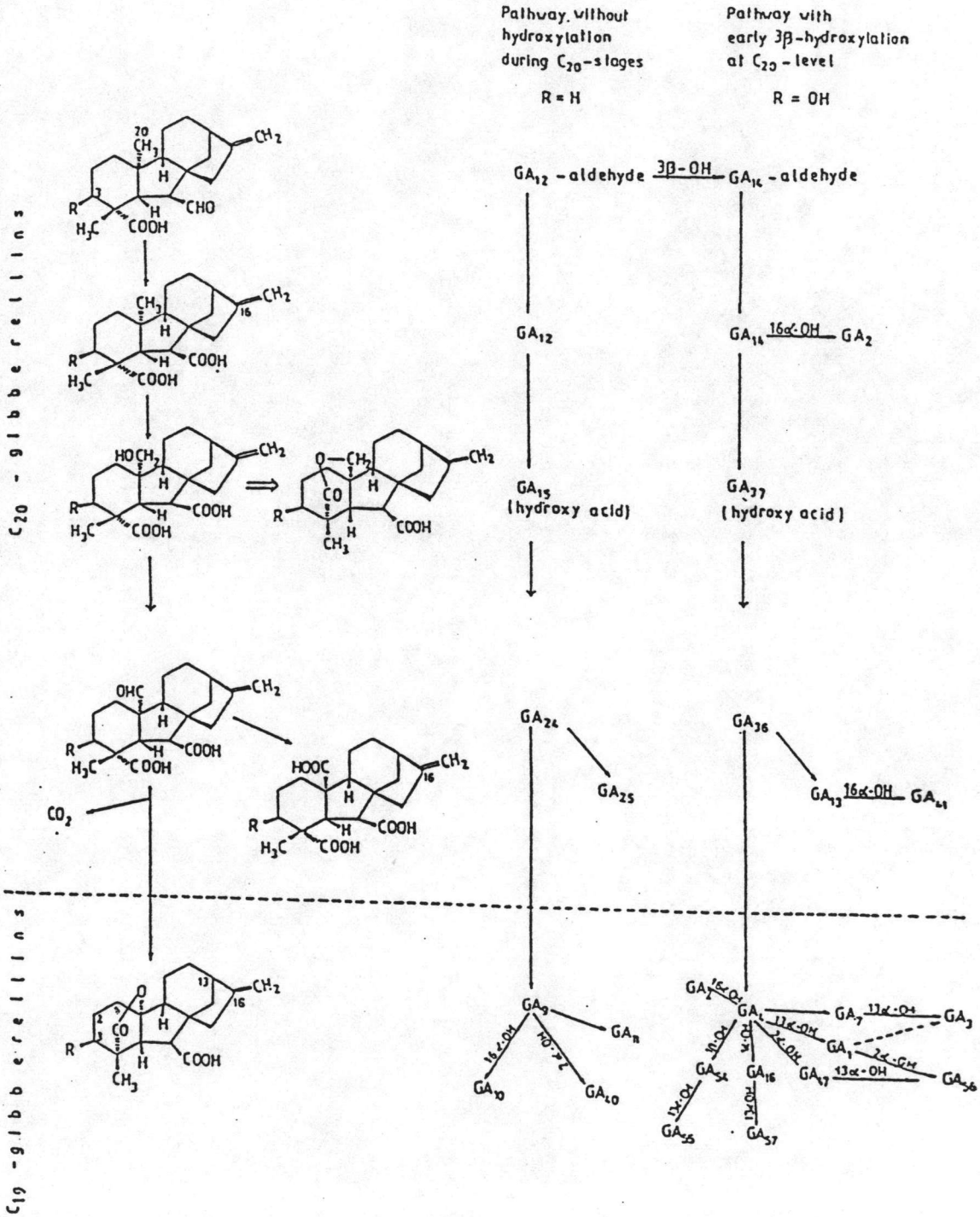
รูปที่ 5 ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงจาก ent-kaurene ไปเป็น GA_{12}-aldehyde
ที่มา : Brueckner et al. (1989)

GA_{12}-aldehyde เป็นสารประกอบตัวแรกที่มีโครงสร้างแบบเอนท์-จิบเบอเรลแลน (ent-gibberellane) จะเป็นสารเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆ โดยผ่านกระบวนการที่แยกเป็น 2 ทาง ดังแสดงในรูปที่ 5 ทางที่หนึ่งคือ กระบวนการสังเคราะห์ที่ไม่ผ่านปฏิกิริยา 3-บีตา-ไฮดรอกซีเลชั่น (non-3-β-hydroxylation) ซึ่งได้จิบเบอเรลลินที่มี 20 คาร์บอนอะตอม เช่น GA_{15} GA_{24} และ จิบเบอเรลลินที่มี 19 คาร์บอนอะตอม คือ GA_9 ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น GA_{10} GA_{11} และ GA_{40} ทางที่สองคือการสังเคราะห์ที่ผ่านปฏิกิริยา 3-บีตา-ไฮดรอกซีเลชั่น (3-β-hydroxyation)ได้ GA_{14} -

aldehyde และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น GA_{14} GA_{37} GA_{36} ดังแสดงในรูปที่ 6 และเมื่อจำนวนคาร์บอนลดลงหนึ่งอะตอมเหลือคาร์บอน 19 อะตอม จะเกิดเป็น GA_4 การเกิดทรานสฟอร์เมชั่นของจิบเบอเรลลินที่มีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอมจะเป็นปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 เริ่มจากหมู่-CH_3 ถูกออกซิไดซ์เป็นหมู่-CH_2OH -CHO และ -COOH ตามลำดับ ปฏิกิริยานี้อาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2-ออกโซกลูตาเรต-ดีเพนเด็นท์-ไดออกโซจีเนส (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase) การเปลี่ยนแปลงจากจิบเบอเรลลินที่มีจำนวนคาร์บอน 20 อะตอม ไปเป็นจิบเบอเรลลินที่มีคาร์บอน 19 อะตอม โดยการกำจัดคาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ออกไปเป็น CO_2 พร้อมกับการสร้างพันธะแกมม่า-แลคโตน(γ-lactone) ในวง A จะเกิดขึ้นในช่วงเดียวกับการออกซิไดซ์หมู่อัลดีไฮด์(-CHO) เป็นหมู่คาร์บอกซิล(-COOH) เกิดชนิดของจิบเบอเรลลินที่ภายในโครงสร้างมีไตรคาร์บอกซิลิก(tricarboxylic acid)คือ GA_{13} GA_{25} และ GA_{41} ซึ่งจิบเบอเรลลินกลุ่มนี้จะไม่เปลี่ยนเป็นจิบเบอเรลลินที่มีจำนวนคาร์บอน 19 อะตอมอีกต่อไป (Brueckner et al., 1989)

ผลิตภัณฑ์หลักของการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินในเชื้อ *Gibberella fujikuroi* คือ GA_3 ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลง GA_4 ไปเป็น GA_7 โดยปฏิกิริยา 1-2-ดีไฮโดรจีเนชั่น (1,2-dehydrogenation) แล้ว GA_7 เกิดปฏิกิริยา 13-ไฮดรอกซีเลชั่น (13-hydroxylation) ได้เป็น GA_3 การสร้าง GA_3 ผ่านทาง GA_1 มีน้อยอาจเนื่องจากความไม่จำเพาะของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส ส่วนในเชื้อ *Sphaceloma manihoticola* พบว่าผลิตภัณฑ์หลักคือ GA_4 ไม่มีการสร้าง GA_1 GA_3 และ GA_7 ขณะที่ในเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* พบว่า GA_4 จะเกิดปฏิกิริยา 13-ไฮดรอกซีเลชั่น เป็นส่วนใหญ่ ทำให้เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังนี้ เมื่อเกิดไฮดรอกซีเลชั่นที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่ง 1 10 และ 20 จะได้ GA_{54} GA_{16} และ GA_{47} ตามลำดับ จากนั้นเกิด 13-ไฮดรอกซีเลชั่น ต่อได้ GA_{55} GA_{57} และ GA_{56} ตามลำดับ ดังที่แสดงในรูปที่ 5 (Brueckner et al., 1989)

จำนวนและชนิดของจิบเบอเรลลินที่สร้างจากเชื้อราขึ้นกับโครงสร้างของจีน(gene) ของแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อและสภาวะในการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้การศึกษากลไกการสังเคราะห์และการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตจิบเบอเรลลินในเชื้อรายังมีน้อย เมื่อเทียบกับการศึกษาในพืชชั้นสูง(Grabe, 1987 ; Sembdner et al., 1987)



รูปที่ 6 ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง GA_{12}-aldehyde เพื่อการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน

ที่มา : Bruckner and et al. (1989)

4. การผลิตจิบเบอเรลลิน

สำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินมีการศึกษาแนวทางและวิธีการผลิต ซึ่งอาจจะแบ่งออกเป็น 3 วิธีการ คือ

4.1 การสกัดจากพืช พบว่ามีรายงานการค้นพบจิบเบอเรลลินครั้งแรกในพืชชั้นสูง (West and Phinney, 1956) ต่อมาได้มีการสกัดจิบเบอเรลลินจากเมล็ดพืชหลายชนิด เช่น พืชตระกูลแตง(cucurbit): *Sechium edule* , *Cucumis melo* ; เมล็ดอ่อนของถั่วฝักยาว (runner bean) : *Phaesolus coccnieus* , *Phaseolus multiflorus* (Hemphill et al., 1972 ; Albone et al., 1984) สารจิบเบอเรลลินที่พบส่วนใหญ่จะจับกับสารประกอบอื่นมากกว่ารูปจิบเบอเรลลินอิสระ (Russell, 1975) นอกจากนี้ยังพบว่าพืชมีจิบเบอเรลลินในปริมาณต่ำ โดยเฉพาะในส่วนของลำต้น พบว่ามีปริมาณต่ำประมาณ 2-3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด เมื่อเทียบกับในส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์เช่นเกสรตัวผู้และเมล็ดแก่ของพืช จะมีปริมาณสูงกว่าประมาณ 10-100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด(Graebe and Ropers, 1978) อีกทั้งการสกัดจากพืชเป็นการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่สิ้นเปลืองและเสียคุณค่าทางเศรษฐกิจ นับว่าเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมในการผลิตเพื่อการค้า

4.2 การสังเคราะห์ทางเคมี พบว่ามีการใช้ 2- อัลลีออกซีอนิโซล (2-ally oxyanisole) และ 4-เบนซิลออกซีไซโคลเฮกซาโนน(4-benzyloxy-cyclohexanone) เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน แต่ผลผลิตที่ได้ไม่คงที่ และสารตั้งต้นมีราคาแพงกว่าเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการผลิตด้วยกระบวนการหมัก (Corey et al., 1978)

4.3 การหมักด้วยจุลินทรีย์ โดยมุ่งความสนใจการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตจิบเบอเรลลิน โดยในปี ค.ศ.1955 คณะทำงานของบริษัท ICI ทำการทดสอบและแยกเชื้อราจากพืชหลายชนิด พบว่าเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ให้ผลผลิตจิบเบอเรลลินสูง (Borrow et al., 1955) ต่อมาปี ค.ศ.1957 Curtis ศึกษาหาเชื้อราและแอคติโนมัยซีส (Actinomycetes) ที่มีความสามารถผลิตจิบเบอเรลลิน และพบว่าเชื้อ *Gibberella fujikuroi* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลินสูง

ปัจจุบันจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับอุตสาหกรรม คือ เชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ซึ่งเป็นระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ(perfect stage)ของ *Fusarium moniliforme* ซึ่งเป็นเชื้อราชนิดเดียวกันแต่อยู่ในระยะที่ไม่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (imperfect stage)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน

5.1 หัวเชื้อสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน

หัวเชื้อที่มีคุณภาพและปริมาณที่เหมาะสม ทำให้ผลการผลิตจิบเบอเรลลินได้ดีขึ้น จากการรายงานของ Gancheva and Dimova (1984) กล่าวว่า อายุและปริมาณหัวเชื้อของ *G. fujikuroi* มีผลต่อกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยหัวเชื้อที่มีอายุ 48 ชั่วโมง อันเป็นช่วงที่เส้นใยมีการเจริญอย่างช้า จะให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้หัวเชื้อที่มีอายุสูง ซึ่งเส้นใยจะแตกหักและเกิดการย่อยสลาย (autolysis) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลิน ขณะที่รายงานของวันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(2532) พบว่า อายุของหัวเชื้อของ *G. fujikuroi* C ที่มีอายุ 72 ชั่วโมง และใช้ปริมาตรหัวเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 ซึ่งแตกต่างกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) ที่พบว่า อายุหัวเชื้อของ *G. fujikuroi* F4W-6(9) ที่มีอายุ 60 ชั่วโมง เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

5.2 ปัจจัยของสารอาหาร

การสังเคราะห์สารเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ(secondary metabolite) นอกจากจะขึ้นกับชีวมวล (biomass) ยังขึ้นกับองค์ประกอบและปริมาณสารอาหารที่จะใช้ในการเจริญ และการสร้างผลิตภัณฑ์ (Brueckner et al., 1989) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ดังนี้

5.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการผลิตจิบเบอเรลลิน คือ กลูโคส และซูโครส นอกจากนี้ยังมีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจะพบว่ามีการใช้แหล่งคาร์บอน สายพันธุ์เชื้อ และวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ที่แตกต่างกัน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพที่มีต่อการผลิต GA_3 ได้ จากรายงานของ Borrow et al.(1964) กล่าวว่า การใช้กลูโคสเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 20 ขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ผลผลิตจิบเบอเรลลินลดลง ต่อมาจึงมีการแก้ปัญหาผลของน้ำตาลที่มีต่อการยับยั้งการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยการเติมน้ำตาลลงไปเป็นช่วงๆ ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งจะ

ตารางที่ 1 สภาวะการหมัก การใช้สารแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ระยะเวลาหมัก และปริมาณ GA_3 ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์จุลินทรีย์	สภาวะของการหมัก	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3	ระยะเวลาหมัก (วัน)	ปริมาณ GA_3 (มก.ต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
F. moniliforme 917	ระดับขวดเขย่า	กลีเซอรอล กลูโคส แลคโตส	น้ำแช่ข้าวโพด แอมโมเนียมซัลเฟต	**	7	805	Darken et al. (1955)
G. fujikuroi	ระดับขวดเขย่า	กลูโคส	แอมโมเนียมซัลเฟต	**	20	1002	Borrow et al. (1959)
G. fujikuroi C	ระดับขวดเขย่า	กลูโคส แป้งมันสำปะหลัง	แอมโมเนียมซัลเฟต,กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้ว	HPLC		685	วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532)
G. fujikuroi C	ระดับถังหมัก 5 ลิตร	ซูโครส	แอมโมเนียมซัลเฟต,กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้ว	HPLC	14.5	1023	อรไท สุขเจริญ (2533)
G. fujikuroi 567	ระดับขวดเขย่า	น้ำมันดอกทานตะวัน	แอมโมเนียมซัลเฟต	fluorometric	10	1200	Bruckner et al. (1991)
G. fujikuroi F4W-6(9)	ระดับถังหมัก 5 ลิตร	ซูโครส, น้ำมันถั่วเหลือง	แอมโมเนียมซัลเฟต,กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้ว	HPLC	12	1362	อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536)

** ไม่ได้ระบุวิธีการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3

รักษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าร้อยละ 4 (GB Patent.783, 611 ; US Patent.1,906,671 ; US Patent.2,906,670) ยังมีรายงานว่า การใช้สารพวกโพลีแซคคาร์ไรด์(polysaccharide) เช่น แป้งและกากเมล็ดพืช (Fuska et al. , 1961 ; GB Patent. 839,652) หรืออาจใช้แหล่งคาร์บอนผสมระหว่างชนิดที่นำไปใช้ได้ง่ายร่วมกับชนิดที่นำไปใช้ได้ยาก เช่น การใช้กลีเซอรอลต่อกลูโคสต่อแลคโทสในอัตราส่วน 20 ต่อ 10 ต่อ 20 กรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน(Darken et al.,1959) นอกจากนี้ Muromtsev et al. (1968) กล่าวว่า น้ำมันพืชและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตจิบเบอเรลลิน เนื่องจากเมื่อน้ำมันพืชหรือกรดไขมันถูกใช้ในขบวนการเมตาโบลิสมของไขมัน โดยปฏิกิริยาบีตา ออกซิเดชั่น (beta-oxidation) จะให้อะซิทิลโคเอ (acetyl Co A) มากกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และอะซิทิลโคเอนี้ จะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลิน

5.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อ และการผลิตจิบเบอเรลลิน Borrow et al. (1964) กล่าวว่า การสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน เริ่มขึ้นเมื่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมด สำหรับกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินนั้น ชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญยิ่ง และมีการใช้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยทั่วไปแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต นอกจากนี้ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(2532) พบว่า การใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ทดแทนสารสกัดของยีสต์ (yeast extract) เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 อีกทั้งยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตด้วย

5.3 ปัจจัยทางกายภาพ

ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน พบว่าอิทธิพลของค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิระหว่างการหมัก อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน (Jefferys, 1970)

5.3.1 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน จากรายงานของ Stodola et al. (1955) พบว่า ค่าความ

เป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.8 เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 โดย *F. moniliforme* NRRL 2284 ขณะที่รายงานของวันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(2532) พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 7.0 เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ C ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ที่ศึกษากับสายพันธุ์ F4W-6(9) ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *G. fujikuroi* C นอกจากนี้ อรไท สุขเจริญ (2533) พบว่า การไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก ให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าการหมักที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

5.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ ซึ่งมีรายงานการใช้อุณหภูมิไว้ช่วงกว้าง เช่นจากรายงานของ Stodola et al. (1955) พบว่าอุณหภูมิระหว่างการหมักที่ 25 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน โดย *F. moniliforme* NRRL 2284 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อรไท สุขเจริญ (2533) ที่ศึกษากับ *G. fujikuroi* C แต่แตกต่างกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) ที่พบว่าอุณหภูมิระหว่าง 28 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* F4W-6(9) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการควบคุมอุณหภูมิเป็น 2 ระยะ ในการผลิตจิบเบอเรลลิน คือระยะสำหรับการเจริญของเชื้อใช้อุณหภูมิที่ 31-32 องศาเซลเซียส และระยะที่ผลิตจิบเบอเรลลินใช้อุณหภูมิที่ 29 องศาเซลเซียส (Jefferys,1970)

5.3.3 อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน

ขบวนการชีวสังเคราะห์(biosynthesis pathway) ของจิบเบอเรลลินจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ดังนั้นประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนในกระบวนการจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ ถ้าปริมาณออกซิเจนที่ให้ต่ำหรือเกิดสภาพที่ออกซิเจนไม่เพียงพอ จะมีผลให้ผลผลิตจิบเบอเรลลินลดลง(Geissman et al., 1960) จากรายงานของ Stodola et al. (1955) พบว่าสภาวะการให้อากาศที่ 0.25 vvm และอัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 300 แกลลอน เหมาะสมสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน โดย *F. moniliforme* NRRL 2284 ขณะที่รายงานของ อรไท สุขเจริญ(2533) พบว่าอัตราการให้อากาศ 1 vvm อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* C ในถัง

หมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของอัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) เมื่อใช้สภาวะดังกล่าวกับเชื้อ *G. fujikuroi* F4W-6(9) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

6. เหตุจูงใจในการวิจัย

จิบเบอเรลลินเป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง มีบทบาทในการช่วยเร่งการเจริญเติบโตของพืช เร่งการออกดอก ช่วยการติดผลทำลายระยะพักตัวของเมล็ด กระตุ้นการงอกของเมล็ด นอกจากนี้จิบเบอเรลลินยังช่วยให้มีการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยใช้ในการผลิตพืชนอกฤดู และผลิตพืชที่มีคุณภาพและปริมาณตามความต้องการของตลาด ทำให้ความต้องการจิบเบอเรลลินของเกษตรกรมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่เนื่องจากจิบเบอเรลลินเป็นสารเคมีที่มีราคาแพง ขณะที่ประเทศไทยยังไม่มีการผลิตขึ้นใช้เอง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงควรที่จะมีการศึกษาแนวทางการผลิตจิบเบอเรลลินเพื่อใช้ภายในประเทศเอง อันจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรที่จะได้ใช้จิบเบอเรลลินอย่างกว้างขวางและราคาถูกลง ดังนั้นสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตจิบเบอเรลลินมาอย่างต่อเนื่องโดยลำดับคือ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(2532) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลิน ในระดับขวดเขย่า ต่อมา อรไท สุขเจริญ (2533) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลินในถังหมักขนาด 5 ลิตร นอกจากนี้ในปี พ.ศ.2533 ได้เริ่มปรับปรุงสายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi* โดยนักวิจัยของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และได้สายพันธุ์ F4W-6(9) ซึ่งต่อมาได้ใช้สายพันธุ์นี้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลินในขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ต่อมาในปี พ.ศ.2534 ได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ โดยจันทร์ธิรา ล้ภยพร(2536) และได้สายพันธุ์ N6-3 N7-54 และ N9-34 ที่ให้ผลผลิตจิบเบอเรลลินสูงขึ้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จะดำเนินต่อเนื่องจากงานวิจัยของ จันทร์ธิรา ล้ภยพร(2536) โดยจะนำสายพันธุ์ดังกล่าว มาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางการผลิตในระดับขยายส่วนและระดับอุตสาหกรรมต่อไป

7. ขั้นตอนการวิจัย

7.1 คัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อ *G. fujikuroi* ที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต และเอ็นทีจี ที่ผ่านการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิมาแล้ว จากจำนวน 3 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA_3 สูง โดยทำการศึกษาในระดับขวดเขย่า

7.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ด้วยสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อ *G. fujikuroi* ในระดับขวดเขย่า โดยนำสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุดจากข้อ 7.1 มาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดยมีปัจจัยที่จะศึกษาดังนี้

7.2.1 ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

7.2.2 ปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม

7.2.3 ปริมาณของฟอสฟอรัส แมกนีเซียม อะลูมิเนียมออกไซด์ที่เหมาะสม

7.2.4 อายุของหัวเชื้อที่เหมาะสม

7.2.5 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.2.6 อุณหภูมิระหว่างการหมักที่เหมาะสม

7.2.7 การหาปริมาณที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว

7.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ด้วยสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อ *G. fujikuroi* ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยนำสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 7.2 มาใช้ ซึ่งมีปัจจัยที่จะศึกษาดังนี้

7.3.1 อัตราการให้อากาศ

7.3.2 อัตราการกวน

7.3.3 อัตราการป้อนแหล่งคาร์บอน