บทที่ 1

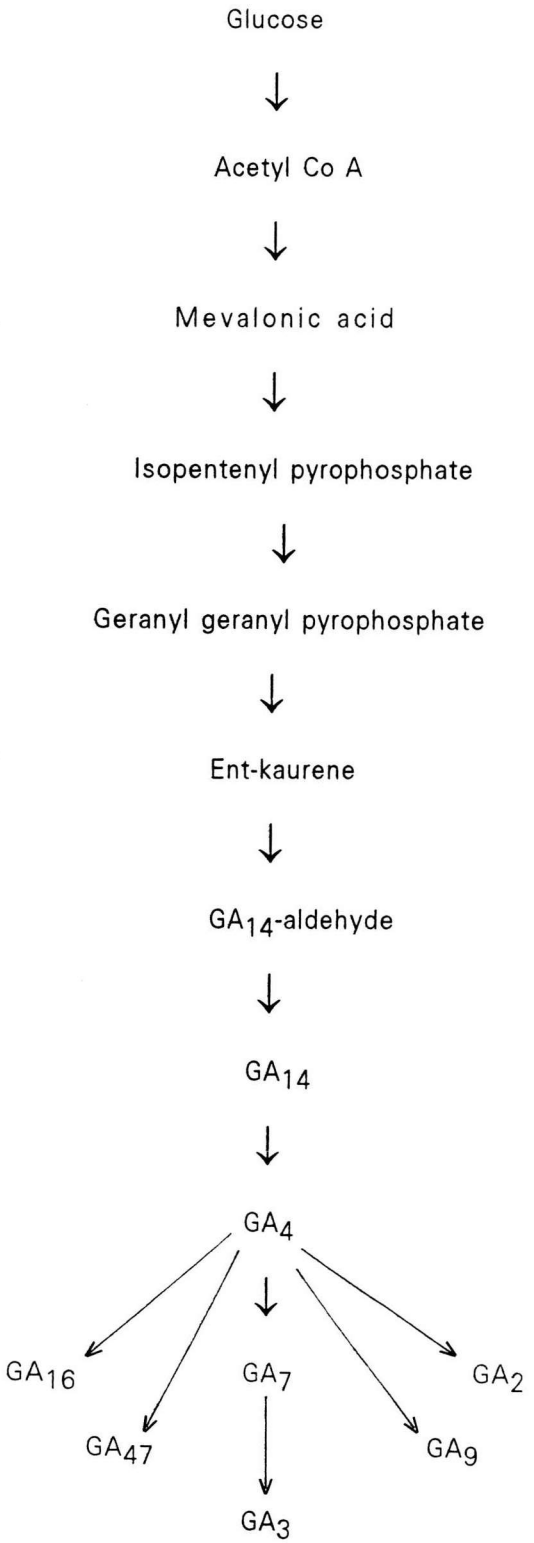
บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา

จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) เป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ค้นพบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ.1898 โดยเป็นสารที่ทำให้เกิดโรคแก่ต้นข้าวที่เรียกว่า บากานี(baganae) โรคดังกล่าวทำให้ต้นข้าวยืดยาวผิดปกติ และไม่สร้างเมล็ดในระยะเจริญพันธุ์หรือสร้างเพียงเล็กน้อย (Hori,1898 cited by Bruckner and Blechschmidt, 1991) ต่อมาในปี ค.ศ.1926 ได้ศึกษาสาเหตุของโรคบากานีว่าเกิดจากเชื้อ *Gibberella fujikuroi* ปล่อยสารพิษ(toxin)ชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์กระตุ้นการยืดยาวของพืชยับยั้งการสร้างคลอโรฟิลล์ และการเจริญในส่วนปลายราก(Korosawa,1926 cited by Bruckner and Blechschmidt, 1991) จนกระทั่งปี ค.ศ.1938 Yabuta และ Sumiki ได้แยกผลึกของแข็งเป็นจิบเบอเรลลินเอและจิบเบลเรลลินบี หลังจากสิ้นสุดสงครามโลกครั้งที่ 2 การศึกษา เกี่ยวกับจิบเบอเรลลินก็ได้เริ่มขึ้นในประเทศอังกฤษ โดยบริษัท ICI ได้คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลิน และสามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงชนิดใหม่ แต่มีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพแตกต่างจากสารที่รายงานจากประเทศญี่ปุ่น จึงเรียกว่ากรดจิบเบอเรลลิก(gibberellic acid, GA_3) (Curtis and Cross, 1954 cited by Bruckner and Blechschmidt, 1991)

นับตั้งแต่ปี ค.ศ.1960 รายงานการค้นพบจิบเบอเรลลินทั้งจากพืชและจุลินทรีย์มีมากขึ้น จะพบฮอร์โมนจิบเบอเรลลินได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง และยังพบฮอร์โมนจิบเบอ

เรลลินในพืชชั้นต่ำคือ *Psilotum nudum* และ *Lygodium japonicum* (Takahashi et al.,1986; Yamane et al., 1988 cited by Stephen and Ronald,1990) ซึ่งในพืชส่วนมากจะมีปริมาณ GA_3 0.001-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักสดพืช (Lonsane and Kumar, 1991) ส่วนในจุลินทรีย์นอกจากพบใน *G. fujikuroi* แล้วยังพบใน *Sphaceloma manihoticola, Neurospora crassa* ซึ่งจะพบว่า *Neurospora crassa* จะผลิต GA_3 ไว้ในเซลล์ ส่วน *G. Fujikuroi* และ *Sphaceloma manihoticola* จะปล่อย GA_3 ออกนอกเซลล์ (Kawanabe et al., 1983) นอกจากนี้จิบเบอเรลลินยังได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี มีรายงานว่ามีการใช้ 2-อัลลีออกซีอนิโซล(2-allyoxyanisole) และ 4-เบนซิลออกซีไซโคลเฮกซาโนน (4-benzyloxycyclohexanone) เป็นสารตั้งต้นในการผลิต แต่ผลผลิตที่ได้ไม่คงที่และสารตั้งต้นมีราคาแพงกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าใช้จ่ายในการผลิตด้วยกระบวนการหมัก (Corey and Danheiser,1978) เมื่อชนิดของจิบเบอเรลลินมีจำนวนมากขึ้นทำให้สับสนในการเรียกชื่อ จึงได้กำหนดหมายเลขของจิบเบอเรลลินโดยเริ่มจาก GA_1, GA_2,GA_3,..... GA_n (MacMillan and Takahashi, 1968) จนกระทั่งปี ค.ศ.1991 มีรายงานการค้นพบจิบเบอเรลลินทั้งหมด 72 ชนิด และ 25 ชนิดที่จุลินทรีย์ผลิตได้ (Lonsane and Kumar, 1991) ปัจจุบันการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้วิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์ โดยใช้เชื้อรา *G. fujikuroi* การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินมีขั้นตอนที่ซับซ้อนดังแสดงในรูปที่ 1

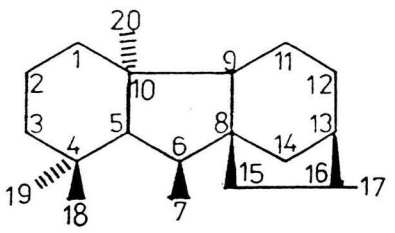


รูปที่ 1 วิถีการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ที่มา : Lonsane and Kumar, 1991

2. ชนิดและโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลินเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของไดเทอร์พีนอยด์ (diterpenoid) ที่ประกอบด้วยวงแหวนเททราไซคลิก (tetracyclic ring) มีชื่อเรียกว่า ent-gibberellane ดังแสดงในรูปที่ 2 จิบเบอเรลลินแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมจำนวน 20 อะตอม และกลุ่มที่ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมเพียง 19 อะตอม ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งได้แก่ GA_1,GA_3,GA_4, และ GA_7 สำหรับจิบเบอเรลลินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงคือ GA_3 รองลงมาคือ GA_4 และ GA_7 นอกจากนี้ยังพบว่า GA_4 และ GA_7 เป็นสารตั้งต้นของ GA_3 ด้วย (Bruckner et al., 1989)

GA_3 นิยมใช้ในทางการเกษตรมากที่สุดมีชื่อสามัญเรียกว่า กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 2,4α,7-Trihydroxy-1-methyl-8-methylenegibb-3-ene-1, 10-dicarboxylic acid 1,4α-lactone($C_{19}H_{22}O_6$) มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทธานอล เมทธานอล เอทธิลอะซิเตต บิวทิลอะซิเตต โซเดียมอะซิเตต และคีโตน มีน้ำหนักโมเลกุล 346 จุดหลอมเหลว 234-236 องศาเซลเซียส จิบเบอเรลลินเสถียรในสภาวะที่แห้งและสลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย เมื่อ GA_3 อยู่ในรูปสารละลายจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 3-4 (Yabuta and Hayashi, 1939 cited by Lonsane and Kumar, 1986)



รูปที่ 2 โครงสร้างของ ent-gibberellane

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน

3.1 หัวเชื้อสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน

Gancheva และ Dimova (1984) กล่าวว่าการผลิตจิบเบอเรลลินขึ้นอยู่กับ อายุและปริมาณของหัวเชื้อ *G. Fujikuroi* โดยหัวเชื้อที่มีอายุ 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เส้นใยมีการเจริญอย่างช้าๆ จะให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้หัวเชื้อที่มีอายุสูง ซึ่งเส้นใยจะเกิดการแตกหักและย่อยสลาย(autolysis) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้หัวเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลิน จากรายงานของ ศุภชัย สมัปปิโต(2337) พบว่าอายุหัวเชื้อของ *G. Fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ที่มีอายุ 48 ชั่วโมงและใช้ปริมาตรหัวเชื้อร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งแตกต่างกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ที่พบว่าอายุหัวเชื้อของ *G. Fujikuroi* สายพันธุ์ F4W-6(9) ที่มีอายุ 60 ชั่วโมงเหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากรายงานทั้งสองดังกล่าวจะพบว่าอายุของหัวเชื้อต่างกันแต่เป็นการเจริญระยะกึ่งกลางช่วงทวีคูณ(mid-log phase) เหมือนกัน

3.2 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 สารแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในการผลิตจิบเบอเรลลินคือ กลูโคสและซูโครส นอกจากนี้ยังใช้หางนม ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม กากน้ำตาลจากอุตสาหกรรมน้ำตาลและไฮดรอล(hydrol)จากอุตสาหกรรมผลิตกลูโคสจากแป้ง (Sastry et al., 1988) และยังมีรายงานการใช้น้ำมันพืชในอาหารเลี้ยงเชื้อร่วมกับซูโครส โดย

Muromtsevและคณะ(1968) กล่าวว่าน้ำมันพืชและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตจิบเบอเรลลิน เนื่องจากน้ำมันพืชหรือกรดไขมันเมื่อผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (β-oxidation) จะให้อะซิทิลโคเอ (Acetyl Co-A) มากกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น และอะซิทิลโคเอจะถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลิน

3.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน

ชนิดและปริมาณสารไนโตรเจน มีความสำคัญต่อการผลิตจิบเบอเรลลินเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีรายงานว่าการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินถูกควบคุมโดยเมตาโบลิสมของไนโตรเจน กล่าวคือ การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินจะเริ่มเมื่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมด ดังนั้นความเข้มข้นเริ่มต้นของไนโตรเจนจะมีความสำคัญมาก (Borrow et al., 1964) สำหรับชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินสามารถใช้ได้ทั้งรูปของอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน อินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด (corn-steep liquor) (Vass and Jefferys, 1979) กากถั่วเหลือง (อรไท สุขเจริญ, 2533) ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมทาเทรต เป็นต้น (Jefferys,1970) การเลือกใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอาจจะเป็นชนิดใด ชนิดหนึ่งหรือใช้ควบคู่กันก็ได้ ความสำคัญขึ้นอยู่กับปริมาณเริ่มต้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ และขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในแต่ละท้องถิ่น

3.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน

3.3.1 การให้อากาศและอัตราเร็วสำหรับการกวนในถังหมัก

กระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน จะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน

ดังนั้นประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนในกระบวนการจึงเป็นสิ่งสำคัญ ถ้าปริมาณออกซิเจนที่ให้ต่ำหรือเกิดสภาพที่ออกซิเจนไม่เพียงพอสำหรับเชื้อ จะมีผลทำให้วิถีการผลิต (biosynthesis pathway) ของสารเปลี่ยนแปลงไปทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์ใหม่ และที่สำคัญคือทำให้ปริมาณจิบเบอเรลลินที่ผลิตได้ลดต่ำลงด้วย (Geissman et al., 1966) ปริมาณการให้อากาศและอัตราเร็วสำหรับการกวนในถังหมักจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของถังหมัก ลักษณะใบพัด(Holme and Zacharias, 1965)

3.3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิน ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในระหว่างการหมักควรอยู่ในช่วง 3.5-6.5 เพราะถ้าค่าความเป็นกรดด่างมากกว่านั้นจะทำให้การเจริญของเชื้อลดลง และมีการปล่อยสารเมตาบอไลต์ต่างๆ เช่น GA_4, GA_7, GA_9, GA_{12}, GA_{14}, และ GA_{16} ออกนอกเซลล์มากขึ้นโดยไม่สามารถนำกลับเข้าสู่เซลล์ เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดจิบเบอเรลลิกได้ ส่งผลให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้ลดน้อยลง(Borrow et al., 1964; Beader et al., 1973) นอกจากนี้ อรไท สุขเจริญ(2533) พบว่าไม่จำเป็นต้องควบคุมความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก เนื่องจากกรดจิบเบอเรลลิกที่เชื้อสร้างขึ้นในสภาวะปกติจะให้ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงกรดด่างที่เหมาะสมแล้ว

3.3.3 แสงสว่าง

แสงสว่างมีอิทธิพลต่อการสะสมปริมาณจิบเบอเรลลิน และการเพิ่มขึ้นของรงควัตถุคาโรทีนอยด์ในเชื้อรา *G. fujikuroi* มีรายงานว่าการผลิตจิบเบอเรลลินในที่มืดจะผลิตได้น้อยกว่าในที่สว่าง(Sweig and Devay, 1959 cited by Stephen and Ronald, 1990) Mertz และ Henson (1967) ยืนยันผลของแสงสว่างที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดย

รายงานว่าการผลิตจิบเบอเรลลินในที่มีแสงสว่าง จะมีปริมาณจิบเบอเรลลินสูงกว่าในที่มืดร้อยละ 116 และแสงสีน้ำเงินสามารถกระตุ้นการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแสงสีอื่นๆ นอกจากนี้ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ได้รายงานผลการเลี้ยงเชื้อ *G.fujikuroi* สายพันธุ์ F4W-6(9) ในสภาวะที่มีแสงสว่างจะมีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ไม่ให้แสงสว่างถึง 22.25 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 13 ของการเลี้ยงเชื้อ

3.3.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ มีรายงานการหมักที่ 25 องศาเซลเซียสสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยจุลินทรีย์ *F. moniliform* NRRL 2284 (Stodola et al., 1955) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของศุภชัย สมัปปิโต(2537)ที่ศึกษาโดยใช้สายพันธุ์กลายพันธุ์ *G.fujikuroi* N9-34 แต่แตกต่างกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ที่พบว่าอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยจุลินทรีย์ *G.fujikuroi* F4W-6(9) ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะใช้เชื้อต่างสายพันธุ์กัน หรืออาจจะขึ้นกับองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอัครวิทย์ใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 6 ในขณะที่ศุภชัยใช้เพียงร้อยละ 0.2 นอกจากนี้ยังมีรายงานการควบคุมอุณหภูมิเป็น 2 ช่วงในการผลิตจิบเบอเรลลินคือ ช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อคือ 31-32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลินคือ 29 องศาเซลเซียส (Jefferys, 1970)

4. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม

การนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรม นับว่ามีประโยชน์อย่างมากในปัจจุบัน และยิ่งทวีความสำคัญมากขึ้นในอนาคต ได้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้ในทาง

อุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ทั้งด้านการผลิตพลังงาน เช่น เอทธานอล(ethanol) ผลิตอาหาร เช่น กรดซิตริก(citric acid) ผลิตยารักษาโรค เช่น เพนนิซิลลิน(pennicillin) ผลิตฮอร์โมนทางการเกษตรกรรม เช่น ฮอร์โมนจิบเบอเรลลิน (gibberellic acid) การนำจุลินทรีย์ไปใช้ในทางอุตสาหกรรมแรกเริ่มนั้น จุลินทรีย์ได้มาจากการคัดเลือกจากธรรมชาติ แต่จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้โดยทั่วไปมีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ในปริมาณต่ำ ซึ่งไม่คุ้มกับค่าใช้จ่ายที่ลงทุน ดังนั้นในการเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้นอาจทำโดยการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตมีขีดจำกัดโดยความสามารถในการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆซึ่งมีจีโนม (genome)ควบคุมการผลิต เพราะฉะนั้นในการทำให้จุลินทรีย์สร้างผลิตภัณฑ์ได้มากกว่าเดิมจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงจีโนม (Stanbury and Whitaker, 1984) การเกิดการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous หรือ natural mutation) มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมาก คือ จะมีเพียง 1 เซลล์ ที่เกิดการกลายพันธุ์ในจำนวน 10^{6} -10^{10} เซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่ โอกาสจะพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ดีขึ้นจึงเป็นไปได้ยากมาก ดังนั้นการปรับปรุงสายพันธุ์จึงต้องมีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งอัตราการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยการชักนำจะสูงกว่าการเกิดตามธรรมชาติหลายเท่าคือประมาณ 10-1000 เท่าหรือมากกว่านั้น ซึ่งจะทำให้มีโอกาสพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ดีเพิ่มมากขึ้น ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ได้อาจจะผลิตผลิตภัณฑ์ได้เท่าเดิม น้อยกว่า หรือมากกว่าสายพันธุ์เดิม แต่ก็มีโอกาสคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นได้ (Sikyta, 1983)

การเปลี่ยนแปลงจีโนมจุลินทรีย์เพื่อให้มีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มขึ้นกว่าเดิม นอกจากทำได้โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วยังสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering หรือ recombination DNA) เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเป็นเทคนิคสำหรับการกลายพันธุ์ ที่ต้องทราบถึงพื้นฐานทาง

พันธุกรรมของจุลินทรีย์นั้นๆอย่างละเอียด รวมถึงกระบวนการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นอย่างดี (Baltz, 1986; Davies, 1964) แต่เนื่องจากจิบเบอเรลลินเป็นผลผลิตชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีวิถีทางการผลิตที่มีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อนมาก เกี่ยวข้องกับเอนไซม์หลายชนิด ดังนั้นจึงไม่สามารถนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในทางปรับปรุงสายพันธุ์

การเปลี่ยนจีโนมจุลินทรีย์อีกวิธีหนึ่งทำได้โดยการหลอมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) โปรโตพลาสต์ทำโดยการใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเส้นใย (mycelium) ในการเตรียมโปรโตพลาสต์และการหลอมโปรโตพลาสต์ต้องทำในสภาวะที่เหมาะสม (Anne and Peberdy, 1967) ซึ่งผลการรวมกันของโปรโตพลาสต์จะทำให้ได้เซลล์ที่เป็น heterokaryons และมีโอกาสทำให้เกิด recombinants และได้สายพันธุ์ใหม่ (Stanbury and Whitaker, 1984) แต่อย่างไรก็ตามการชักนำให้เกิด heterokaryons แล้วเกิดเป็น recombinant นั้นไม่ค่อยนิยมใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ เพราะrecombinantที่ได้ส่วนใหญ่มักสร้างผลผลิตเท่าเดิมหรือน้อยกว่าสายพันธุ์เดิม แต่อาจนำวิธีดังกล่าวมาใช้เป็นส่วนประกอบหรือใช้ร่วมในการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ใช้วิธีหลักคือ การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ได้ (Bradley, 1966; Alikhanian, 1962)

5. สิ่งก่อการกลายพันธุ์

สิ่งก่อการกลายพันธุ์สามารถชักนำให้กลายพันธุ์ได้ในสิ่งมีชีวิต โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสายของดี เอ็น เอ(deoxyribonucleic acid; DNA) ซึ่งทำให้การแสดงออกของดี เอ็น เอ ผิดไปจากเดิม การกลายพันธุ์โดยสิ่งก่อการกลายพันธุ์จึงถูกใช้อย่างแพร่หลายในการทำให้เกิดความแปรผันของดี เอ็น เอ ของจุลินทรีย์ เพราะอาจทำให้จุลินทรีย์มีความสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการสูงกว่าเดิม การเลือกใช้สิ่งก่อการ

กลายพันธุ์ไม่สามารถบอกได้ว่าควรเลือกใช้ชนิดไหนจึงจะได้ผลดี ดังนั้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จึงควรมีการทดลองใช้สิ่งก่อการกลายพันธุ์ชนิดใดชนิดหนึ่งก่อน เมื่อไม่ได้ผลตามที่ต้องการก็เปลี่ยนใช้ชนิดอื่นต่อไป และสิ่งก่อการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้มี 2 กลุ่มดังนี้ (Bradley, 1966)

5.1 แสงหรือรังสีต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์(physical mutagens)

สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มแรกรังสีประเภทนอน-ไอออนไนซิ่ง(non-ionizing) เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต(UV) ซึ่งมีพลังงานในระดับต่ำจึงไม่สามารถทำให้เกิดกระบวนการไอออนไนซิ่งได้ กลุ่มสองรังสีประเภทไอออนไนซิ่ง(ionizing) ได้แก่ รังสีเอกซ์ (X-ray) และรังสีนิวตรอน เป็นต้น

5.1.1 อัลตราไวโอเลต (Ultraviolet radiation)

เป็นรังสีประเภทนอน-ไอออนไนซิ่ง(non-ionizing) แสงอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการตายและกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตได้ จึงใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งมักจะถูกเลือกใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์อันดับแรกในแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ พบว่าแสงอัลตราไวโอเลตที่มีความยาวคลื่นประมาณ 2540-2560 Å (254-256 นาโนเมตร) เป็นความยาวคลื่นที่ดี เอ็น เอ สามารถดูดกลืนแสงได้ดี เนื่องจากสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของดี เอ็น เอ อยู่ในช่วง 2600 Å ซึ่งใกล้เคียงกับ ความยาวคลื่นของแสงอัลตราไวโอเลต เป็นสาเหตุทำให้เกิดความผิดปกติกับเบสไพริมิดีน ทำให้เบสไพริมิดีน 2 ตัวที่อยู่ชิดกันบนสายดี เอ็น เอ เดียวกันหรืออยู่ตรงข้ามกันมาเชื่อมติดกัน (dimerization) ด้วยพันธะโควาเลนซ์ (covalent bond) เกิดเป็น thymine-thymine dimer thymine-cytosine dimer หรือ cytosine-cytosine dimer (Fatini,1965;

Hopwood, 1970)ในการเกิดไดเมอร์บนสายดี เอ็น เอ เดียวกัน เป็นสาเหตุให้เกิดการบิดตัวของดี เอ็น เอ เฮลิกซ์(DNA helix) ไปจนเสียรูป ทำให้เกิดไดเมอร์บนสาย ดี เอ็น เอ ที่อยู่ตรงข้ามได้ ไดเมอร์จะมีผลต่อการจำลองตัวของดี เอ็น เอ เพราะพันธะโควาเลนซ์ที่เกิดจะทำให้สายดี เอ็น เอ ทั้ง 2 สายแยกออกจากกันไม่ได้ เมื่อดี เอ็น เอ ต้องการจำลองตัวจะมีกลไกเข้ามาช่วยซ่อมแซม จึงอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้จากการนำเอาเบสคู่ใหม่เข้ามาแทนที่ ผลจากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต จะเกิดการกลายพันธุ์แบบทรานซิชัน (transition) จาก GC→AT เป็นส่วนใหญ่ จาก AT→GC จะเกิดน้อย แบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) ซึ่งพบไม่ค่อยบ่อยนัก นอกจากนี้ยังอาจพบการกลายพันธุ์ชนิดเฟรมชิพ (framshiff) อีกด้วย (Baltz, 1986; Hopwood,1970)

สภาวะที่เหมาะสมในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ควรเลือกใช้สภาวะที่ทำให้มีอัตราการอยู่รอดของสปอร์ประมาณร้อยละ 0.01-5 (Baltz, 1986; Davies, 1964; Hopwood, 1970) เปอร์เซ็นต์รอดตายที่ได้จะต่างกันขึ้นอยู่กับความเข้มแสง ช่วงเวลาในการฉายแสง ระยะห่างของหลอดฉายแสงกับพื้นที่ผิวของสปอร์ และช่วงเวลาของการเจริญของเชื้อ (growth phase) ที่เปลี่ยนไปในแต่ละครั้งของการทดลอง จะมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์รอดตายแตกต่างกันในแต่ละครั้ง การควบคุมแสงทำได้โดยการเปิด-ปิดฝาจานแก้วเพาะเชื้อ (petri dish) ที่ใส่สปอร์อยู่ ไม่ใช้การเปิดปิดหลอดแสงอัลตราไลโอเลต ความผิดปรกติของเบสที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเลตสามารถกลับคืนสู่สภาพปรกติได้ เมื่อถูกแสง visible light (ความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร) เช่น แสงแดด แสงจากฟลูออเรสเซนต์ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า photoreactivation ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์ photolyase เอนไซม์นี้จะทำงานโดยอาศัยแสงเป็นตัวกระตุ้นเข้าไปตัดไดเมอร์ให้ขาดออกกลายเป็นโมโนเมอร์ของเบสไพริมิดีน เพื่อป้องกันการเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว ต้องพยายามไม่ให้สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตถูกแสง visible light ทันที (Fatini,1965; Hopwood,1970)

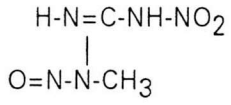
5.2 สารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (chemical mutagens)

สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้หลายกลุ่มตามปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับ ดี เอ็น เอ สารกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมากได้แก่ สารอัลคิลเลติง(alkylating agent) โดยเฉพาะN-methyl-N/-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) โดยสารในกลุ่มนี้มีสมบัติเติมหมู่อัลคิลตั้งแต่หนึ่งหมู่ขึ้นไปให้กับโมเลกุลดี เอ็น เอ

5.2.1 NTG (MNNG) = N-methyl-N/-nitro-N-nitrosoguanidine

NTG เป็นสารประกอบเคมีพวกอัลคิลเลติง (alkylating agent) ที่มีประสิทธิภาพสูง นิยมใช้อย่างกว้างขวางในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์หลายชนิด NTG เป็นผลึกสีเหลือง มีมวลโมเลกุล 147.1 จุดหลอมเหลว (melting point) 118 องศาเซลเซียส จุดเดือด (boiling point) 123.5 องศาเซลเซียส และมีสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 3 NTG เป็นสารประกอบที่ไวต่อแสงสว่าง เมื่อถูกแสงจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีส้ม-เขียว ละลายได้ในตัวทำละลายมีขั้ว ละลายได้น้อยในน้ำ

การทำงานของ NTG ต้องมีการแตกตัวออกจึงจะเป็นสารชักนำได้ NTG สามารถแตกตัวได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะใน 0.1 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริกจะแตกตัวเป็นกรดไนตรัส ถึงแม้กรดไนตรัสจะเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ชนิดหนึ่ง แต่ไม่สามารถทำงานได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่ NTG ทำงานได้ ส่วนสภาวะที่เป็นด่าง NTG จะแตกตัวอย่างรวดเร็วเป็น diazomethane (CH_2N_2) ซึ่งเป็น Strong methylating agent แล้วเข้าจับกับสปอร์อย่างรวดเร็ว และที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 ไม่เกิดการสลายตัว (Fatini, 1965; Hopwood, 1970)



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ NTG

กลไกการทำงานที่แท้จริงในการชักนำให้ดี เอ็น เอ ของเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงโดย NTG นั้นยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก แต่เชื่อว่า NTG มีผลเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากกับเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัว ดังนั้นจึงควรบ่มสปอร์ (preincubation) ก่อนทำปฏิกิริยากับ NTG การเตรียม NTG เพื่อใช้งานควรเตรียมใหม่ทุกครั้งในการทดลอง ควรเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำเพื่อป้องกันการสลายตัว (Sussmuth et al., 1972) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8-9 NTG จะสลายตัวอย่างรวดเร็ว นิยมละลาย NTG ในสารละลาย Tris-maleic acid ค่าความเป็นกรดด่าง 8 ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจาก NTG เป็น alkylating agent เมื่อเติมด่างจะแตกตัวทำให้เกิดความผิดพลาดในช่วงเล็กๆ ของดี เอ็น เอ ด้วยการเติมหมู่อัลคิล 1 หมู่ ให้กับเบส จากนั้นจะชักนำให้คู่เบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้ามาอยู่ที่ replication fork ได้ดีกว่าคู่เบสปกติ พบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของการกลายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG มีการเกิด GC → AT ทรานซิชัน (transition) และอาจเกิดดีลีชัน (deletion) เฟรมชิพมิวเตชัน (frameshiff mutation) โดยสัดส่วนของคู่เบส GC หายไป (Crueger and Crueger, 1987) ปัจจัยหลักสำคัญที่ใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ความเข้มข้นของ NTG ความเข้มข้นของ NTG ยิ่งมากเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์ยิ่งต่ำลง และจะพบสปอร์ที่กลายพันธุ์เป็นจำนวนมาก ในช่วงความเข้มข้นที่ให้เปอร์เซ็นต์รอดตาย 14 เปอร์เซ็นต์จะมีโอกาสพบ Auxotroph และสายพันธุ์กลายพันธุ์ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง (Baltz, 1986)

6 การปรับปรุงสายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi*

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่ง ที่บ่งชี้ความเป็นไปได้ของการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพจึงจำเป็นต้องมีการวิจัย เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องควบคู่ไปกับกระบวนการผลิต

Erokhina และ Sokolova (1966) ได้ชักนำจุลินทรีย์ให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ฟาสนิวตรอน(fast neutrons)และรังสีแกมมา(gamma ray) ซึ่งพบว่าปริมาณ GA_3 เพิ่มขึ้น 60 เปอร์เซ็นต์ ต่อมามีการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับเอธิลีนเอมีน(ethyleneimine) ได้ปริมาณ GA_3 ประมาณ 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งส่วนประกอบอาหารใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอน(USSR Patent 440,408 cited by Brueckner and Blechschmidt, 1989)

Imshenetskii และ Ul'Yanova (1962) ได้กลายพันธุ์เชื้อ *Fusarium moniliform* ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและเก็บสายพันธุ์กลายพันธุ์มา 120 สายพันธุ์มาศึกษา แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ 1.7 เปอร์เซ็นต์เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 29.1 เปอร์เซ็นต์ ผลิตได้เท่ากับสายพันธุ์ตั้งต้น 65 เปอร์เซ็นต์ ผลิตได้น้อยกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น และ 4.1 เปอร์เซ็นต์ไม่สามารถผลิต GA_3 ได้ คณะผู้วิจัยยังได้รายงานว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะได้สายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงขึ้นจำนวนน้อยมาก และสายพันธุ์กลายพันธุ์ส่วนมากที่ได้จะมีเส้นใยที่สั้นและโคโลนีเล็ก เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง นอกจากนี้ยังให้สีน้ำหมักเปลี่ยนไปจากสายพันธุ์ตั้งต้น

Kolblin และคณะ (1990) ศึกษาประสิทธิภาพของสารก่อการกลายพันธุ์ชนิดต่างๆ ต่อเชื้อ *G. fujikuroi* พบว่า NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งตรงกันข้ามกับรังสีเอ็กซ์จะก่อให้เกิดการกลายพันธุ์น้อยที่สุด เมื่อใช้ NTG เป็นสารก่อการ

กลายพันธุ์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก(morphology) และสี (pigment) ส่วนการใช้แสงอัลตราไวโอเลตจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านสี (pigment) เมื่อใช้แสงอัลตราไวโอเลตร่วมกับ NTG ในการกลายพันธุ์ จะให้จำนวนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นมากที่สุด

ต่อมา Avalos และคณะ (1985) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ *G.fujikuroi* เพื่อผลิตแคโรทีนอยด์ โดยใช้ NTG และแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าเมื่อกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แล้วนำเชื้อกลายพันธุ์มารับแสงสีขาวทันทีจะทำให้เกิดการผันกลับ (reversible) ขึ้น นอกจากนั้นการบ่มสปอร์ก่อนการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตไม่มีผลต่ออัตราการตายของสปอร์ และจะพบว่าเส้นใย (mycelium) ทนต่อแสงอัลตราไวโอเลตมากกว่าสปอร์เมื่อใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ อัตราการตายจะเพิ่มขึ้นถ้าบ่มสปอร์ให้งอก (preincubation) ในอาหารเหลว (nutrient broth) นาน 2 ชั่วโมง หลังจาก 6 ชั่วโมงไปแล้ว 80 เปอร์เซนต์ของสปอร์จะงอก germ tube ทำให้อัตราการตายลดลงและประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ด้วย NTG จะลดลง ซึ่งจันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) ได้ศึกษาการบ่มสปอร์ก่อนการกลายพันธุ์ พบว่าใช้เวลา 3 ชั่วโมงเหมาะสมที่สุด สายพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ด้วย NTG จะเกิดการเปลี่ยนแปลงขนาดของโคโลนี ผิวหน้าโคโลนี(surface texture) สี และลักษณะภายนอกอื่นๆ ต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้น แต่อย่างไรก็ตาม NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีกว่าแสงอัลตราไวโอเลต

7. การวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน

7.1 วิธีทางชีวภาพ (Biological assay)

วิธีนี้ใช้ยืนยันกิจกรรมทางชีวภาพ (Biological activity) แต่ไม่เหมาะในการตรวจ

สอบชนิดและปริมาณ GA_3 เนื่องจากจิบเบอเรลลินบางชนิดให้ผลต่อพืชคล้ายกัน ความไว (sensitivity) ต่ำ ใช้เวลานานในการตรวจสอบ (Lonsane and Kumar, 1986) วิธีนี้อาศัยหลักการตอบสนองของเมล็ดพืชต่อจิบเบอเรลลินที่เติมลงไป โดยใช้เมล็ดพืชที่ไม่สามารถสังเคราะห์จิบเบอเรลลินได้ เช่น พืชแคระ พืชแคระที่ทดสอบได้แก่ ข้าวแคระ (dwarf rice) และถั่วแคระ (dwarf pea) เป็นต้น (Crozier et al., 1970)

7.2 เปเปอร์โครมาโตกราฟี (Paper chromatography)

วิธีนี้มีผู้นิยมใช้กันน้อย เนื่องจากใช้เวลานานในการแยกสาร ประสิทธิภาพการแยกสารต่ำ Harold และคณะ (1957) วิเคราะห์ปริมาณ GA_3 โดยพ่นแผ่นเปเปอร์โครมาโตกราฟีด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ สารละลายโพแทสเซียมเปอร์มังกาเนต จะปรากฏจุดสีน้ำตาลของกรดจิบเบอเรลลิก บางรายงานวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 โดยพ่นแผ่นเปเปอร์โครมาโตกราฟีด้วย 70 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Phinney et al., 1957 cited by Harold et al.,1957)

7.3 สเปกโทรโฟโตเมตรี (Spectrophotometric method)

Holbrook (1961) ใช้วิธีการเปลี่ยนกรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) ให้เป็นกรดจิบเบอเรลลีนิก (gibberellenic acid) โดยใช้กรดเข้มข้น แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Holbrook et al., 1961 cited by Kumar and Lonsane, 1986) ส่วน Shen และ Chang (1981) ใช้วิธีการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดจิบเบอเรลลิกกับฟอสฟอโมลิบดิก (phosphomolybdic acid) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ

จิบเบอเรลลินแต่ละชนิดได้อีกทั้งยังถูกรบกวนจากกรดอะมิโนและน้ำตาลในน้ำหมัก ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงผิดพลาดได้วิธีนี้จึงไม่นิยมใช้

7.4 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin-layer chromatography)

วิธีนี้สะดวก รวดเร็ว ประสิทธิภาพการแยกสารดี แต่วิเคราะห์ปริมาณไม่ได้ MacMillan และ Suter (1963) ได้ศึกษาการแยก GA_3 ออกจากจิบเบอเรลลินตัวอื่นๆ โดยใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วย Silica gel G ระบบตัวพาประกอบด้วย เบนซีน:กรดอะซีติก:น้ำ ในอัตราส่วน 4:1:2 พ่นด้วย 5 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกในเอทธานอลอบที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สังเกตจุดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

Saucedo และคณะ (1989) ได้ตรวจสอบปริมาณ GA_3 บนแผ่น TLC โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเป็น 2.5 ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต วิเคราะห์ปริมาณ GA_3 บนแผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel 60 F_{254} ในระบบตัวพาที่ประกอบด้วย เบนซีน : กรดโพรพิโอนิค: น้ำในอัตราส่วน 6:3:1 และเอทธิลอะซิเตตในอัตราส่วน 6:4 ตรวจสอบจุดสารโดยการพ่นด้วย 5 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกในเอทธานอล นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดความเข้มจุด GA_3 ภายใต้เครื่อง Scanning-densitometer (Saucedo et al., 1989)

จันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) ได้แยก GA_3 ออกจากน้ำหมักตามวิธีของ Saucedo และคณะ(1989) เมื่อพ่นแผ่น TLC ด้วย 5 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกในเอทธานอลแล้วจะเกิดสีเหลืองอ่อน ขณะเดียวกันสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นสังเกตความเข้มของจุด GA_3 ด้วยสายตาเปรียบเทียบกัน แต่ก็ยังไม่สามารถระบุปริมาณได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงเป็นวิธีในการคัดเลือกสายพันธุ์อย่างคร่าวๆ สะดวก

รวดเร็ว ในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

7.5 ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (High performance thin-layer chromatography)

เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจากวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) เริ่มใช้กันตั้งแต่ปี ค.ศ.1975 ซึ่งเป็นวิธีที่วิเคราะห์ได้ทั้งปริมาณและคุณภาพในสารประกอบหลายอย่าง เช่น ไมโคทอกซิน (Betina, 1985) คอร์ติซอล(cortisol) (Funk et al., 1981) และบาบิทูเรต (Jaenchen and Haleem, 1988) การวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักมีรายงานอยู่น้อยมากส่วนใหญ่จะใช้วิธี TLC มีรายงานการสแกน (scan) ค่าความเข้มของจุดจิบเบอเรลลินภายใต้เครื่อง Scanning densitometer โดยวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 บนแผ่น TLC silica gel 60 F_{254} ในระบบตัวพาที่ประกอบด้วย เบนซีน:กรดโพรพิโอนิค:น้ำ (6:3:1) และเอทธิลอะซิเตตในอัตราส่วน 6:4 ตรวจสอบจุดสารโดยการพ่นด้วย 5 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริกในเอทธานอล นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Saucedo et al, 1989) ซึ่งพบว่าวิธีนี้จำเพาะกับ GA_3 ไม่ปนเปื้อนสารอื่น สามารถแยก GA_3 ออกจากสารอื่นในน้ำหมักได้ (Kumar and Lonsane,1986) และยังมีรายงานการวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมักด้วยวิธีนี้ โดยใช้แผ่น HPTLC silica gel 60 จากนั้นจุดตัวอย่างและสารมาตรฐานบนแผ่น HPTLC และนำไปทำปฏิกิริยากับ 27 เปอร์เซ็นต์กรดซัลฟูริก แล้ววางในถังแก้วที่มีระบบตัวทำละลายอิ่มตัวประกอบด้วย ไซโคลเฮกเซน : อะซีโตน อัตราส่วน 4 : 5 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 เซนติเมตร วางแผ่น HPTLC ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปวางในถังแก้วที่ประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำออกมาและไปอบที่ 105 - 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ในการสแกน (scan) จะใช้สภาวะดังนี้ ใช้แหล่งแสงเมอร์คิวรี(Hg) โหมด

ฟลูออเรสเซนต์ ในการวัดแสงที่เรืองออกมา (โดยใช้ฟิลเตอร์ ที่เหมาะสม) Scan speed 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที Slit width 0.3 มิลลิเมตร และ Slit length 3 มิลลิเมตร(Sackett, 1984) จะเห็นว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงทั้งในการแยกสารและตรวจวิเคราะห์ความเข้มของจุดโดยสามารถสแกนได้ครั้งละมากตัวอย่าง และทำได้อย่างรวดเร็ว (Betina, 1985) การวิเคราะห์สารด้วยเครื่อง HPTLC ไม่เพียงแต่จะใช้ในการวิเคราะห์ ตัวอย่างที่ได้จากการสกัดสาร และผ่านขั้นตอนต่างๆ ที่ทำให้สารมีความบริสุทธิ์สูงเท่านั้น แต่ยังมีขีดความสามารถที่จะวิเคราะห์ตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์มาก่อน เช่น วิเคราะห์ปริมาณสารคาเฟอีนที่อยู่ในปัสสาวะ (เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์,2533)

7.6 แกสโครมาโตกราฟี (Gas chromatography)

เป็นการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก โดยจิบเบอเรลลินต้องเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารประกอบที่กลายเป็นไอได้ง่าย โดยเตรียมให้อยู่ในรูปของเมทธิลเอสเทอร์ (methyl ester) หรือไตรเมททิลไซลิล เอสเทอร์ (trimethylsilyl esters) เป็นต้น (Jefferys, 1970) การเตรียมอนุพันธ์เพื่อตรวจวัดนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก เสียเวลา และการเตรียมสารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane) สำหรับการเติมหมู่เมธิล (methylation) เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง อีกทั้งไดอะโซมีเทนในสถานะกาซและสารละลายมีสมบัติเป็นพิษและสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จึงไม่นิยมใช้วิธีนี้

7.7 ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography)

วิธีนี้ใช้วิเคราะห์สารที่ระเหยไม่ได้ นิยมใช้กันมากในการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณจิบเบอเรลลิน เพราะเป็นวิธีที่สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ

สูง ไม่ยุ่งยาก ซึ่งแต่เดิมการแยกจิบเบอเรลลินจะนิยมใช้วิธี TLC แต่ปัจจุบันใช้วิธี HPLC ในการแยกเพราะสามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินได้ อรไท สุขเจริญ (2533) ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 จากน้ำหมักของ *G.fujikuroi* C โดยปรับปรุงจากวิธีของวันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532) โดยใช้เครื่อง HPLC คอลัมน์ C_8 สารละลายตัวพาเป็น 35 เปอร์เซ็นต์เมทธานอลในกรดฟอสฟอริก ค่าความเป็นกรดด่าง 3 อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร ใช้พาราเซตามอลเป็นสารละลายเปรียบเทียบมาตรฐาน

8. มูลเหตุจูงใจในการวิจัย

จิบเบอเรลลินเป็นฮอร์โมนชนิดหนึ่ง ได้นำมาใช้ประโยชน์ทางเกษตรอย่างกว้างขวางและสามารถเพิ่มทั้งปริมาณและคุณภาพของผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด เช่น การยืดช่อองุ่นให้ยาวเพื่อลดการเบียดของผลองุ่นในช่อ ทำให้องุ่นโตได้เต็มที่ ช่วยขจัดการพักตัวของหัวมันฝรั่ง รวมทั้งสามารถเร่งการออกดอกและการติดผลของมะม่วงมะเขือเทศ (พีรเดช ทองอำไพ, 2529) ดังนั้นจึงได้เริ่มมีการใช้ฮอร์โมนพืชจิบเบอเรลลินและขยายวงการใช้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ประเทศไทยยังไม่มีการผลิตจึงต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศเพิ่มขึ้นทุกปี ประมาณการว่าปริมาณการใช้จิบเบอเรลลินในประเทศเพิ่มขึ้นปีละประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ (วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์, 2533) จึงน่าจะมีการผลิตใช้เองภายในประเทศ แต่สายพันธุ์ที่มีอยู่ยังให้ผลผลิตไม่สูงนักจึงจำเป็นต้องปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตจิบเบอเรลลินมาอย่างต่อเนื่อง

และจันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ *G. Fujikuroi* สายพันธุ์ C ด้วย UV และ NTG คัดเลือกได้สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์เดิม

ในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มผลผลิตนั้น หลังจากการทำให้เกิดการกลายพันธุ์แล้วประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญมาก การมีวิธีคัดเลือกที่รวดเร็วและแม่นยำ จะช่วยให้ความสำเร็จในการที่จะได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมีมากขึ้นในระยะเวลาที่สั้นกว่า นอกจากนี้การปรับปรุงสายพันธุ์ให้ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ จะเกิดประโยชน์มาก ในแง่การประหยัดพลังงานในการหล่อน้ำเย็น (cooling) ถังหมักในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

งานวิจัยปรับปรุงสายพันธุ์ *G. Fujikuroi* เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต GA_3 นี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากงานของ จันทร์ธิรา ลัภยพร(2536) ซึ่งได้ปรับปรุงสายพันธุ์ *G. Fujikuroi* โดยการกลายพันธุ์ด้วย UV และ NTG และคัดเลือกสายพันธุ์เบื้องต้นอย่างคร่าวๆ โดยการเปรียบเทียบความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC ด้วยสายตา จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นทุติยภูมิวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดยสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกไว้ด้วย HPLC แต่งานวิจัยนี้จะเพิ่มอุณหภูมิในการคัดเลือกและเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จาก 25 องศาเซลเซียสเป็น 28 องศาเซลเซียส และจะปรับปรุงวิธีคัดเลือกขั้นปฐมภูมิโดยการนำวิธี HPTLC มาใช้คัดเลือก เพราะการนำวิธี HPTLC มาใช้เป็นวิธีคัดเลือกเบื้องต้นน่าจะดีกว่าการดูด้วยสายตาโดยการวัดความเข้มของจุด GA_3 ภายใต้เครื่อง Spectrofluoro-densitometer (Kumar and Lonsane, 1986) และศึกษาสมบัติบางประการของสายพันธุ์กลายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น เช่น ลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป (morphology) ประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เป็นต้น ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นแนวทางในการปรับปรุงสายพันธุ์ในครั้งต่อไป

9. ขั้นตอนการวิจัย

1. ศึกษาการวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ด้วยวิธี HPTLC
2. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ *G. Fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต
3. ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ *G. Fujikuroi* ด้วยสารเคมี (NTG)
4. คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเพิ่มขึ้น
5. ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูงโดยวิธี HPLC และ HPTLC
6. ศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกว่าดีที่สุดกับสายพันธุ์ตั้งต้น เช่น เปรียบเทียบลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนไป และประสิทธิภาพที่ผลิต GA_3 เป็นต้น
7. ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของสายพันธุ์ที่คัดเลือกว่าดีที่สุดในถังหมักขนาด 5 ลิตร