บทที่ 1

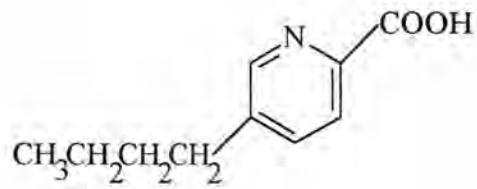
บทนำ

1.1 การค้นพบจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลิน (gibberellin:GA_s) จัดเป็นฮอร์โมนพืช(plant hormones) ชนิดหนึ่ง ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของพืช การยืดยาวของลำต้น ก้าน ช่อดอก การเติบโตของต้นกล้า การออกดอก การติดผล การสุกของผล การเปลี่ยนเพศดอกในพืชบางชนิด การพักตัวของเมล็ด การชักนำเอนไซม์และการกระตุ้นผลและใบ เป็นต้น (Takahashi, Yamaguchi and Yamane,1986) จิบเบอเรลลินถูกค้นพบเมื่อนักโรคพืชชาวญี่ปุ่น ได้พยายามหาสาเหตุของโรคพืช ชื่อ บากานี (bakanae) หรือ foolish seedling disease ซึ่งบางท้องถิ่นเรียก อะโฮนี (Ahoine) และ ยูเรอิ (Yurei) (Stowe and Yamaki, 1957) โรคบากานีทำให้พืชมีลักษณะสูงชะลูดผิดปกติ ต้นหักง่าย สีซีด ระบบรากแคระ ทำให้พืชส่วนใหญ่ตาย ส่วนที่รอดให้ผลผลิตต่ำหรือไม่ให้ผลผลิตเลย ในปี ค.ศ. 1898 Shotaro Hori ชี้ให้เห็นว่าโรคนี้เกิดจากเชื้อราในจีนัส *Fusarium* ซึ่งอาจเป็น *Fusarium heterosporium* Nees. (Hori, 1898 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991a) ต่อมา Eiichi Kurosawa (1926) ได้รายงานว่าเชื้อราสามารถทำให้พืชเป็นโรคได้ โดยหลั่งสารเคมีชนิดหนึ่งออกมามีผลกระตุ้นทำให้ต้นพืชยืดยาวกว่าปกติ ยับยั้งการสร้างคลอโรฟิลและการเติบโตของปลายราก (Kurosawa, 1926 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991a) ในปี ค.ศ. 1931 Wollenweber ได้จัดจำแนกราและเรียกราชนิดนี้เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (imperfect stage) ว่า *Fusarium moniliforme* (Sheldon) และเมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (perfect stage) ว่า *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. โดยชื่อในส่วนของ "Fujikuroi" และ "Saw." มาจากชื่อของนักโรคพืชชาวญี่ปุ่นสองคนคือ Yosaburo Fujikuro และ Kenkichi Sawada (Wollenweber, 1931 อ้างถึงใน Booth, 1971)

ปี ค.ศ. 1934 Yabuta, Kambe และ Hayashi นักเคมีชาวญี่ปุ่นสามารถแยกสารที่ทำให้เกิดอาการของโรคบากานีจากรา *Fusarium moniliforme* (Sheldon) สารที่ได้มีลักษณะเป็นผลึก โดยเรียกชื่อสารตามชื่อราว่า กรดฟิวซาริก (fusaric acid) ชื่อทางเคมีว่า 5-n-butylpicolinic acid สูตรโมเลกุล $C_{10}H_{13}NO_2$ ลักษณะสูตรโครงสร้างดังภาพที่ 1-1 แต่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ดีนักเมื่อนำไปทดสอบกับพืช ระหว่างปี ค.ศ. 1935 Yabutaและคณะ ได้

พยายามเลี้ยงเชื้อราเพื่อต้องการปริมาณสารมากขึ้น แต่ได้พบสารชนิดใหม่ เมื่อนำไปทดสอบกับพืชพบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง(biological activity) จึงตั้งชื่อสารนี้ว่า "gibberellin" (Yabuta, Kambe and Hayashi, 1934 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991a)



รูปที่ 1-1 สูตรโครงสร้างของกรดฟิวซาริก(Windholz, 1983)

ในปี ค.ศ. 1938 ญี่ปุ่นประสบความสำเร็จในการแยกสารจากเชื้อรา โดยมีลักษณะเป็นผลึกสีเหลืองอ่อนให้ชื่อว่า จิบเบอเรลลิน-เอ และ จิบเบอเรลลิน-บี แต่ผลึกจิบเบอเรลลิน-เอที่ได้ไม่บริสุทธิ์ หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 สหรัฐอเมริกาให้ความสนใจกับงานวิจัยการผลิตจิบเบอเรลลิน และสามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดใหม่ตั้งชื่อว่า gibberellin X ขณะเดียวกันบริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) ได้คัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์รา *G. fujikuroi* สามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดใหม่ ตั้งชื่อว่า gibberellic acid ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ gibberellin X แต่ต่างจาก gibberellin A ที่ญี่ปุ่นผลิตได้ ดังนั้นนักเคมีชาวญี่ปุ่นจึงนำจิบเบอเรลลินมาตรวจสอบอีกครั้ง และประสบความสำเร็จในการแยกหมู่เมทิลเอสเทอร์ของ gibberellin A สามารถแยกได้ 3 ชนิด คือ gibberellin A_1, A_2 และ A_3 (Stodola,1955 ; Grove, 1961; Curtis and Cross, 1954)

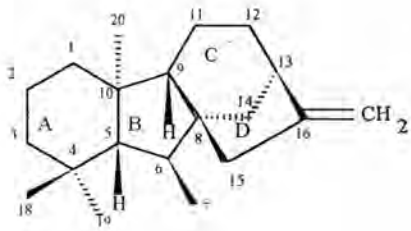
ในปี ค.ศ. 1957 Takahashi และคณะ ได้แยก GA_4 เป็นผลสำเร็จและในช่วงเวลานี้เองที่นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบและสามารถแยกจิบเบอเรลลินที่มีในธรรมชาติจากพืชชั้นสูง หลังจากนั้นก็มีการค้นพบจิบเบอเรลลินชนิดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งจากพืชและจุลินทรีย์ โดยมีตัวเลขกำกับเพื่อบอกชนิดของ GA และลำดับการค้นพบ(Takahashi, Yamaguchi and Yamane, 1986)

ปี ค.ศ.1994 นักวิทยาศาสตร์ได้ค้นพบจิบเบอเรลลินถึง 90 ชนิด (Pearce, Koshioka and Pharis, 1994) จนถึงปัจจุบันสามารถแยก GA ชนิดที่ 110 โดยแยกได้จากต้นผักขม (spinach) และ oil palm sap เป็นผลสำเร็จ (Owen, *et al.*, 1998) ซึ่งชี้ชัดว่าจิบเบอเรลลินเป็นสารเคมีที่นักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกสนใจและพยายามค้นคว้าอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน

1.2 โครงสร้างและชนิดของจิบเบอเรลลิน

1.2.1 สูตรโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลินจัดเป็นสารประกอบอินทรีย์กลุ่มกรดเททราไซคลิกไดเทอร์พีนย์ (tetracyclic diterpenoid acids) ประกอบด้วยไอโซพรีน (isoprene) 4 โมเลกุล มาเรียงต่อกันเป็นโครงสร้าง 3 วง เรียกว่า เอ็นท์-จิบเบอเรลเลน (ent-gibberellane) หรือเททรา-คาร์บอกซิลิกจิบเบน (tetra-carboxylic gibbane) ถือเป็นโครงสร้างหลักของจิบเบอเรลลิน (Bruckner *et al.*, 1989 ; Sponsel, 1995) มีโครงสร้างดังรูปที่ 1-2



รูปที่ 1-2 โครงสร้างของ เอ็นท์-จิบเบอเรลเลน

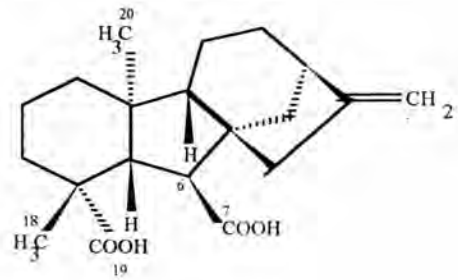
1.2.2 ชนิดของจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลินแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

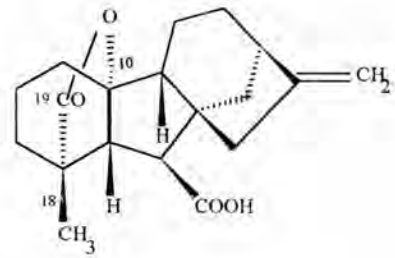
1. กลุ่มที่มีคาร์บอน 20 อะตอม (C_{20}-gibberellin) เป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างไดเทอร์พีนอย่างสมบูรณ์ ดังรูปที่ 1-3 ก ตัวอย่างเช่น GA_{12}, GA_{13}, GA_{14}, GA_{15} และ GA_{24} เป็นต้น

2. กลุ่มที่มีคาร์บอน 19 อะตอม (C_{19}-gibberellin) เป็นกลุ่มที่ขาดคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 20 ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งส่วนใหญ่ของจิบเบอเรลลินกลุ่มนี้ จะมีคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 19 เป็นหมู่คาร์บอกซิล ที่สร้างพันธะแลกโทนกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 10 ดังภาพที่ 1-3 ข เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง เช่น GA_1, GA_2, GA_3, GA_4 และ GA_7 เป็นต้น

(ก)



(ข)

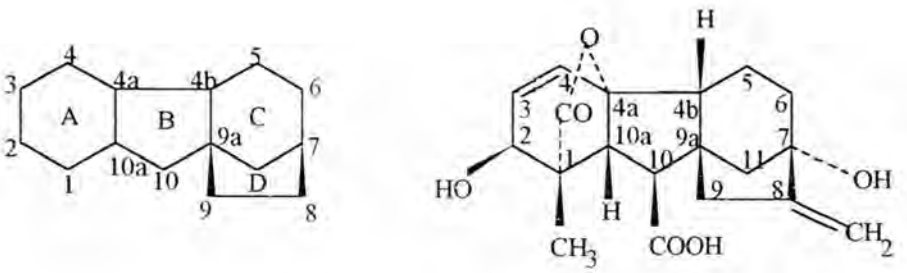


รูปที่ 1-3 โครงสร้างของจิบเบอเรลลิน 2 กลุ่ม
ก กลุ่มที่มีคาร์บอน 20 อะตอม
ข กลุ่มที่มีคาร์บอน 19 อะตอม

จิบเบอเรลลินมีอยู่หลายชนิดทั้งนี้เพราะมีหลายปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์เช่น ออกซิเดชัน ไฮดรอกซิเลชัน และการลดขนาดของโครงสร้าง (ring shortening) รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันจึงทำให้จิบเบอเรลลินแต่ละชนิดมีสูตรโครงสร้างที่ต่างกันตามตำแหน่งของพันธะคู่และหมู่ฟังก์ชันชนิดต่าง ๆ (Bruckner and Blechschmidt,1991a; Hanson,1983) โดยเฉพาะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของคาร์บอนอะตอมที่ 20 ซึ่งอาจจะเป็น หมู่เมทิล (CH_3) ไฮดรอกซีเมทิล (CH_2OH) แอลดีไฮด์ (CHO) หรือหมู่คาร์บอกซิล (COOH) ส่วนการเติมหมู่ฟังก์ชันโดยเฉพาะในจิบเบอเรลลินที่มีคาร์บอน 19 อะตอม มักมีการสร้างวงแหวนของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่เพอร์ออกไซด์ (>O) หรือ หมู่คีโทน (=O) ซึ่งตำแหน่งและการจัดเรียงตัวของหมู่ฟังก์ชันเหล่านี้มีความสำคัญมากเพราะมีผลต่อคุณสมบัติทางชีวภาพและคุณสมบัติทางเคมีของจิบเบอเรลลิน (Sponsel, 1995)

1.3 กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid : GA_3)

จิบเบอเรลลินที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์มากในปัจจุบัน โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการเกษตรมี 4 ชนิด คือ GA_1, GA_3, GA_4 และ GA_7 หรืออาจใช้ GA_4 ร่วมกับ GA_7 แต่ที่นิยมมากที่สุดคือ GA_3 เพราะมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูง มีชื่อทางเคมีว่า 2β,4aα,-7-trihydroxy-1β-methyl-8-methylenegibb-3-ene-1α,10β-dicarboxylic acid-1,4aα-lactone (Hanson, 1990) มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{22}O_6$ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1-4 น้ำหนักโมเลกุล 346.37 ดาลตัน จุดหลอมเหลว 234-236 องศาเซลเซียส เสถียรในที่แห้ง มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว เมื่ออยู่ในรูปสารละลายให้ค่าความเป็นกรดด่าง ประมาณ 3-4 มีความปลอดภัยในการใช้สูง คือ มีค่า LD_{50} มากกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูทดลอง 1 กิโลกรัม จึงไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ออกฤทธิ์กับพืชเท่านั้น (Yabuta and Hayashi, 1939 อ้างถึงใน Kumar and Lonsane, 1989)



รูปที่ 1-4 สูตรโครงสร้างของกรดจิบเบอเรลลิก

กรดจิบเบอเรลลิกละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล เมทานอล ไอโซโพรพานอล บิวทิลแอซีเทต เอทิลแอซีเทตและแอซีโทน (Bruckner and Blechschmidt, 1991a) กรดจิบเบอเรลลิกถูกทำลายหรือทำให้สูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายวิธี เช่น ถูกทำลายด้วยคลอรีน กรด(Cross,1957;Kumar and Lonsane, 1989) และถูกทำลายด้วยความร้อน จากรายงานพบว่าค่าครึ่งชีวิตของ GA_3 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 336 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าครึ่งชีวิตเหลือเพียง 2 ชั่วโมงเท่านั้น (Cross, 1957) นอกจากนี้ Perez และคณะ (1996)ได้รายงานว่ากรดจิบเบอเรลลิกจะสลายตัวในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่า 8 ได้เร็วกว่าในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 5 โดยจะสลายตัวให้กรดไอโซจิบเบอเรลลิก (iso-gibberellic acid) และกรดจิบเบอเรลลินิก (gibberellenic acid) และกรดแอลโลจิบเบอเรลลิก (allogibberellic acid) ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไปขึ้นกับระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา, อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรดด่าง

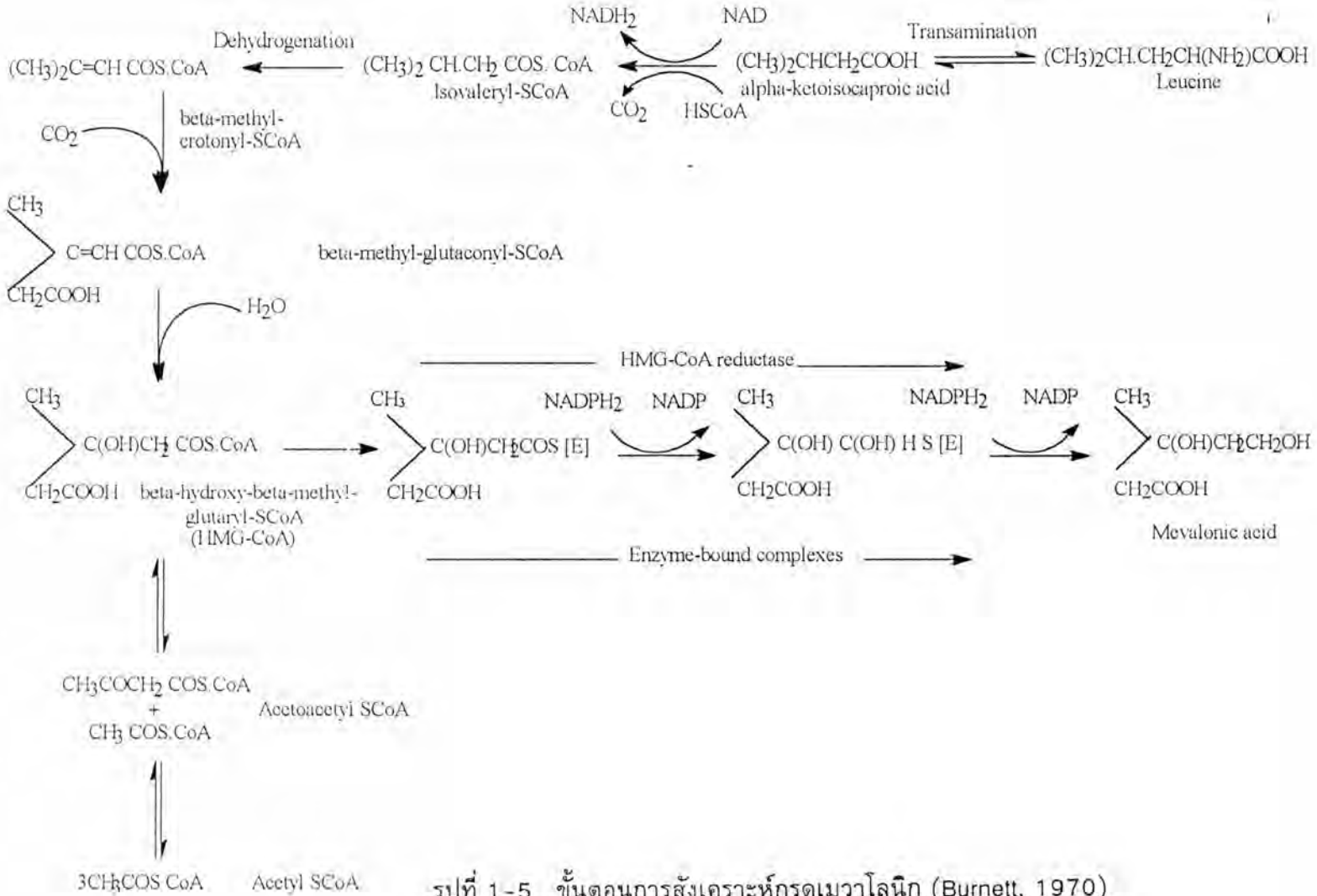
(Pryce, 1973,1974) ซึ่งทำให้ฤทธิ์ทางชีวภาพของจิบเบอเรลลิกสูญเสียไป (Cross, Grove and Morrison, 1961)

1.4 วิถีการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน

วิถีการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินเป็นที่ทราบอย่างชัดเจน แต่ค่อนข้างซับซ้อน สามารถแบ่งได้เป็นขั้นตอนหลักๆ คือ

1.4.1 การสังเคราะห์กรดเมวาโลนิก (mevalonic acid)

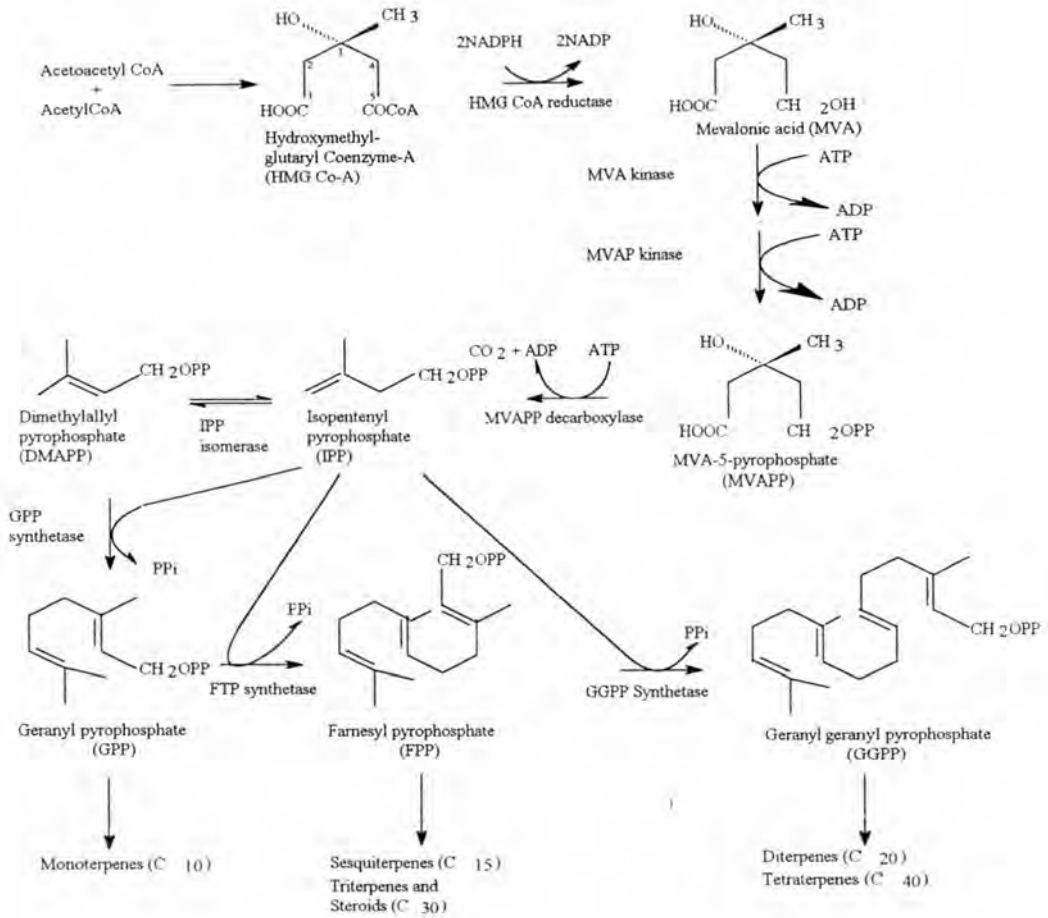
การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินจะผ่านกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพของวิถีไอโซพรีนอยด์ (isoprenoid biosynthesis pathway) โดยเริ่มจากการรวมกันของแอซีทิลโคเอนไซม์เอ (acetyl CoA) 3 โมเลกุล โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์แอซีทิล โคเอนไซม์เอ ทรานส์เฟอเรส เกิดเป็นสารประกอบแอซีโทแอซีทิลโคเอนไซม์เอ (aceto acetyl-CoA) ซึ่งทั้งลิวซีน(leucine) และแอซีโทแอซีทิลโคเอนไซม์เอ สามารถสร้างเป็นกรดเมวาโลนิกได้โดยตรง (Burnett, 1970)ต่อมา แอซีโทแอซีทิลโคเอนไซม์เอ จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น เบตา-ไฮดรอกซิล-เบตา-เมทิล-กลูทาริล-โคเอนไซม์เอ (β-hydroxyl-β-methylglutaryl-SCoA;HMG-CoA) จากนั้นจะเร่งให้มีการสร้างกรดเมวาโลนิก โดยเอนไซม์ไฮดรอกซีเมทิล กลูทาริล โคเอนไซม์เอ รีดักเทส(HMG CoA reductase)ส่วนวิถีการสร้างกรดเมวาโลนิกจากลิวซีน จะเกิดจากปฏิกิริยาทรานส์อะมิเนชัน (transamination), ดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation) ได้สารประกอบเบตา-เมทิล-เบตา-กลูทาโคนิลโคเอนไซม์เอ (β-methyl-glutaconyl-SCoA) จนกระทั่งได้กรดเมวาโลนิก ดังแสดงในรูปที่ 1-5



รูปที่ 1-5 ขั้นตอนการสังเคราะห์กรดเมวาโลนิก (Burnett, 1970)

1.4.2 การสังเคราะห์เจอรานิลเจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranylgeranyl pyrophosphate,GGPP)

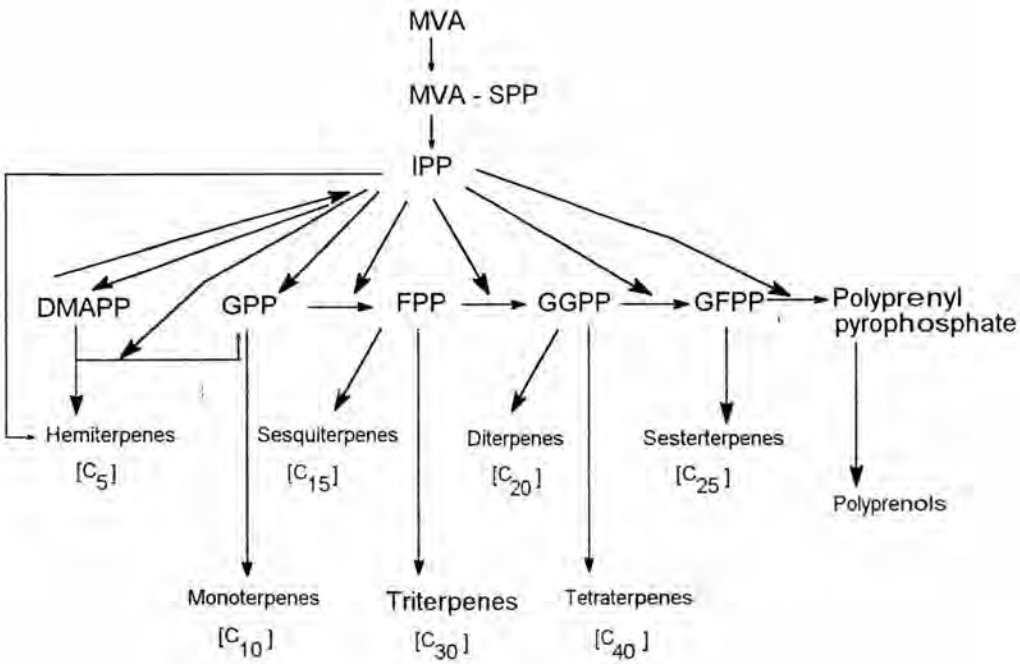
ในขั้นตอนนี้กรดเมวาโลนิกจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดเมวาโลนิก-5-ไพโรฟอสเฟต (mevalonic acid-5-pyrophosphate, MVAPP) โดยการทำงานของเอนไซม์เมวาโลเนทไคเนส (mevalonatekinases) จากนั้นเอนไซม์ไพโรฟอสเฟตเมวาโลเนทดีคาร์บอกซิเลส (pyrophosphate mevalonate decarboxylase) จะเปลี่ยนเมวาโลเนท-5-ไพโรฟอสเฟต เป็นไอโซเพนทินิลไพโรฟอสเฟต (isopentenyl pyrophosphate, IPP) ขั้นตอนต่อมา IPP ถูกเปลี่ยนไปเป็น ไดเมทิลแอลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethylallyl pyrophosphate,DMAPP) โดยเอนไซม์ชื่อ ไอพีพีไอโซเมอเรส (IPP Isomerase) ถือเป็นหน่วยเริ่มต้นของการสังเคราะห์เทอร์พีน ซึ่งจะให้สารที่มีคาร์บอนในโครงสร้าง 10 อะตอม (C_{10}) คือ เจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranyl pyrophosphate, GPP) GPP สามารถรวมตัวกับ IPP เกิดเป็นฟาร์เนซิลไพโรฟอสเฟต (fanesyl pyrophosphate, FPP) ซึ่งเป็นสารที่มีคาร์บอนเป็นโครงสร้าง 15 อะตอม แล้วรวมกับ IPP อีก 1 โมเลกุล เปลี่ยนเป็นเจอรานิลเจอรานิล ไพโรฟอสเฟต ซึ่งมีคาร์บอนในโครงสร้าง 20 อะตอม ดังแสดงในรูปที่ 1-6 (Kumar and Lonsane, 1989; Bruckner *et al.*, 1989; Sponsel, 1995)



รูปที่ 1-6 วิถีการสังเคราะห์ GGPP

1.4.3 การสร้างวงแหวน เอนท์-คอรีน (ent-kaurene)

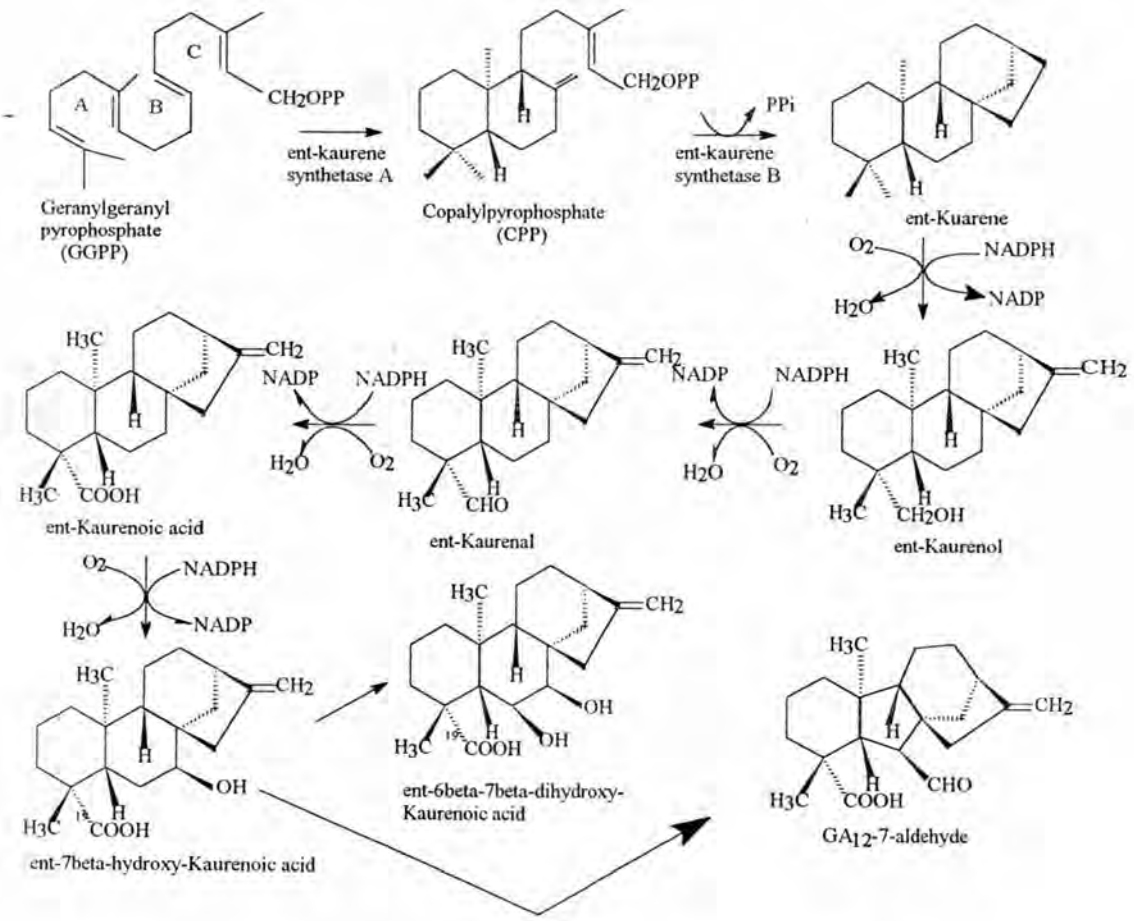
GGPP จะแตกแขนงให้ไดเทอร์พีนแบบเส้นตรง (chain elongation) เช่น ไฟทอล (phytol) ไดเทอร์พีนแบบวงแหวน เช่น คัวรีนอยด์และจิบเบอเรลลิน และเททราเทอร์พีน (tetraterpenes) เช่น แคโรทีนอยด์ (Sponsel, 1995) ดังภาพที่ 1-7



รูปที่ 1-7 วิถีการสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ (Kumar and Lonsane, 1989)

การเกิดวงแหวนเอนท์คอรีนมีสองขั้นตอนด้วยกัน ในขั้นตอนแรก GGPP จะถูกเปลี่ยนเป็น โคพาลิล ไพโรฟอสเฟต (coparyl pyrophosphate) โดยการเกิดอิเลกโทรฟิลิก (electrophilic substitution) ที่พันธะคู่ของตำแหน่งคาร์บอน C_{14} ของ GGPP ได้เป็น โคพาลิล ไพโรฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ คอรีนซินเทส เอ (ent-kuarene synthetase A) ขั้นตอนต่อมาเอนไซม์คอรีนซินเทส บี (ent-kuarene synthetase B) ทำหน้าที่แยกหมู่ไพโรฟอสเฟตไอออน (pyrophosphate ion) ออกไป ได้เป็นวงแหวนเอนท์คอรีน (Shechter and West, 1969) จากนั้นเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่เมทิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 19 จนได้เป็นโครงสร้างอิแนนทิโอเมอร์-คอรีนอล (ent-kaurenol), อิแนนทิโอเมอร์คอรีนาล (ent-kaurenal) และ กรดอิแนนทิโอเมอร์-คอรีโนอิก (ent-kaurenoic acid) ดังแสดงในรูปที่ 1-8 (Shechter and West, 1969; Hedden, 1983)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันดังกล่าว คือ เอนไซม์โมโนออกซิจีเนสในไมโครโซม (microsomal monooxygenase) และต้องการไพริดีน นิวคลีโอไทด์ (NADPH) และโมเลกุลของออกซิเจนในการทำงาน โดยอะตอมของออกซิเจนตัวหนึ่ง ถูกใช้เป็นส่วนประกอบของสารอินทรีย์ และอีกอะตอมถูกรีดิวซ์ไปเป็นน้ำโดยรับอิเล็กตรอนจาก NADPH (Graebe, 1987) จากการศึกษาใน *Marah macrocarpus* พบว่าปฏิกิริยาออกซิเดชันในขั้นตอนเอนท์-คอรีนเปลี่ยนไปเป็นเอนท์-คอรีนอลและจากเอนท์-คอรีนอลไปเป็นกรดเอนท์-คอรีโนอิก สามารถถูกยับยั้งโดยคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) ซึ่งคาร์บอมอนอกไซด์ถูกเปลี่ยนโดยแสงความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แสดงว่าระบบไซโทโครม P-450 เกี่ยวข้องกับตัวรับอิเล็กตรอนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ตัวนี้มีความสำคัญต่อพืชและขั้นตอนในการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Baltz, 1986) หลังจากนั้นเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 ในตำแหน่งที่ 7β- ได้สารประกอบที่เรียกว่า กรดอิแนนทิโอเมอร์-7-เบตา-ไฮดรอกซี คอรีโนอิก (ent-7β-hydroxy kaurenoic acid) (Graebe, 1987) หรืออาจเกิดกรดอิแนนทิโอเมอร์-6-เบตา-7-เบตา-ไดไฮดรอกซี คอรีโนอิก (ent-6β-7β-dihydroxy kaurenoic acid) ซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นจิบเบอเรลลินชนิดต่าง ๆ ได้

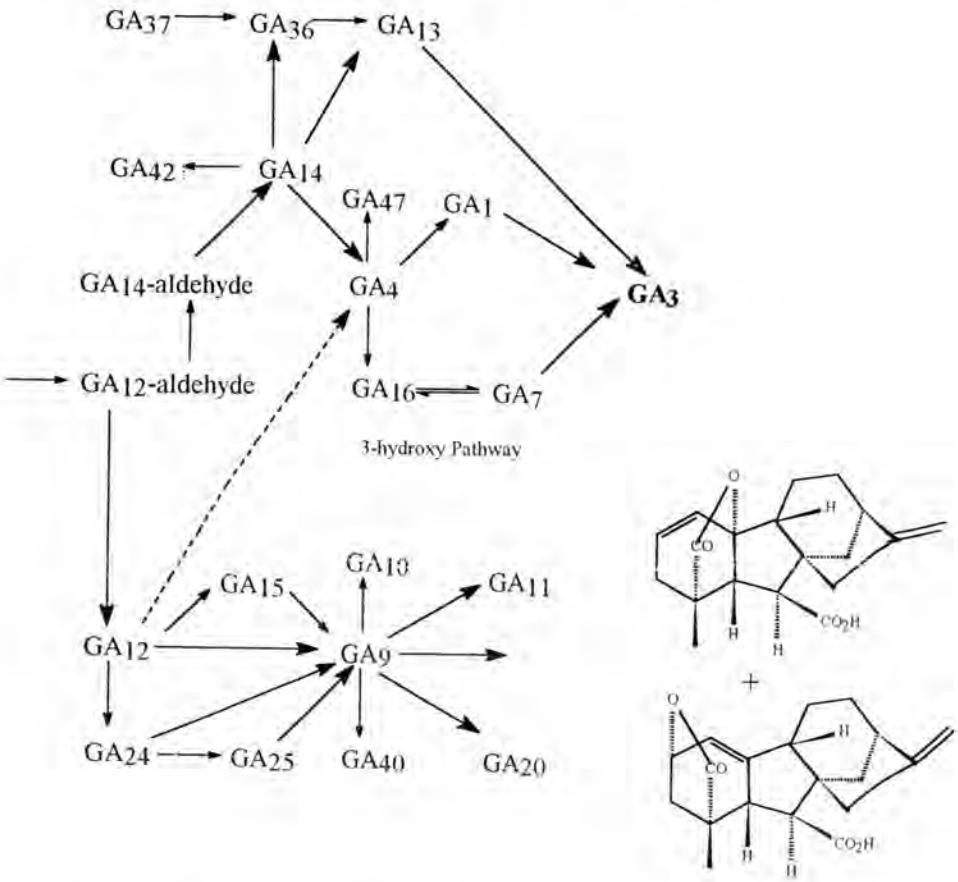


รูปที่ 1-8 วิถีการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน-12-แอลดีไฮด์

1.4.4 การสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน-12-แอลดีไฮด์ (GA_{12}-aldehyde)

กรดอิแนนทิโอเมอร์-7-เบตา-ไฮดรอกซีคอรีโนอิก มีโครงสร้างประกอบด้วยวงแหวน 3 วง เกิดการเปลี่ยนแปลงที่วงแหวนบี (ring B) โดยลดจำนวนคาร์บอนอะตอมลงเหลือ 5 อะตอม โดยที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 7 กลายเป็นหมู่แอลดีไฮด์ ดังนั้นคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 6 และ 8 เกิดพันธะที่ต่อวงแหวนเข้าด้วยกันอีกครั้งเกิดเป็นจิบเบอเรลลิน-12-แอลดีไฮด์ (GA_{12}-aldehyde) รูปที่ 1-8 ซึ่งเป็นสารประกอบตัวแรกที่มีโครงสร้างแบบเอ็นท์-จิบเบอเรลเลน และเปลี่ยนแปลงไปเป็นจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆ ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินตั้งแต่เริ่มต้น กระทั่งได้จิบเบอเรลลิน-12-แอลดีไฮด์ ทั้งในพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์มีวิถีการสังเคราะห์ที่เหมือนกัน แต่จะแตกต่างกันไปหลังจากขั้นตอนการสังเคราะห์ GA_{12}-แอลดีไฮด์ โดยเฉพาะในพืชจะต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืชเป็นสำคัญ (Hedden, Macmillan and Phinney, 1978) ในรา *G. fujikuroi* ผลผลิตหลักในการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินคือ GA_3 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ได้

2 ทาง ทางแรก คือ กระบวนการสังเคราะห์ที่ไม่ผ่านปฏิกิริยา 3-เบตา-ไฮดรอกซิเลชัน (non-3β-hydroxylation) ซึ่งได้จิบเบอเรลลินชนิดที่มีคาร์บอน 20 อะตอม เช่น GA_{12}, GA_{15}, GA_{24} และจิบเบอเรลลินที่มีคาร์บอน 19 อะตอมเช่น GA_9, GA_{10} และ GA_{11} เป็นต้น อีกทางหนึ่ง คือ การสังเคราะห์ที่ผ่านปฏิกิริยา 3-เบตา-ไฮดรอกซิเลชัน (3β-hydroxylation) ได้ GA_{14} แอลดีไฮด์ และเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น GA_{14} และ GA_{37} ซึ่งมีโครงสร้างเป็นคาร์บอน 20 อะตอม เมื่อจำนวนคาร์บอนอะตอมลดลงเหลือ 19 อะตอม จะเกิดเป็น GA_4 และจาก GA_4 ไปเป็น GA_7 โดยปฏิกิริยา 1-2-ดีไฮโดรจีเนชัน (1,2-dehydrogenation) แล้ว GA_7 เกิดปฏิกิริยา 13-ไฮดรอกซิเลชัน (13-hydroxlation) ซึ่งการสร้าง GA_3 ผ่านทาง GA_1 มีน้อยมาก เพียง 0.6 % เนื่องจากความไม่จำเพาะของเอนไซม์ (Beander, MacMillan and Phinney, 1973 อ้างถึงใน Hedden, MacMillan and Phinney, 1978) ดังแสดงในรูปที่ 1-9 ส่วนวิถีการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินในพืชจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช



รูปที่ 1-9 วิถีการสังเคราะห์ GA หลังจากเกิด GA_{12}-แอลดีไฮด์ โดยรา *G. fujikuroi* (Hedden, MacMillan and Phinney, 1978)

1.5 แหล่งที่พบจิบเบอเรลลิน

นับตั้งแต่จิบเบอเรลลินถูกค้นพบ อาจแบ่งแหล่งที่พบได้ 3 แหล่ง คือ

1.5.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

พบว่า มีการใช้ 2-แอลลีออกซีอนิโซล (2-allyoxyanisole) และ 4 - เบนซิลออกซีไซโคลเฮกซาโนน (4 - benzyloxy cyclohexanone) เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน แต่สารตั้งต้นที่ใช้มีราคาแพงเมื่อเทียบกับค่าใช้จ่ายในการผลิตด้วยกระบวนการหมัก (Coley, *et al.*, 1978) นอกจากนี้นักเคมีก็ได้พยายามสังเคราะห์ 1, 2 - ไดไฮโดร - 3 - ไฮดรอกซีจิบเบอเรลลิน แต่มีขั้นตอนที่ค่อนข้างยุ่งยากและซับซ้อนมาก(Turner, *et al.*, 1985) จึงไม่นิยมใช้ในการผลิตเชิงพานิชย์

1.5.2 การสกัดจากพืช

ในธรรมชาติจิบเบอเรลลินเป็นฮอร์โมนพืชที่ถูกสร้างขึ้นโดยพืช ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนและการยืดยาวของเซลล์ และเมื่อทำงานร่วมกับฮอร์โมนพืชชนิดอื่นๆ เช่น ออกซิน จะมีผลทำลายระยะพักตัวของเมล็ด ชักนำให้เมล็ดงอกได้ แม้ปริมาณเพียงเล็กน้อยก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืช (Riley, 1987) แหล่งสังเคราะห์จิบเบอเรลลินพบได้ในหลายส่วนของพืชและมีปริมาณที่แตกต่างกัน พบมากบริเวณยอดอ่อน ปลายรากและเมล็ดที่กำลังงอก มีปริมาณจิบเบอเรลลินประมาณ 0.001 - 1.000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักสดของพืช (Lonsane and Kumar, 1991) ส่วนอื่นๆ เช่น ลำต้น ใบแก่ หรือในรากของพืชบางชนิด เช่น มันฝรั่ง (Sponsel, 1995) พบในปริมาณน้อยและสารจิบเบอเรลลินที่พบส่วนใหญ่จะจับกับสารประกอบอื่นมากกว่าอยู่ในรูปจิบเบอเรลลินอิสระ(Ressell, 1975) ดังนั้นในการผลิตจิบเบอเรลลินโดยสกัดจากพืช จึงต้องใช้พืชเป็นจำนวนมากมายกว่าจะได้ปริมาณจิบเบอเรลลินตามต้องการ จึงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะในการผลิตเพื่อการค้า

1.5.3 การหมักด้วยจุลินทรีย์

เนื่องจากการผลิตจิบเบอเรลลินจากพืช ต้องใช้ต้นทุนในการผลิตสูงดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงมุ่งความสนใจกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตจิบเบอเรลลินหรือสารคล้ายจิบเบอเรลลินได้ ซึ่งมีหลายชนิดเช่นแบคทีเรีย แอกทิโนมัยซีส ยีสต์และรา ดังแสดงในตารางที่ 1-1 และตารางที่ 1-2 ตามลำดับ แต่ *G. fujikuroi* ให้ผลผลิตจิบเบอเรลลินสูงกว่าจุลินทรีย์อื่น ซึ่งคณะวิจัยของบริษัท ICI เป็นผู้ริเริ่มทำการวิจัยและแยกเชื้อราจากพืช

หลายชนิด จนสามารถพัฒนากระบวนหมักผลิตจิบเบอเรลลินเป็นการค้า (Borrow, *et al.*, 1955) ปัจจุบันการผลิตจิบเบอเรลลินเพื่อการค้านิยมใช้การหมักด้วยจุลินทรีย์ โดยเชื้อ *G. fujikuroi* และหลายประเทศที่สามารถพัฒนาเทคโนโลยีจนสามารถผลิตจิบเบอเรลลินออกจำหน่ายทั่วโลก เช่น ญี่ปุ่น อเมริกา อังกฤษ และอิตาลี เป็นต้น (Bruckner and Blechschmidt, 1991a)

ตารางที่ 1-1 แบคทีเรีย แอกทิโนมัยซีส และยีสต์ที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลิน (Kumar and Lonsane, 1989)

จุลินทรีย์	จุลินทรีย์
แบคทีเรีย	แอกทิโนมัยซีส
Arthrobacter sp.	*Actinomyces* sp.
Azospirillum brasilense	*Actinomyces flavus*
A. lipoferum	*Nocardia* sp.
Azotobacter sp.	*Rhizobium phaseoli*
A. chroococcum	*Streptomyces* sp.
A. paspali	
A. vinelandii	ยีสต์
Bacillus brevis	*Candida pulcherrima*
B. cereus	*Torula pulcherrima*
B. megaterium	*Torulopsis* sp.
Brevibacterium sp.	
Flavobacterium sp.	
Pseudomonas sp.	
P. fluorescens	
P. fragi	

ตารางที่ 1-2 ราที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้
(Kumar and Lonsane,1989)

จุลินทรีย์
Agaricus bipoours
Alternaria sp.
Aspergillus niger
A. flavus
A. fumigatus
Bulotus eleqaus
Botryodiploidea theobromae
Chaetomium sp.
Clitocybe dicolor
Fusarium avenaceum
F. culmorum
F. herbanum
F. heterosporum
F. moniliforme
F. oxysporum
Gibberella fujikuroi
(imperfect *F. moniliforme*)
G. lateritium
G. zeae
Geophita fasicularis

1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน

ในการพัฒนาเทคโนโลยีกระบวนการหมักโดยเชื้อราเพื่อให้สามารถผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณสูง ขึ้นกับปัจจัยหลัก 2 ประการ คือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์และภาวะที่เหมาะสมในการหมัก (Elander,1989) โดยเฉพาะปัจจัยทางกายภาพ (physical factors) และ ปัจจัยด้านสารอาหาร(nutritional factors) ซึ่ง Demain (1986) ได้รายงานว่า แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส การชักนำเอนไซม์ และปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ค่าความเป็นกรดด่าง และแสง ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) และการสร้างสารทุติยภูมิจะลดลง เนื่องมาจากยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หนึ่งชนิดหรือมากกว่าในวิถีการสังเคราะห์สารนั้น

1.6.1 ประสิทธิภาพของสายพันธุ์

หลักการสำคัญในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ เช่น สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเพิ่มมากขึ้น คือ การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagens) เช่น รังสีหรือสารเคมีบางชนิด (Baltz,1986) Avalos, Casadesus and Cerda-Olmedo (1985) ได้ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *G. fujikuroi* IMI-58289 โดยใช้รังสียูวี และ เอ็น - เมทิล - เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (N'-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; NTG) เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ โดยใช้ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าได้สายพันธุ์ใหม่ ที่ให้ลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันออกไป ต่อมา Kloblin และคณะ (1990) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของสารก่อการกลายพันธุ์ใน *G. fujikuroi* พบว่า NTG มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกและการสร้างรงควัตถุ แสงยูวีเป็นตัวชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อการสร้างรงควัตถุ และเมื่อใช้ยูวี ร่วมกับ NTG พบว่า สายพันธุ์กลายส่วนมากจะมีการผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 60 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ดังนั้นเมื่อได้สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ จะส่งผลให้ได้หัวเชื้อที่มีคุณภาพ

1.6.1.1 หัวเชื้อสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน

จากรายงานของวันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532)ในการหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมของ *G. fujikuroi* C เพื่อผลิต GA_3 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า อายุหัวเชื้อที่เหมาะสมอยู่ในระยะกึ่งกลางช่วงทวีคูณ (mid-log phase) คือ ที่ 70-72 ชั่วโมง ต่อมา อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) รายงานว่า อายุของหัวเชื้อที่ระยะกึ่งกลางช่วงทวีคูณของ *G. fujikuroi* F4W- 6 (9) อยู่ที่ 60 ชั่วโมง ขณะที่ศุภชัย สมัปปิโต (2537) รายงานว่า *G. fujikuroi* N9-34 เจริญเข้าสู่ระยะกึ่งกลางช่วงทวีคูณที่เวลา 48 ชั่วโมง เป็นอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิต GA_3 ซึ่งสอดคล้องกับอุษามาส วังชัยสุนทร(2538) และปริมาณหัวเชื้อที่นิยมใช้คือร้อยละ 10 (ปริมาตรหัวเชื้อต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) (Gancheva and Dimova, 1984)

1.6.2 ปัจจัยด้านสารอาหาร

1.6.2.1 แหล่งอาหารคาร์บอน

ในการผลิตจิบเบอเรลลิน แหล่งคาร์บอนจัดเป็นสารอาหารที่สำคัญที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ในการสร้างในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ โดยนำไปสร้างส่วนประกอบของเซลล์และผลิตภัณฑ์จากเซลล์ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า *G. fujikuroi* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส แป้ง กลีเซอรอล แลกโทส กากน้ำตาล น้ำแช่ข้าวโพด หางนม น้ำมันพืช เมล็ดฝ้ายบด ซึ่งมีทั้งชนิดที่เซลล์นำไปใช้ได้ง่ายและชนิดที่เซลล์นำไปใช้ยาก หรืออาจมีการนำทั้ง 2 ชนิด ไปใช้ร่วมกัน ดังเช่น Darken, Jenson and Shu (1959) ได้ทดลองเลี้ยง *G. fujikuroi* CMI-917 ในสูตรอาหารที่มี กลูโคส แลกโทสและกลีเซอรอล ในอัตราส่วน 10:20:20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ได้ปริมาณ GA_3 สูงสุด เท่ากับ 880 มิลลิกรัมต่อลิตร Borrow และคณะ (1964) รายงานว่า การใช้กลูโคสเริ่มต้น ที่มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 30 ขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ผลผลิตจิบเบอเรลลินลดลงเพราะเกิดการยับยั้งโดยซับสเตรต(substrate inhibition) และยังมีรายงานว่า การใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคส(Vass and Jeffery, 1979)นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมน้ำมันพืช เช่น น้ำมันลินซีด น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันมะกอกหรือน้ำมันจากเมล็ดฝ้าย ได้ปริมาณ GA_3 มากกว่าเมื่อใช้ซูโครส 3 - 6 เท่า เนื่องจากมีการเพิ่มของชีวมวล (biomass) ระยะเวลาการผลิตนานขึ้น ทำให้ผลผลิตสูงขึ้น (Muromtsev and Dubovaya, 1964 อ้างถึงใน Kumar and Lonsane, 1989)

1.6.2.2 แหล่งอาหารไนโตรเจน

ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการผลิตจิบเบอเรลลินอย่างมาก เนื่องจากวิถีการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินถูกควบคุมโดยเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน กล่าวคือ การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินจะเริ่มขึ้นเมื่อแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมดไป (Rybakov and Bourd, 1991 ; Bruckner and Blechschmidt, 1991b ; Candau, Avalos and Cerda-Olmedo,1992 ; Sanchez-Fernandez, Avalos and Cerda-Olmeda, 1997) แต่ในทางกลับกัน ถ้าปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปจะมีการสร้างเส้นใยมากกว่าสร้างผลผลิต และถ้ามากเกินความจำเป็นจะเกิดแคแทบอลิก รีเพรสชัน(catabolic repression)โดยเฉพาะไนโตรเจนที่อยู่ในรูปแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) และไนเตรต (NO_3^-) จะมีผลต่อการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ GA_4-1,2-dehydrogenase (Bearder, *et al.*, 1979 อ้างถึงใน Rybakov and Bourd, 1991) นอกจากนี้ Bruckner and Blechschmidt (1991) รายงานว่า แอมโมเนียมซัลเฟต 19 มิลลิโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและให้ผลผลิต GA_3 สูงสุดถึง 1,250 มิลลิกรัมต่อลิตร โดย *G. fujikuroi*-m567 เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตจิบเบอเรลลินหลายชนิดสามารถใช้ได้ทั้งที่อยู่ในรูปไนโตรเจนอินทรีย์และไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด แอมโมเนียมซัลเฟต (Darken *et al.*, 1959 ; Fuska *et al.*, 1961) แอมโมเนียมแอซีเทต แอมโมเนียมไนเตรต (Jeffery, 1970) กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ใช้ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต (วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์, 2532 ; ศุภชัย สมัปปิโต, 2537)

1.6.2.3 แร่ธาตุเสริม

Stanbury และ Whitaker (1989) รายงานว่า แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่มักจะใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Mg P S Ca Cl และ trace elements เช่น Co Cu Fe Mn Mo และ Zn เป็นต้น โดยทั่วไป trace elements บางส่วนอาจเจือปนมากับน้ำที่ใช้เตรียมอาหาร หรือปนมากับสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร เช่น กากถั่วเหลือง และน้ำแช่ข้าวโพด ส่วนแร่ธาตุที่สำคัญสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน คือ Mg เพราะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด ในวิถีการผลิตจิบเบอเรลลิน (Sponsel,1995) นอกจากนี้ อรไท สุขเจริญ (2533)รายงานว่า การเติมอะลูมิเนียมออกไซด์ 0.10 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ปริมาณ GA_3 สูงกว่าเมื่อไม่เติม

1.6.3 ปัจจัยทางกายภาพ

1.6.3.1 อุณหภูมิ

Togashi (1949) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของราบนอาหารวุ้นแข็ง พบว่าอุณหภูมิต่ำสุดที่รา *G. fujikuroi* สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 3-12 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 25-30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อพอจะเจริญได้ คือ 35 - 40 องศาเซลเซียส (Togashi, 1949 อ้างถึงใน Borrow *et al.*, 1964) ต่อมา Borrow และคณะ (1964) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของรา *G. fujikuroi* พบว่า อุณหภูมิที่ต่ำที่สุดสำหรับการเจริญเติบโต คือ 8 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 29 - 32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่สูงที่สุดที่เชื้อเจริญได้บ้าง คือ 38 องศาเซลเซียส แต่พบว่าไม่มีการเจริญเลยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึง 40 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Jeffery(1970)รายงานภาวะการเลี้ยงราโดยควบคุมอุณหภูมิเป็น 2 ช่วง คือช่วงที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อ คือ 31-32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน 29 องศาเซลเซียส (Jeffery, 1970)

ดังนั้นจากการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับราแต่ละสายพันธุ์สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1-3

1.6.3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตจิบเบอเรลลิน จากรายงานของ Stodola และคณะ (1955) พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 3.5-5.8 และไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการหมัก (Holme and Zacharias,1965 อ้างถึงใน Kumar and Lonsane,1989) ซึ่งสอดคล้องกับ อรไท สุขเจริญ (2533) ที่รายงานว่า การไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก ให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่า เมื่อเทียบกับการหมักที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก เท่ากับ 7 นอกจากนี้ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532) รายงานว่า ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7 เหมาะสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ C ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) โดยใช้เชื้อ *G. fujikuroi* F4W-6(9) และสอดคล้องกับ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) โดยใช้เชื้อ *G. fujikuroi* N9-34 ในการหมัก

ตารางที่ 1-3 สายพันธุ์ของ *G. fujikuroi* และอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงราแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	รายการอ้างอิง
F. moniliforme	25	Stodola *et al.* (1955)
G. fujikuroi U	25	Fuska *et al.* (1961)
G. fujikuroi ACC 917	26	Malnnés *et al.* (1977)
G. fujikuroi 917	28	Darken, Jenson and Shu (1959)
G. fujikuroi (Saw.) Wr.	29	Borrow (1964)
G. fujikuroi-	30	Sanchez-Marroquin (1963)
G. fujikuroi-	34	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.,1983 อ้างถึงใน Kumar and Lonsane,1989)
G. fujikuroi C	25	อรไท สุขเจริญ (2533)
G. fujikuroi F4W-6(9)	28	อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536)
G. fujikuroi N9-34	25	ศุภชัย สมัปปิโต (2537) ; สันติ เหมศรี (2539)
G. fujikuroi UNN-653	28	อุษามาส วังชัยสุนทร (2538)
G. fujikuroi UV-354, UN-62, และ U2N-12	33	ขวัญฤทัย อินสวน (2539)

1.6.3.3 อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน

ออกซิเจน เป็นธาตุที่มีความสำคัญสำหรับจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน (aerobe) เช่น *G. fujikuroi* เป็นต้น ปริมาณออกซิเจนในอาหารจะเป็นตัวควบคุมอัตราการเจริญและการผลิตสารเมแทบอไลท์ และความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย กล่าวคือ ถ้าใช้แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้อย่างรวดเร็ว ความเข้มข้นสูง จะทำให้จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็วและมีความต้องการออกซิเจนปริมาณสูง จนอาจเกินความสามารถในการให้อากาศของถังหมักได้ ส่วนประกอบบางชนิดของอาหาร เช่น แป้ง หรือพอลิแซ็กคาไรด์ อื่นๆ จะทำให้เกิดความหนืดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการให้อากาศและการกวนผสม หรือสารกำจัดฟองบางชนิด จะทำให้อัตราการส่งผ่าน

ออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ลดลงได้ (Stanbury and Whitaker, 1989) ในวิถีการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำเกินไปจะทำให้การผลิต GA_3 ลดลง เนื่องจาก ไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็น แอซีทิล โคเอนไซม์เอ ได้น้อยลง (Geissman *et al.*, 1966) จากรายงานของ อรไท สุขเจริญ(2533) พบว่า อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ C ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) เมื่อใช้สภาวะดังกล่าวกับเชื้อ *G. fujikuroi* F4w-6(9) แต่ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) พบว่าอัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที เหมาะสำหรับการผลิต GA_3 โดยเชื้อ *G. fujikuroi* N9-34 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เนื่องจากส่วนประกอบของอาหารที่ใช้บางชนิดแตกต่างกัน กล่าวคือ สูตรอาหารของศุภชัย สมัปปิโต ใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันออกแล้วแต่ไม่ผ่านการย่อยเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 5.90 กรัมต่อลิตร จะมีลักษณะสารเนื้อผสม ซึ่งจะลดความสามารถในการถ่ายเทออกซิเจนให้กับเซลล์ได้ ในขณะที่สูตรอาหารของอรไท สุขเจริญ(2533) นั้นใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองน้อยกว่า คือใช้ประมาณ 1.80 กรัมต่อลิตร และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเพียง 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นในสูตรของศุภชัยจึงจำเป็นต้องใช้อัตราการกวนที่สูงขึ้นดังกล่าว แต่อัตราการกวนที่สูงมากเกินไปจะทำให้สายใยของราแตกหักได้ และส่งผลให้ความสามารถในการผลิต GA_3 ลดลง

1.7 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ในปัจจุบันมีการนำจิบเบอเรลลินมาใช้ประโยชน์หลายด้าน ด้านเกษตรกรรม มีการนำ GA_3 มาใช้กระตุ้นการงอกของเมล็ดและตา ในเมล็ดผักกาดหอม ส้ม องุ่น หัวมันฝรั่ง หัวแกลดิโอรัส และเร่งการแตกตาขององุ่นบางสายพันธุ์ เพิ่มการติดผล ของมะเขือเทศ โดยไม่ต้องมีการผสมเกสร เปลี่ยนเพศดอก ในพืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา โดยเปลี่ยนให้มีดอกตัวผู้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์และการผลิตเมล็ดพันธุ์ เร่งการเกิดดอกในพืชที่มีลักษณะทรงพุ่มกระจุก (rosette) เช่น ผักกาดหอม ผักกาดขาวปลี กะหล่ำปลี โดย GA_3 ทำให้ลำต้นยืดยาวขึ้นและช่วยให้เกิดดอกในกรณีที่อากาศเย็นไม่เพียงพอ ส่วนในด้านอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมผลิตเบียร์ นำ GA_3 มาใช้กระตุ้นการงอกของเมล็ดข้าวบาเล่ย์เพื่อให้ได้ข้าวมอลท์ ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ ทำให้เมล็ดข้าวงอกโดยใช้ระยะเวลาเพียง 2-3 วัน ซึ่งโดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 4-6 วัน อุตสาหกรรมการผลิตไวน์ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อุตสาหกรรมสวนส้ม รวมทั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะใช้ GA_3 ปริมาณ 0.1-0.5 ไมโครโมล ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น ใช้เป็นส่วนประกอบในแฮร์โทนิค ปริมาณร้อยละ 0.01-0.1 ในครีมร้อยละ 0.05 (Bruckner and Blechschmidt, 1991a ; Pakinson, 1985 ; Ayukawa,1985) จึงส่งผลให้ความต้องการ GA_3 ในประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นมูลค่านับหลายล้านบาทต่อปี ถึงแม้จะไม่มีสถิติการนำเข้าเป็นตัวเลขที่แน่นอนก็ตาม ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีด้านกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินขึ้นเองภายในประเทศย่อมจะส่งผลดีอย่างแน่นอน สถาบันเทคโนโลยีและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับการผลิตจิบเบอเรลลินอย่างต่อเนื่อง ทั้งการปรับปรุงพันธุ์และการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลิน รวมระยะเวลาประมาณ 10 ปี มีลำดับดังต่อไปนี้

วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ *G. fujikuroi* และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลิน ในระดับขวดเขย่า

อรไท สุขเจริญ (2533) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลินในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย *G. fujikuroi* C เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดย*G. fujikuroi* F4W-6(9) ในระดับถังหมัก 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

อุษามาส วังชัยสุนทร(2538) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินของ *G. fujikuroi* N9-34 โดยการกลายพันธุ์ และได้สายพันธุ์ UNN-653ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญและให้ผลผลิตสูงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และ ขวัญฤทัย อินสวน(2539) ได้ทำการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญและมีประสิทธิภาพการผลิต

จิบเบอเรลลินที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสได้สายพันธุ์ UV-354 UN-62 และ U2N-12 โดยมีเชื้อ UNN-653 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์รา *G. fujikuroi* ที่มีความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลินที่อุณหภูมิสูงย่อมส่งผลดีต่อกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินในประเทศไทย โดยจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนของระบบหล่อเย็น (cooling system)ของถังหมัก แต่จากรายงานของขวัญฤทัย อินสวน(2539)พบว่าที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียสกลับให้ผลผลิตต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 33 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการวิจัยนี้ จะดำเนินการต่อเนื่องจากงานวิจัยของ ขวัญฤทัย อินสวน (2539) โดยนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน ในระดับขวดเขย่า และศึกษาประสิทธิภาพการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นแนวทางการผลิตในระดับขยายส่วนและระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.8 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1.8.1 ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลเบื้องต้น

1.8.2 คัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *G. fujikuroi* ที่สามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

1.8.3 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่า

1.8.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ในระดับถังหมัก ขนาด 5 ลิตร