หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

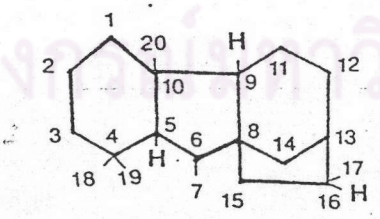
บทที่ 1

บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา

จิบเบอเรลลิน (Gibberellin) เป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่งที่มีผู้พบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ 1890 จากการเกิดโรคกับต้นข้าวที่ทำให้ต้นข้าวสูงชลูดผิดปกติ ชาวญี่ปุ่นเรียกโรคนี้ว่า บากานี (Bakanae) ซึ่งต่อมาพบว่าอาการของโรคเกิดจากสารที่ผลิตจากเชื้อรา Gibberella fujikuroi ในต้นข้าว ในปี ค.ศ 1926 Kurosawa ได้ประสบผลสำเร็จในการสกัดสารที่ทำให้เกิดโรคบากานี หลังจากนั้น 12 ปี Yabuta และ Hayashi สามารถแยก และตกผลึกสารนี้ได้สำเร็จและตั้งชื่อสารดังกล่าวนี้ว่า จิบเบอเรลลินตามชื่อสกุลของเชื้อรา และต่อจากนั้นมาจึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับจิบเบอเรลลินกันมากยิ่งขึ้นทั้งสูตรโครงสร้าง การสังเคราะห์ การใช้ประโยชน์ กระบวนการผลิต วิธีการตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน และคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช (1)

จิบเบอเรลลินจัดเป็นสารพวกไดเทอร์ปีน (diterpene) ซึ่งปัจจุบันพบทั้งในเชื้อรา แบคทีเรีย ยีสต์ และในพืชชั้นสูงรวมทั้งสิ้น 68 ชนิด (2) โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นเตตราคาร์บอกไซลิกจิบบาน (tetracarboxylic gibbane) ดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วนที่แตกต่างกันแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับหมู่ที่ต่อกับตำแหน่ง C-19 หรือ C-20 ตำแหน่งและปริมาณของพันธะคู่และหมู่ไฮดรอกซี (3) ซึ่งทำให้คุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชแตกต่างกัน ในทางการเกษตรแล้วจิบเบอเรลลินที่นิยมใช้กันมาก คือ GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยจะใช้ในการยืดช่ออ่อนให้ยาว เพื่อลดการเบียดของผลอ่อนในช่อ ทำให้ผลอ่อนสามารถโตได้เต็มที่ นอกจากนี้ยังใช้ช่วยชะลอการพักตัวของหัวมันฝรั่ง กระตุ้นการติดผลมะเขือเทศ มะม่วง และยังกระตุ้นการสร้างเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสของเมล็ดธัญพืช สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์ เป็นต้น (4)



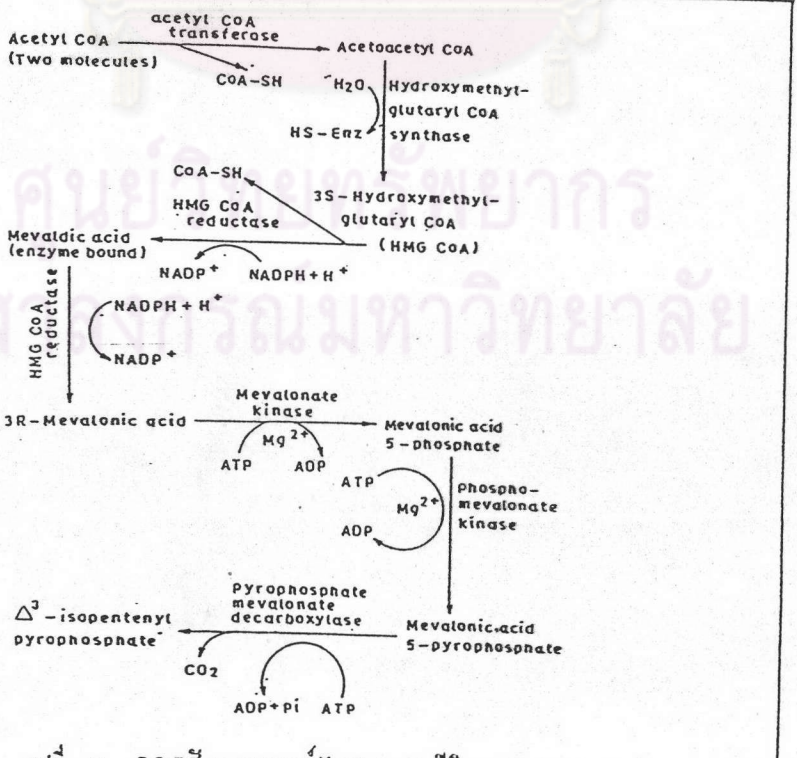
รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของเตตราคาร์บอกไซลิกจิบบาน

2. กระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Biosynthesis Pathway) โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi

การผลิตจิบเบอเรลลินในระดับอุตสาหกรรม จะเป็นการผลิตจิบเบอเรลลินจากเชื้อ Gibberella fujikuroi ทั้งนี้เนื่องจากการสกัดจิบเบอเรลลินจากพืชนั้นจะได้ปริมาณน้อย ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง ส่วนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินโดยเชื้อ Gibberella fujikuroi นั้นค่อนข้างสลับซับซ้อน เพราะจิบเบอเรลลินเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่มีทั้งวงแหวนเบนซีน (benzene ring) และวงแหวนเฟอฟูรัล (furfural ring) กระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินอาจแบ่งได้เป็น 5 ขั้นตอนดังนี้ คือ

2.1 การสังเคราะห์ไอโซเพนทีนิล ไพโรฟอสเฟต (Isopentenyl Pyrophosphate)

เริ่มจากอะซิทิล โค เอ (acety Co A) 2 โมเลกุลรวมตัวกันเป็นอะซิโตอะซิทิล โค เอ (acetoacetyl Co A) โดยอะซิทิล โค เอ ทรานเฟอเรส (acetyl Co A transferase) และทำปฏิกริยากับอะซิทิล โค เอ โมเลกุลที่ 3 ทำให้ได้ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาริล โค เอ (3-hydroxymethyl-glutaryl Co A) ซึ่งจะถูกรีดิวส์ต่อได้เป็นกรดเมวาลดิค (mevaldic acid) หลังจากนั้นจะผ่านขั้นตอน ต่อๆไปจนได้ ไอโซเพนทีนิล ไพโรฟอสเฟต (Δ^3-isopentenyl pyrophosphate,IPP) โดยปฏิกริยาฟอสฟอรีเลชัน (phosphorylation) และไอโซเมอไรเซชัน (isomerization)(1) ดังแสดงในรูปที่ 2



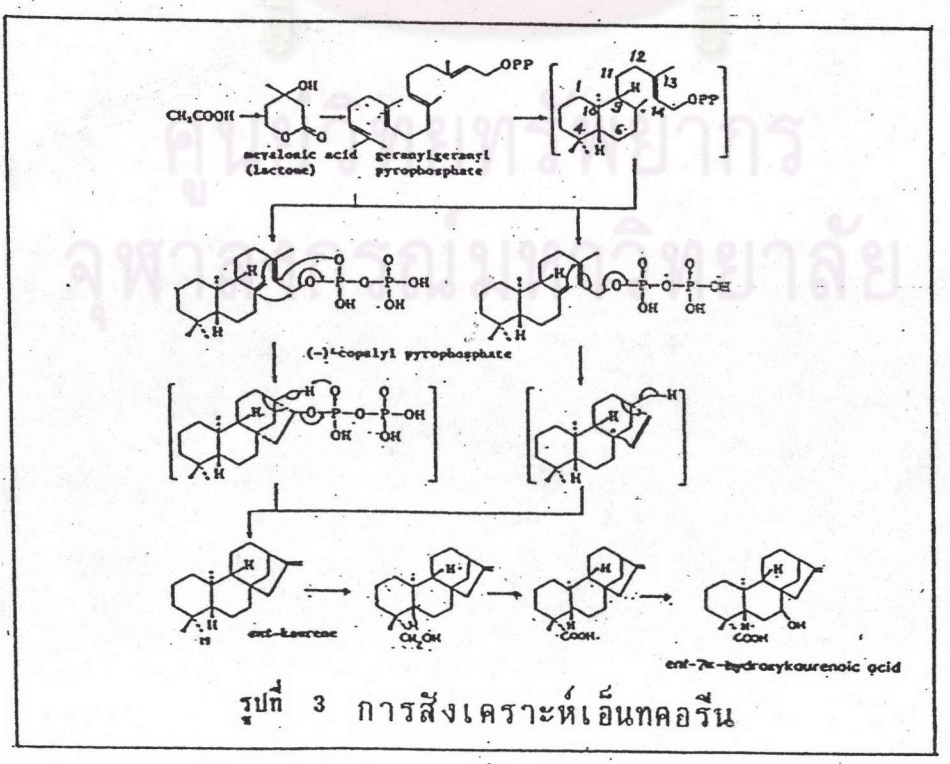
รูปที่ 2 การสังเคราะห์ไอโซเพนทีนิล ไพโรฟอสเฟต

2.2 การสังเคราะห์เทอร์ปีน และเทอร์ปีนนอยด์

IPP เป็นสารตั้งต้นที่ต่อไปสามารถจะเปลี่ยนเป็นเทอร์ปีน และเทอร์ปีนนอยด์ชนิดต่างๆ โดย IPP จะเปลี่ยนเป็นไดเมทิลอัลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethyl-allyl pyrophosphate, DMAPP) ด้วยเอมไซม์ซัลไฮดริล (sulfhydryl enzyme) และไอพีพี ไอโซเมอเรส (IPP isomerase) ทั้ง IPP และ DMAPP จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นเฮมิเทอร์ปีน (hemiterpenes) และ DMADP ซึ่ง DMAPP เป็นสารที่จะรวมตัวกับ IPP 1 โมเลกุลได้เป็น เจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranylpyrophosphate,GPP) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปสร้างเทอร์ปีนอื่นๆ หรือรวมตัวกับ IPP อีก 1 โมเลกุล เป็นฟาร์เนซิล ไพโรฟอสเฟต (farnesyl pyrophosphate ,FPP) และ FPP นี้ยังสามารถที่จะเปลี่ยนเป็นสารอื่นต่อไป หรือรวมตัวกับ IPP เพื่อทำให้ได้สารที่มีโครงสร้างยาวขึ้นเป็น เจอรานิล เจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranyl geranyl pyrophosphate ,GGPP)(5)

2.3 การสังเคราะห์เอ็นทคอรีน (ent-kaurene)

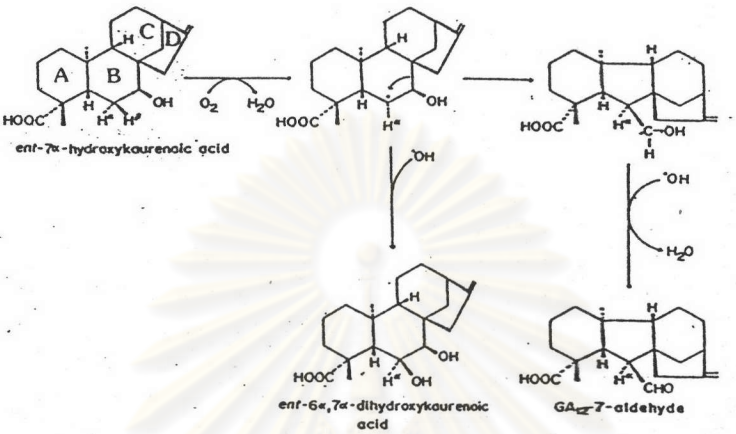
การเกิดวงแหวนของเอ็นทคอรีน เริ่มจาก GGPP ถูกเปลี่ยนเป็นโคพาลีลไพโรฟอสเฟต (copalyl pyrophosphate) ดังแสดงในรูปที่ 3 โดยการเกิดอิเลคโตรฟิลิค (electrophilic) ที่ตำแหน่ง C-14 ของเจอรานิล เจอรานิลไพโรฟอสเฟต พร้อมกับการแยกไพโรฟอสเฟต อิออน (pyrophosphate ion) ออกไป โดยอาศัยเอ็นทคอรีน ซินเทส (ent-kaurene synthase) ได้วงแหวนของเอ็นทคอรีนอล (ent-kaurenol) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นเอ็นทคอรีนาล (ent-kaurenal) กรดเอ็นทคอรีนออิก(ent-kaurenoic acid) และกรดเอ็นทไฮดรอกซีคอรีนออิก ตามลำดับ (1,6)



รูปที่ 3 การสังเคราะห์เอ็นทคอรีน

2.4 การสังเคราะห์ GA_{12} อัลดีไฮด์ (GA_{12}-aldehyde)

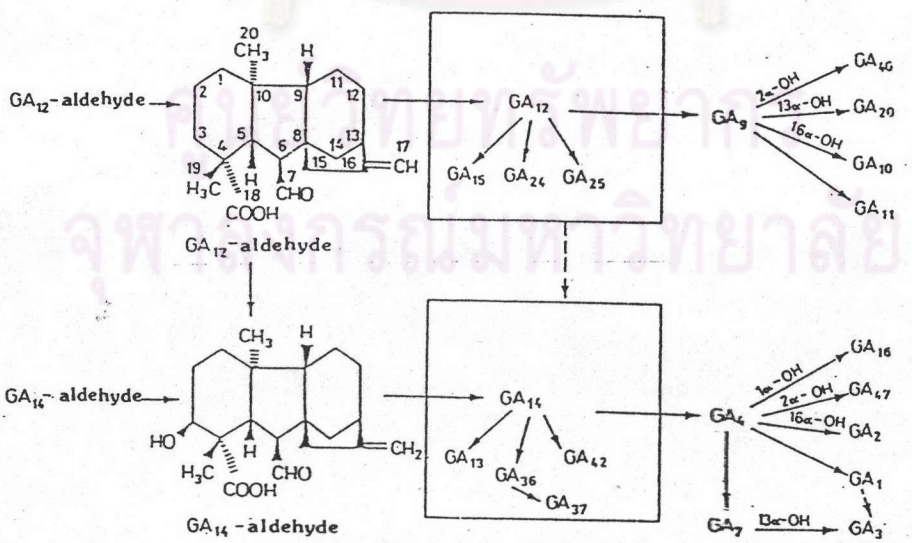
มีการเปลี่ยนวงแหวนเบนซีน บี ของกรดเอ็นทไฮดรอกซีคอรีนออิก ให้เป็น GA_{12} อัลดีไฮด์ ซึ่งเป็นวงแหวนเฟอฟูรัล โดยเปลี่ยนตำแหน่ง C-7 ของกรดเอ็นทไฮดรอกซีคอรีนออิก ให้เป็นอัลดีไฮด์ และสร้างพันธะใหม่ขึ้นที่ตำแหน่ง C-6 กับ C-8 (7) ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 การสังเคราะห์ GA_{12} อัลดีไฮด์

2.5 การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินชนิดต่างๆ

จาก GA_{12}-อัลดีไฮด์ จะมี 2 วิถีทางคือ ทางไฮดรอกซีเลชัน(3β-hydroxylation) และนอนไฮดรอกซีเลชัน(non-3β-hydroxylation) โดยวิถีทางแรกจะได้ GA_1-GA_4 GA_7 GA_{13}-GA_{14} GA_{16} GA_{36} GA_{42} และ GA_{47} ในขณะที่วิถีทางหลังจะได้ GA_9-GA_{12} GA_{15} GA_{20} GA_{24}- GA_{25} และ GA_{40} (8,9) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินชนิดต่างๆ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การพัฒนากระบวนการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi

หลังจากได้มีการค้นพบและตกผลึกจิบเบอเรลลินเป็นผลสำเร็จในปี ค.ศ 1938 ต่อมาในปี ค.ศ 1949 Yabuta และ Hayashi (10) พบว่าการผลิตจิบเบอเรลลินบนผิวหน้าอาหารเหลว (surface culture) ในแหล่งอาหารที่ประกอบด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 3 แอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 0.3 และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.3 โดยปรับให้อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นมีพีเอชเป็น 3.2 เชื้อสามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 30 วัน เนื่องจากการหมักโดยวิธีดังกล่าวให้ผลผลิตต่ำและใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน การควบคุมสภาวะในการผลิตจิบเบอเรลลินยุ่งยาก จึงได้มีการพัฒนาการผลิตจิบเบอเรลลินเป็นการหมักในอาหารเหลว (submerged culture) ซึ่งมีการศึกษากันมากดังแสดงในตารางที่ 1 และต่อมา Borrow และคณะ (12) พบว่าการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi นั้นถูกควบคุมด้วยปรากฏการณ์ที่เรียกว่าคาร์บอนคะตาโบไลท์รีเพรสชัน (carbon catabolite repression) จึงได้มีผู้ศึกษาถึงการเติมสารแหล่งคาร์บอน เช่น กลูโคส ซูโครส กลีเซอรอล อย่างต่อเนื่องในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการหมักโดยวิธีเฟดเบช (fed batch) โดย Borrow และคณะ (12) พบว่าการรักษาปริมาณกลูโคสในถังหมักให้อยู่ในช่วง 20 ถึง 40 กรัมต่อลิตร จะสามารถเพิ่มผลการผลิตจิบเบอเรลลินได้ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเติมสารเทอร์ปีน (terpenes) ซึ่งเป็นสารอยู่ในวิถีทางการผลิต (biosynthesis pathway) ของจิบเบอเรลลินด้วย เช่น กรดเมวาโลนิกแลคโทน (mevalonic acid lactone) คอรีน (kaurene) และไอโซคอรีน (isokaurene) ในระหว่างการผลิตจิบเบอเรลลิน (15,17) และในปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินโดยวิธีอื่นๆ คือ วิธีการตรึงสายใย Gibberella fujikuroi โดยใช้ โซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) (18) คาร์ราจีแนน (carrageenan) (19) และการหมักบนอาหารแข็ง (20) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวยังเป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ และยังเป็นกระบวนการที่ให้ผลผลิตของจิบเบอเรลลินในระดับที่ต่ำอยู่

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและสภาวะในการเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในถังหมัก

ชนิดของจุลินทรีย์	สารแหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	สารแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	พีเอชเริ่มต้น	อุณหภูมิ (°ซ)	ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (วัน)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Fusarium moniliforme	แป้งมันสำปะหลัง 30 กลีเซอรอล 30	-	-	30	7	GA_3 650	11
Gibberella fujikuroi	กลูโคส 80	แอมโมเนียมไนเตรท 2.4	-	26.2	20	GA_3 1002	12
Gibberella fujikuroi	กลูโคส 40	แอมโมเนียมทาเตรท 9.5	5.0	25	15	GA_3 40	9
Fusarium moniliforme	กลูโคส 15	แอมโมเนียมคลอไรด์ 3.0	-	25	-	GA_3 13	13
Gibberella fujikuroi	กลูโคส 150	แอมโมเนียมไนเตรท 2.5	5.8	26.2	13	GA_3 209	14
Gibberella fujikuroi	กลูโคส 120	แอมโมเนียมทาเตรท 4.6	-	25	9	GA_3 326	15
Gibberella fujikuroi	กลูโคส 100	แอมโมเนียมไนเตรท 1.2	7.0	28	10	GA_3 210 GA_7 30	16
Gibberella fujikuroi	กลูโคส 150	แอมโมเนียมไนเตรท 4.0	-	26	25	GA_3 1102	17

หมายเหตุ เครื่องหมาย - หมายถึง ไม่มีรายงานระบุค่าหรือวิธีการที่ใช้ ดังนั้นปริมาณจิบเบอเรลลินที่รายงานนั้นอาจมาจากการวิเคราะห์ที่แตกต่าง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi

4.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1.1 สารแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้โดยทั่วไปในการผลิตจิบเบอเรลลิน คือ กลูโคส ซูโครส หรือ แลคโตส เป็นต้น และการใช้แหล่งคาร์บอนหลายชนิดร่วมกัน จะทำให้ได้ปริมาณจิบเบอเรลลินเพิ่มขึ้นได้ โดยที่ Darken และคณะ (11) ได้ศึกษาถึงการใช้แหล่งคาร์บอนหลายชนิดร่วมกัน และได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสัดส่วนของ กลูโคส ต่อ กลีเซอรอล ต่อ แลคโตส ในปริมาณ 10 ต่อ 20 ต่อ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณจิบเบอเรลลินได้สูงสุด 880 มก.ต่อลิตร วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อแป้งมันสำปะหลังเป็น 60 ต่อ 40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในการผลิต GA_3 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันพืชและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตจิบเบอเรลลิน เพราะสามารถถูกสลายในกระบวนการเบตาออกซิเดชัน (β-oxidation) ให้อะซิทิล โค เอ ในปริมาณมากกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น ซึ่งอะซิทิล โค เอ นี้จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินต่อไป (22)

4.1.2 สารแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาของ Borrow และคณะ (23) เกี่ยวกับอัตราการผลิตจิบเบอเรลลิน เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้ต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ เช่น ไกลซีน ยูเรีย แอมโมเนียมทาเตรต และแอมโมเนียมไนเตรต ส่วน Fusha และคณะ (24) พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นกากถั่วเหลือง หรือกากถั่วลิสงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เชื้อสามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้สูงกว่าการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย

4.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดย Gibberella fujikuroi

4.2.1 อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน

แม้จะไม่มีรายงานที่กล่าวถึงปริมาณออกซิเจน ที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยตรงก็ตาม แต่โดยทั่วไปแล้วการผลิตจิบเบอเรลลินจะต้องมีการให้ออกซิเจนอย่างต่อเนื่อง จาก

รายงานของ Geissman และคณะ (25) พบว่าการผลิตจิบเบอเรลลินจากเชื้อ Gibberella fujikuroi นั้น เป็นกระบวนการที่สลับซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับปฏิกริยาออกซิเดชัน ดังนั้น ประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนในกระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ ถ้าปริมาณออกซิเจนที่ให้ต่ำ หรือเกิดสภาพที่มีออกซิเจนไม่เพียงพอสำหรับเชื้อ จะมีผลทำให้วิถีการผลิต (biosynthesis pathway) ของสารเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์ใหม่ และที่สำคัญคือทำให้ปริมาณจิบเบอเรลลินที่ผลิตได้ต่ำลงด้วย นอกจากนี้ Borrow และคณะ (23)ได้ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่มีต่อการเจริญของ Gibberella fujikuroi ที่อัตราการกวน 570 ถึง 830 รอบต่อนาที และผันแปรอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 และ 0.8 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในถังหมักขนาด 30 ลิตร พบว่าอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนไม่มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (specific growth rate) แต่จะมีผลต่อปริมาณเซลสูงสุด ส่วนผลของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตจิบเบอเรลลินนั้น Borrow และคณะ(26) พบว่ากรณีที่ใช้หัวเชื้อ (inoculum) ในปริมาณต่ำนั้น การผสมกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศที่ให้ในปริมาณไม่เกินร้อยละ 10 จะทำให้การเจริญของเชื้อในระยะพักตัว (lag phase) สั้นลง และทำให้ปริมาณจิบเบอเรลลินที่ได้เพิ่มขึ้น แต่ในกรณีที่ใช้ปริมาณหัวเชื้อที่สูงขึ้น เชื้อจะสามารถปลดปล่อยกาซคาร์บอนไดออกไซด์ได้เพียงพอกับที่เชื้อต้องการ แต่จากรายงานของ Murphy และ West (27) พบว่ากาซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการออกซิเดชันของ เอ็นทคอรีน เป็นเอ็นทคอรีนาล และการออกซิเดชันของเอ็นทคอรีนาล เป็นกรดเอ็นทคอรีนออิก โดยที่สารเหล่านี้เป็นสารที่อยู่ในวิถีทางการผลิตจิบเบอเรลลิน ดังนั้นจึงมีผลทำให้ปริมาณจิบเบอเรลลินที่ได้มีปริมาณลดลงด้วย

4.2.2 อุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเจริญจำเพาะ และการผลิตจิบเบอเรลลินของ Gibberella fujikuroi นั้น Borrow และคณะ (28) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราในถังหมักจะอยู่ในช่วง 29 ถึง 32 °ซ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลิน GA_3 จะอยู่ในระหว่าง 27.5 ถึง 30 °ซ ซึ่งที่ 29 °ซ จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_4 และ GA_7 จะอยู่ประมาณ 32 °ซ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ในการผลิตจิบเบอเรลลิน

4.2.3 ความเป็นกรดด่าง

การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกควบคุมโดยกระบวนการเมตาโบลิสม ซึ่งเอนไซม์มี

บทบาทสำคัญ และความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ โดยที่ความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ ในระหว่างการเพาะเลี้ยง จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารอาหารที่ยังเหลืออยู่ และสารที่จุลินทรีย์ปลดปล่อยออกมาในระหว่างการเพาะเลี้ยง Borrow และคณะ (23) พบว่า องค์ประกอบของสารอาหาร โดยเฉพาะชนิดของไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลอย่างมากต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยง และอัตราการผลิต GA_1 และ GA_3 จะลดลง เมื่อความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้อยู่ในช่วง 3 ถึง 5.5 ในขณะที่ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิต GA_4 และ GA_7 ต้องการความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 7 และต้องควบคุมความเป็นกรดด่างที่ค่านี้ตลอดการเพาะเลี้ยง และจากรายงานของบริษัท Kyowa Hakko (16) พบว่าสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงกว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่พีเอช 7 ตลอดการเพาะเลี้ยง

5. การวิเคราะห์จิบเบอเรลลิน

การวิเคราะห์จิบเบอเรลลิน มี 2 วิธี คือ วิธีทางชีวภาพ(biological assays) และวิธีทางเคมีกายภาพ (physiochemical method)

5.1 วิธีทางชีวภาพ อาศัยหลักการตอบสนองของเมล็ดพืช ที่ไม่สามารถสร้างจิบเบอเรลลินได้เอง เมล็ดพืชที่ใช้ทดสอบมีหลายชนิด เช่น แทนจินโบซู (Tan-ginbozu) ข้าวแคระ (Dwarf Rice) (29) และ ถั่วแคระ (Dwarf Pea) (30) เป็นต้น ดังนั้นวิธีนี้จึงเหมาะสมสำหรับการตรวจสอบเพื่อยืนยันกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) ของจิบเบอเรลลินมากกว่าการตรวจสอบชนิด และปริมาณ เพราะเป็นวิธีที่ยุ่งยาก และใช้เวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมี (1)

5.2 วิธีทางเคมีกายภาพ ที่นำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน สามารถรวบรวมได้ดังนี้

5.2.1 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometric Methods)

Kavanabe และ Kzel(31) ใช้วิธีการเปลี่ยนกรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) ให้เป็น กรดจิบเบอเรลลีนิก (gibberellenic acid) โดยใช้กรดเข้มข้น แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ส่วน Shen และ Chang (32) ใช้วิธีการ

ทำปฏิกิริยาระหว่างจิบเบอเรลลินกับกรดฟอสฟอโมลิบดิก (phosphomolybdic acid) ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 นอร์มอล และวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซึ่งวิธีที่กล่าวนี้ยังเป็นวิธีที่ไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดได้ ทั้งยังถูกรบกวนด้วยสารเจือปนอื่นได้ด้วย เช่น กรดอะมิโน น้ำตาล เมทานอล เอทานอล และ อะซีโตไนตริล (1)

5.2.2 สเปกโทรฟลูออโรเดนซิโตมิเตอร์ (Spectrofluorodensitometric Methods)

การวิเคราะห์ GA_3 โดยอาศัยวิธีธินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟีแยก GA_3 ออกจากสารเจือปนอื่น โดยระบบสารละลายที่ประกอบด้วยคลอโรฟอร์มต่อเอธิลอะซิเตตต่อกรดอะซิติกในอัตราส่วน 5 ต่อ 4 ต่อ 1 และตรวจวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 โดยใช้ฟลูออเรสเซน (fluorescence) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เทียบพื้นที่ใต้พีกกับสารมาตรฐาน (33) วิธีนี้ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กัน เพราะไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดได้

5.2.3 อิมมูโนเอสเสย์ (Immunoassay)

วิธีการนี้ใช้ตรวจวัดปริมาณจิบเบอเรลลินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว การวิเคราะห์โดยวิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากทั้งการเตรียมอิมมูโนเจน (immunogen) ซึ่งเป็นวิธีการที่ต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพง ยุ่งยากและเสียเวลา (5)

5.2.4 แกสโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography)

เป็นการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของจิบเบอเรลลิน โดยจิบเบอเรลลินจะต้องถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารประกอบที่กลายเป็นไอได้ง่าย โดยทำให้อยู่ในรูปของเมทธิลเอสเทอร์ (methyl ester) หรือ ไตรเมทธิลไซลิล (trimethysilyl) เป็นต้น ซึ่งการเตรียมอนุพันธ์เพื่อตรวจวัดนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก เสียเวลา และการเตรียมสารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane) สำหรับการเติมหมู่เมทธิล (methylation) เป็นปฏิกริยาที่รุนแรง ต้องการอุปกรณ์เฉพาะในการเตรียม อีกทั้งไดอะโซมีเทนในสถานะก๊าซและสารละลายมีคุณสมบัติเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จึงไม่นิยมใช้วิเคราะห์ในงานประจำ (21)

5.2.5 ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography)

วิธี HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินตลอดจนการทำให้บริสุทธิ์ ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี GC/MS หรือ วิธีทางชีวภาพ (bioassay) เพราะเป็นวิธีที่สามารถแยกสารผสมออกจากกันได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูงไม่ยุ่งยาก และสามารถต่อเข้ากับเครื่องตรวจวัดอื่นๆได้หลายชนิด เช่น ยูวีวิสิเบิลสเปกโทร

โฟโตมิเตอร์ หรือ ฟลูออโรมิเตอร์ เป็นต้น จึงทำให้การแยกและวิเคราะห์สารผสมทำได้สะดวกและรวดเร็ว การตรวจวัดปริมาณจิบเบอเรลลินที่นิยมใช้กันมาก เป็นการวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลทที่ความยาวคลื่น 200 ถึง 210 นาโนเมตร หรือ 256 นาโนเมตร เมื่ออยู่ในรูปอนุพันธ์ของจิบเบอเรลลิน ส่วนคอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์สามารถใช้ได้ทั้งนอร์มัลเฟสและรีเวอร์สเฟส จึงสามารถเลือกใช้ระบบสารละลายตัวพาได้หลายชนิด เพื่อให้เหมาะสมกับการแยกจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆ (5)

6. เหตุจูงใจในการวิจัย

จิบเบอเรลลินเป็นฮอร์โมนพืชชนิดหนึ่ง ที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเจริญเติบโตของพืชทั้งในส่วนลำต้น ดอก และผล รวมถึงกระตุ้นการงอกของเมล็ด ตา และการเปลี่ยนเพศของดอก ซึ่งกระบวนการต่างๆเหล่านี้มีความสำคัญทั้งในการเพิ่มคุณภาพและปริมาณของผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งจะส่งผลให้มูลค่าของผลิตผลทางการเกษตรสูงขึ้น นอกจากนั้นจิบเบอเรลลินยังเป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้สูง คือมีค่า LD_{50} มากกว่า 15 กรัมต่อน้ำหนักหนูทดลอง 1 กิโลกรัม ด้วยเหตุนี้จิบเบอเรลลินจึงเริ่มเป็นที่นิยมใช้กันในทางการเกษตร และที่นิยมใช้กันมากคือจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 GA_4 และ GA_7 (4) แต่ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตสารดังกล่าวได้เอง ต้องสั่งจากต่างประเทศ จึงทำให้สารนี้มีราคาแพง ดังนั้นการใช้สารนี้ในการเกษตรของประเทศไทยจึงมีขีดจำกัดตามไปด้วย การแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยการวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตจิบเบอเรลลินในประเทศ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ทั้งนี้เพื่อจะลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ และทำให้เกษตรกรสามารถมีจิบเบอเรลลินใช้กันได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งจะเป็นการเพิ่มและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และเป็นการเพิ่มรายได้ให้เกษตรกรซึ่งจะส่งผลต่อเศรษฐกิจของประเทศในที่สุด

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาปัจจัย และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สารแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ที่มีราคาถูกและหาได้ง่ายภายในประเทศซึ่งรายงานไว้โดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (22) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขยายส่วนต่อไป

7. ขั้นตอนการวิจัย

7.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography)

7.2 ศึกษาชนิดและปริมาณน้ำมันพืชที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในระดับขวดเขย่า

7.3 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในระดับขวดเขย่า

7.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้แก่ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ การเติมสารแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนให้มีในถังหมัก ในปริมาณที่เหมาะสม ศึกษาผลของการควบคุมระดับความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยง และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ GA_3 ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย