บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

จิบเบอเรลลิน (Gibberellins) เป็นกลุ่มของฮอร์โมนพืช (plant hormone) เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (plant growth regulators) ชนิดหนึ่งใช้กันมากในอุตสาหกรรมการเกษตร พบครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น ในปี ค.ศ.1898 โดยเป็นสารที่ทำให้เกิดโรคแก่ต้นข้าวที่เรียกว่า โรคบากานี (bakanae) หรือ foolish seeding disease โรคดังกล่าวทำให้ต้นข้าวสูงชะลูดผิดปกติ สีซีด และไม่สร้างเมล็ดในระบบเจริญพันธุ์ หรือสร้างเพียงเล็กน้อย ทำให้ผลผลิตลดลง (Hori,1889 อ้างถึงใน Bruckner and Blechmidt, 1991) ต่อมาในปี ค.ศ.1926 นักโรคพืชชาวญี่ปุ่นชื่อ Eiichi Kurosawa ได้ทำการค้นคว้าพบว่า สาเหตุของโรคนี้เกิดจากเชื้อราชนิดหนึ่งในพวก Ascomycetes ที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศชื่อ Gibberella fujikuroi และในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศชื่อ Fusarium moniliforme โดย Kurosawa พบว่าการที่ต้นข้าวแสดงอาการผิดปกติขึ้นนั้น ไม่ได้เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ แต่เกิดจากสารเคมีบางอย่างที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยกระบวนการเมตาโบไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของเชื้อรา ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการยืดยาวของพืช ยับยั้งการสร้างคลอโรฟิลล์และการเจริญเติบโตในส่วนของปลายราก (Kurosawa, 1926 อ้างถึงใน Bruckner and Blechmidt, 1991)

ในปี ค.ศ. 1935 Yabuta ได้ทำการแยกสารที่มีสมบัติในการกระตุ้นการเจริญจากเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคบากานี ให้ชื่อสารนี้ว่า จิบเบอเรลลิน (Gibberellin)

ในปี ค.ศ. 1938 Yabuta และ Sumiki สามารถแยกสารในรูปผลึกได้ 2 ชนิด ให้ชื่อว่า จิบเบอเรลลินเอ และจิบเบอเรลลินบี (Gibberellin A and B)

หลังจากสิ้นสุดสงครามโลกครั้งที่ 2 การศึกษาเกี่ยวกับจิบเบอเรลลินก็ได้เริ่มขึ้นในประเทศอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1954 คณะทำงานของบริษัท Imperial Chemical Industries Ltd. (ICI) ได้คัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลินและสามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงเหมือนจิบเบอเรลลิน แต่มีสมบัติทางเคมีและทางกายภาพแตกต่างจากสารที่

รายงานจากประเทศญี่ปุ่น จึงเรียกว่า กรดจิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid) (Curtis and Cross,1954 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991) ระยะเวลาใกล้เคียงกันในประเทศสหรัฐอเมริกา Stodola และ Raper (1955) สกัดสารจิบเบอเรลลินได้ 2 ชนิดคือ จิบเบอเรลลิน เอ และจิบเบอเรลลิน เอ็กซ์ (Gibberellin A and X) ซึ่งชนิดหลังนี้พบว่ามีคุณสมบัติเช่นเดียวกับกรดจิบเบอเรลลิกที่พบในประเทศอังกฤษ การค้นพบเหล่านี้ทำให้ Yabuta และ Sumiki เริ่มศึกษาและตรวจสอบใหม่อีกครั้ง พบว่า Gibberellin ที่พบในประเทศญี่ปุ่นมี 3 ชนิดปนกันคือ Gibberellin A_1 A_2 และ A_3 และพบว่า Gibberellin A_3 ที่สกัดได้มีสมบัติเช่นเดียวกันกับ Gibberellin X และ Gibberellic acid หลังจากนั้นมีการค้นพบจิบเบอเรลลินเพิ่มขึ้นตามลำดับ จึงมีการตกลงกันว่าคำว่า Gibberellin ให้ใช้คำย่อว่า GA โดยใช้การเติมตัวเลขกำกับเพื่อบ่งชนิดของ GA ตามลำดับการค้นพบ ปัจจุบันพบจิบเบอเรลลินประมาณ 86 ชนิดทั้งจากพืชและจุลินทรีย์ (Curtis And Cross, 1954 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991)

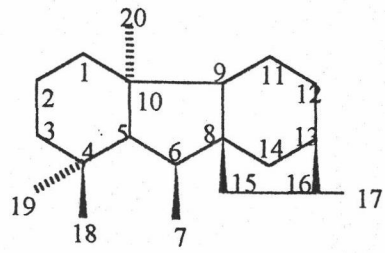
1.2 ชนิดและโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลินเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มไดเทอร์พีน (diterpene) ซึ่งประกอบด้วยไอโซพรีน (isoprene) 4 โมเลกุลมาเรียงกันเป็นโครงสร้าง 3 วง โครงสร้างนี้เรียกว่า ent-gibberellane หรือ tetra-carboxylic gibbane ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของจิบเบอเรลลิน (Leopold, 1975) มีโครงสร้างดังรูปที่ 1-1

จิบเบอเรลลินสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

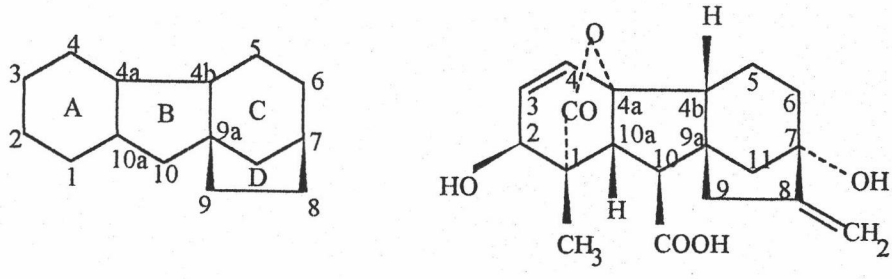
1. กลุ่มที่มีคาร์บอน 20 อะตอม (C_{20}-gibberellin) เป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างไดเทอร์พีนอย่างสมบูรณ์ คือมีคาร์บอน 20 อะตอม

2. กลุ่มที่มีคาร์บอน 19 อะตอม (C_{19}-gibberellin) เป็นกลุ่มที่ขาดคาร์บอนอะตอมที่ 20 เนื่องจากมีพันธะแลคโตนระหว่างคาร์บอนตัวที่ 19 กับ 10 (19,10-α-lactone structure) เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ จิบเบอเรลลินในกลุ่มนี้ได้แก่ GA_3, GA_4, GA_7



รูปที่ 1-1 โครงสร้างของ ent-gibberellane

จิบเบอเรลลินแต่ละชนิดต่างกันเล็กน้อยที่ตำแหน่งของพันธะคู่และของหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ส่วนฤทธิ์ทางชีวภาพในการกระตุ้นการเติบโตของพืชจะแตกต่างกัน ชนิดที่นำมาใช้ในวงการเกษตรส่วนใหญ่ ได้แก่ GA_1 GA_3 GA_4 และ GA_7 หรือใช้ GA_4 ร่วมกับ GA_7 แต่ที่นิยมมากที่สุดคือ GA_3 หรือกรดจิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid) มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{22}O_6$ มีชื่อทางเคมีว่า 2,4a,7-trihydroxy-1-methyl -8- methylene gibb -3- ene -1,10-dicarboxylic acid 1,4a-lactone มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1-2 น้ำหนักโมเลกุล 346.37 ประกอบด้วย C 65.88%, H 6.40% และ O 27.72% จุดหลอมเหลว 234-236 °ซ ลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีปฏิกิริยาเป็นกรด ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์



รูปที่ 1-2 สูตรโครงสร้างของ GA_3 (Windholz, 1983)

กรดจิบเบอเรลลิกสามารถละลายน้ำได้สูงสุดเพียง 0.5% เท่านั้น แต่จะละลายได้ดีขึ้นถ้าอยู่ในรูปของเกลือโซเดียม, โพแทสเซียม หรือแอมโมเนียม ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอธานอล เมธานอล ไอโซโปรปานอล เอทธิลอะซิเตต บิวทิลอะซิเตต และ

อะซีโตน เป็นต้น ละลายได้ยากในคลอโรฟอร์ม คาร์บอนเตตราคลอไรด์ และปิโตรเลียมอีเทอร์ จิบเบอเรลลิน เสถียรมากในภาวะที่แห้งในรูปผลึกแห้ง หรือในเอธานอลสัมบูรณ์ และสลายตัวได้ง่ายเมื่ออยู่ในรูปสารละลาย เมื่อ GA_3อยู่ในรูปสารละลายจะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 3-4

1.3 การถูกทำลายหรือทำให้สูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพของกรดจิบเบอเรลลิก

กรดจิบเบอเรลลิกถูกทำลายหรือทำให้สูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลายวิธีด้วยกัน คือ

1.3.1 ถูกทำลายด้วยความร้อน

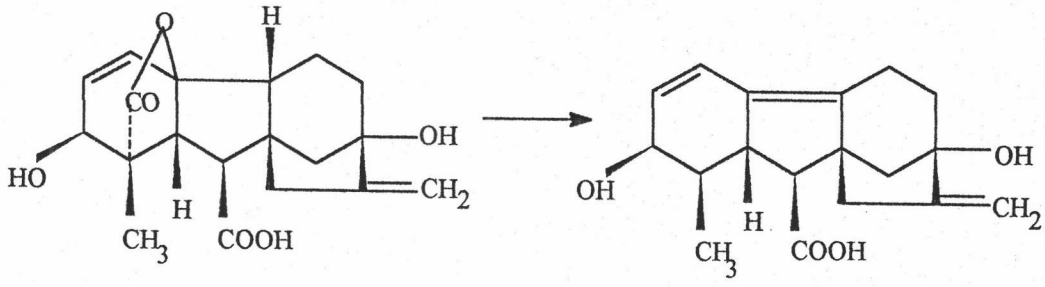
กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกทำลายด้วยความร้อนอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในรูปสารละลายในน้ำ (Cross, 1957) ดังแสดงในตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 ค่าครึ่งชีวิตของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำ ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ, °ซ	ค่าครึ่งชีวิต, ชั่วโมง
20	336
27	78
32	36
36	19
50	2

1.3.2 เกิดการสลายตัวเมื่ออยู่ในน้ำ

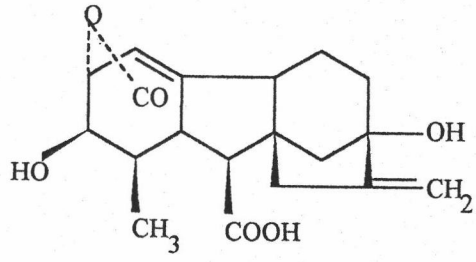
กรดจิบเบอเรลลิกจะเกิดการสลายตัวอย่างช้าๆ เมื่ออยู่ในน้ำหรือในสารละลายที่มีน้ำเจือปน ได้เป็น กรดจิบเบอเรลลีนิก (gibberellenic acid) (ดังแสดงในรูปที่ 1-3) สารดังกล่าวเป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ กรดจิบเบอเรลลีนิกพบได้สูงถึง 4% และ 10% ในน้ำหมักในการผลิตระดับอุตสาหกรรม ถ้าใช้ภาวะในการผลิตและการตกผลึกที่ไม่เหมาะสม (Kavanagh and Kuzel, 1958; Moffatt, 1960)



รูปที่ 1-3 การเปลี่ยนแปลงจากกรดจิบเบอเรลลิก ไปเป็นกรดจิบเบอเรลลีนิก

1.3.3 ถูกทำลายด้วยกรด

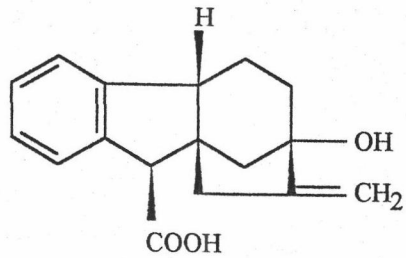
กรดจิบเบอเรลลิกเมื่ออยู่ในกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (1:10) ที่อุณหภูมิ 55-65°ซ กรดจิบเบอเรลลิกจะเกิดการสลายตัวได้เป็นกรดแอลโลจิบเบอลิก (allogibberric acid) ดังแสดงในรูป 1-4 สารดังกล่าวเป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Cross, 1957; Grove and Mulholland, 1960)



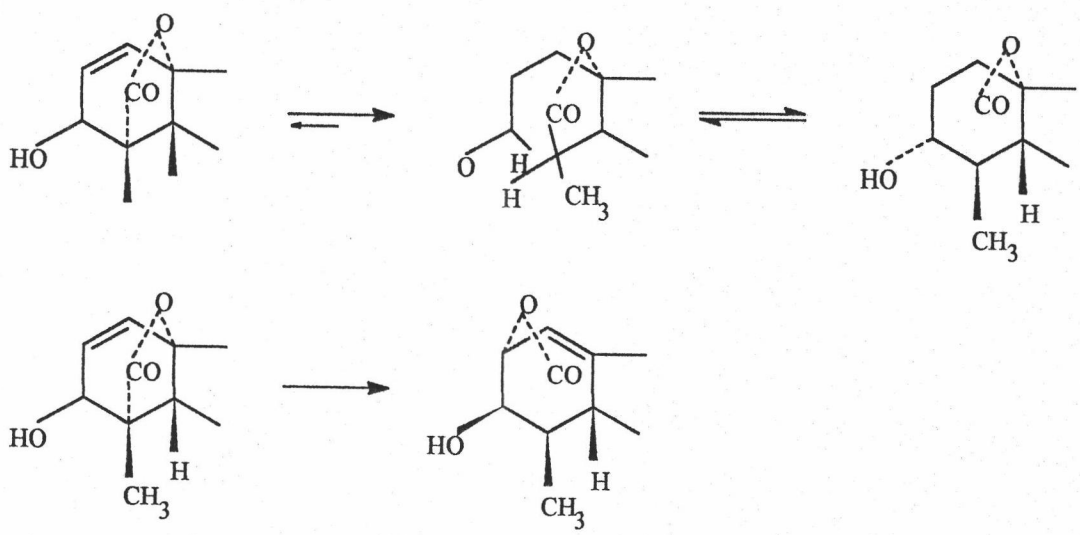
รูปที่ 1-4 โครงสร้างของกรดแอลโลจิบเบอลิก

1.3.4 ถูกทำลายด้วยด่าง

ในสารละลายที่มีสภาพเป็นด่าง เช่นใน 0.1 โมลต่อลิตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดจิบเบอเรลลิกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางโมเลกุลไปเป็นไอโซเมอร์ (isomer) (ดังแสดงในรูป 1-5 และ 1-6) สารที่ได้จะไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Takahashi, Yamaguchi and Yamane, 1986; Cross, Grove and Morrison, 1961; Hanson, 1990)



รูปที่ 1-5 โครงสร้างของไอโซเมอร์ของกรดจิบเบอเรลลิก



รูปที่ 1-6 การเกิดไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) ของกรดจิบเบอเรลลิกในภาวะที่เป็นด่าง แสดงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นที่ ring A (Takahashi et al., 1986)

1.3.5 <u>การถูกทำลายด้วยคลอรีน</u>

กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกทำลายเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีคลอรีนอิสระผสมอยู่ โดยคลอรีน 1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) จะทำลายกรดจิบเบอเรลลิกในปริมาณเท่ากัน

1.4 แหล่งที่มาของจิบเบอเรลลิน

นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 เป็นต้นมา มีรายงานการค้นพบจิบเบอเรลลิน โดยพบว่าแหล่งที่มาของจิบเบอเรลลินมี 3 ทาง

1.4.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

มีรายงานการใช้ 2-อัลลีออกซีอนีโซล (2-allyoxyanisole) และ 4-เบนซิลออกซีไซโคลเฮกซาโนน (4-benzyloxycyclohexanone) เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิต แต่เนื่องจากความไม่คงที่ของปริมาณผลผลิตที่ได้ และสารตั้งต้นมีราคาแพงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าใช้จ่ายในการผลิตด้วยกระบวนการผลิตโดยการหมัก จึงไม่เหมาะสมที่จะผลิตเป็นการค้า (Corey et al., 1978)

1.4.2 การสกัดจากพืช

ค้นพบครั้งแรกในพืชชั้นสูงทั่วไป และในพืชชั้นต่ำบางชนิด แต่ในพืชมีจิบเบอเรลลินในปริมาณต่ำมาก ประมาณ 0.001-1.000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสดของพืช (Lonsane and Kumar, 1991)

1.4.3 การหมักด้วยจุลินทรีย์

ปี ค.ศ. 1954 คณะทำงานของบริษัท ICI เป็นผู้ริเริ่มผลิต GA_3 เป็นการค้าในระดับห้องทดลอง (lab scale) โดยใช้เชื้อ Gibberella fujikuroi ในปัจจุบันการผลิต GA_3 โดยการหมักด้วยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมทั่วโลก เช่นในสหรัฐอเมริกา อังกฤษ ฮังการี โปแลนด์ และญี่ปุ่น ซึ่งให้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจ (Cross and Hanson, 1964)

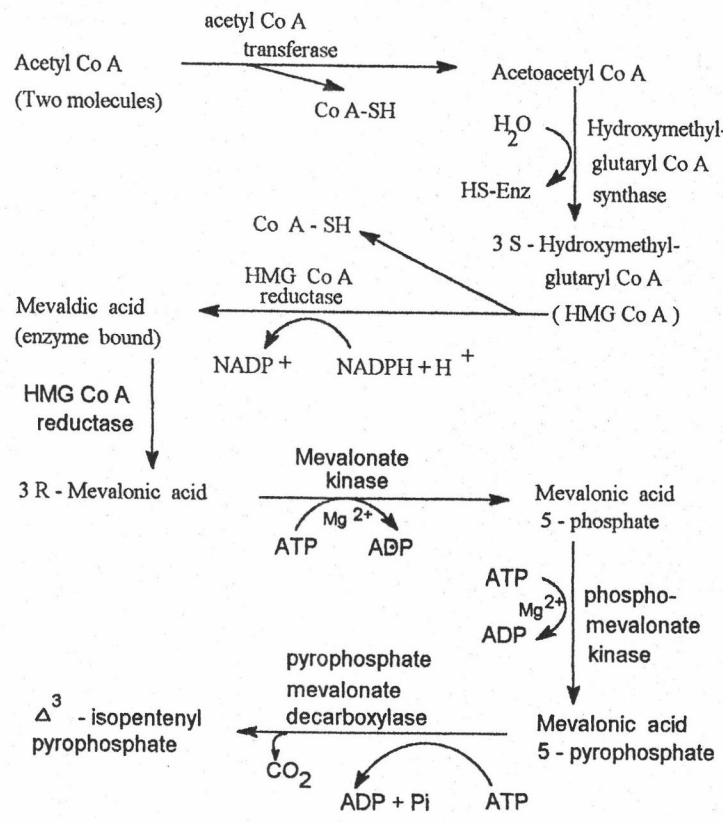
1.5 การสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน

การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและซับซ้อน สามารถแบ่งได้ 4 ขั้นตอนหลักๆ คือ

1.5.1 <u>การสังเคราะห์ไอโซเพนทีนิล ไพโรฟอสเฟต</u>

(Isopentenyl pyrophosphate, IPP)

การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินจะผ่านกระบวนการสังเคราะห์สารไอโซพรีนอยด์ โดยเริ่มจากการรวมตัวกันของ อะเซทิลโค เอ (acetyl Co A) 2 โมเลกุล โดยอาศัยเอนไซม์อะเซทิล โค เอ ทรานเฟอเรส (acetyl Co A transferase) ได้สารประกอบอะซิโตอะเซทิล โค เอ (acetoacetyl Co A) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น 3-ไฮดรอกซีเมทธิล กลูตาริล โค เอ (3-hydroxymethyl-glutaryl Co A, HMG Co A) การเปลี่ยนแปลงขั้นตอนนี้จะสิ้นสุดที่สารไอโซเพนทีนิล ไพโรฟอสเฟต (Isopentenyl pyrophosphate, IPP) โดยมีสารตัวกลางที่สำคัญคือกรดเมวาโลนิก (mevalonic acid) (Kumar and Lonsane, 1989) ดังแสดงในรูปที่ 1-7

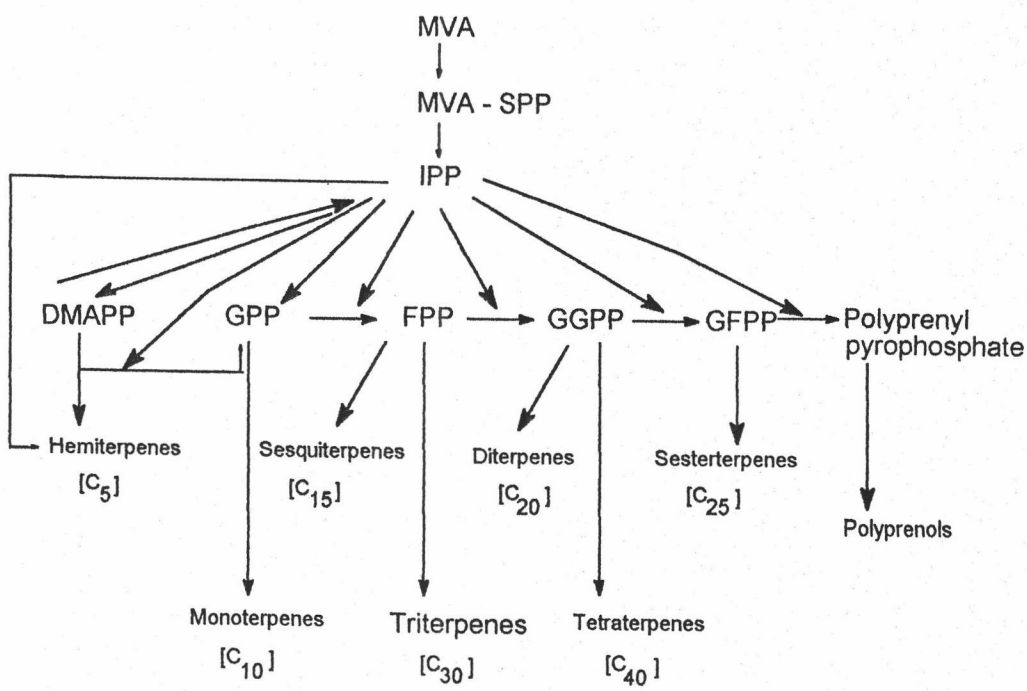


รูปที่ 1-7 ขั้นตอนการสังเคราะห์ไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต (Kumar and Lonsane, 1989)

1.5.2 <u>การสังเคราะห์สารประกอบเทอร์พีน และ เทอร์พีนอยด์</u>

(Terpene and terpenoid)

จากกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินในขั้นตอนแรกจะได้สารประกอบ IPP โดย IPP จะถูกเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนเป็นสารประกอบเทอร์พีน และเทอร์พีนอยด์ชนิดต่างๆ เริ่มจาก IPP จะถูกเปลี่ยนเป็นไดเมทธิลอัลลิลไพโรฟอสเฟต (dimethylallylpyrophosphate, DMAPP) จากนั้น DMAPP จะรวมกับ IPP ได้เจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranylpyrophosphate, GPP) และ GPP จะรวมตัวกับ IPP เกิดเป็น ฟาร์เนซิลไพโรฟอสเฟต (farnesyl pyrophosphate, FPP) จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นเจอรานิลเจอรานิลไพโรฟอสเฟต (geranylgeranylpyrophosphate, GGPP) ดังแสดงในรูปที่ 1-8

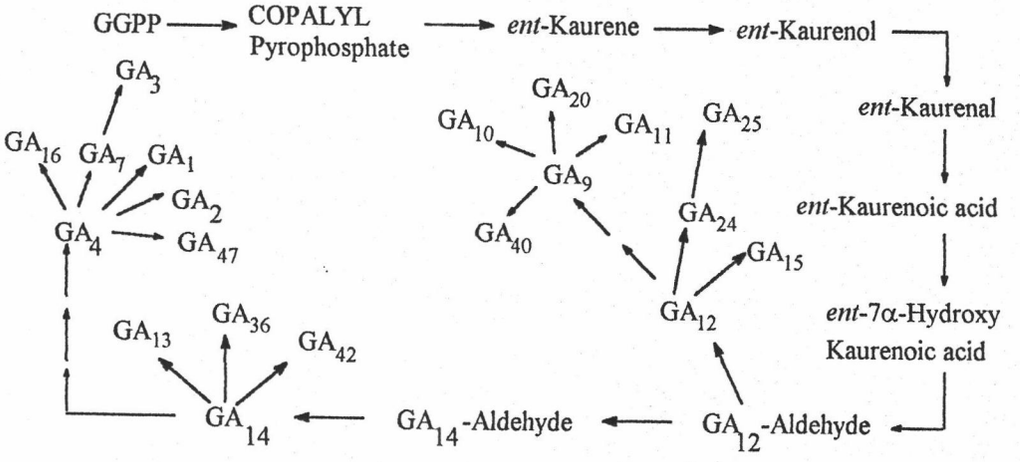


รูปที่ 1-8 ขั้นตอนการสังเคราะห์สารประกอบเทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์

(Kumar and Lonsane, 1989)

1.5.3 <u>การสังเคราะห์ เอนท์-คอรีน</u> (Ent-kaurene)

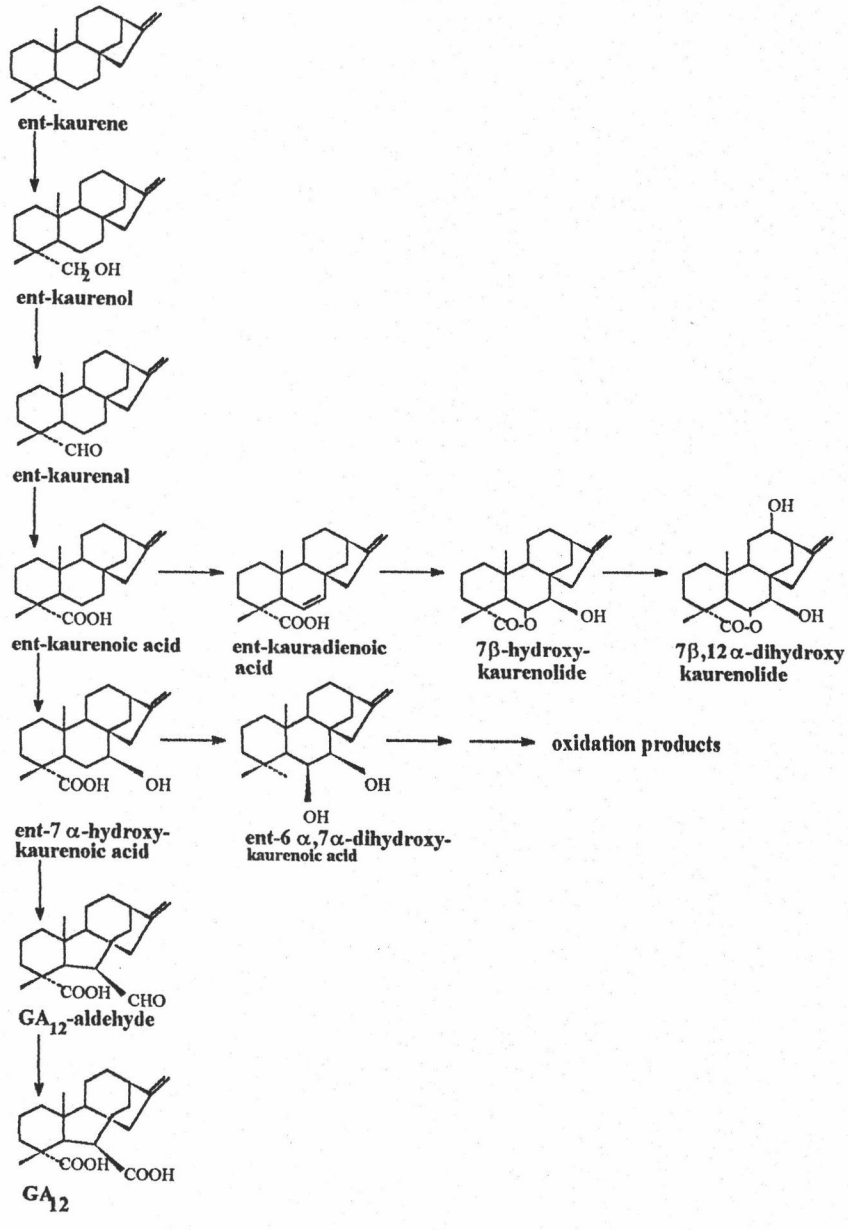
วงแหวน เอนท์-คอรีน เริ่มจาก GGPP ถูกเปลี่ยนเป็น โคพาลิลไพโรฟอสเฟต (copalylpyrophosphate) โดยอาศัยเอนไซม์เอนท์คอรีนซินเทส (ent-kaurenesynthase) ทำให้ได้วงแหวนเอนท์-คอรีนอล (ent-kaurenol) เอนท์-คอรีนาล (ent-kaurenal) และ เอนท์-คอรีโนอิก เอซิด (ent-kaurenoic acid) ตามลำดับ หลังจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชันที่คาร์บอนอะตอมที่ 7 ได้สารประกอบ เอนท์-7-แอลฟาไฮดรอกซีคอรีโนอิก เอซิด (ent-7-α-hydroxykaurenoic acid) ดังแสดงในรูปที่ 1-9



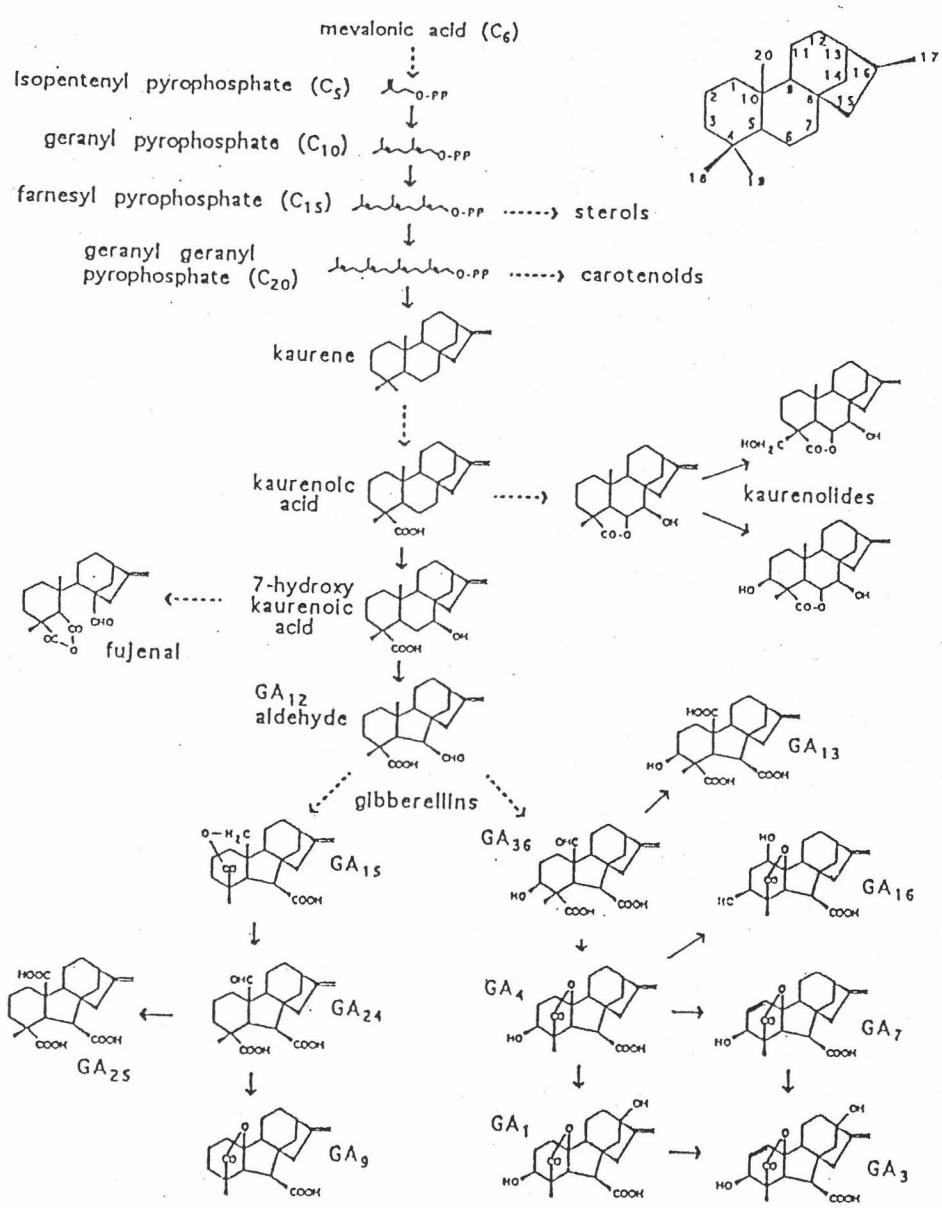
รูปที่ 1-9 ขั้นตอนการสังเคราะห์ เอนท์-คอรีน (Jan, 1987)

1.5.4 <u>การสังเคราะห์ GA_{12}-อัลดีไฮน์</u> (GA_{12}-aldehyde)

เอนท์-7-แอลฟาไฮดรอกซีคอรีโนอิก เอซิด ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน 3 วงเรียงกันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ วงแหวน บี ให้เป็น จิบเบอเรลลิน-12-อัลดีไฮด์ (GA_{12}-aldehyde) ซึ่งเป็นสารตัวแรกที่มีโครงสร้างเป็น เอนท์-จิบเบอเรลแลน (ent-gibberellane) ดังแสดงในรูปที่ 1-10 ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆได้ ดังแสดงในรูปที่ 1-11



รูปที่ 1-10 ขั้นตอนการสังเคราะห์ GA_{12}-อัลดีไฮน์ (Jan, 1987)



รูปที่ 1-11 ขั้นตอนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินชนิดต่างๆ (Fernandez-Martin et al., 1995)

1.6 การวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน

วิธีในการวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินมีด้วยกันหลายวิธีการ ได้แก่ วิธีทางชีวภาพ (biological assay) อิมมูโนเอสเสย์ (immunoassay) สเปกโทรโฟโตเมตรี (spectrophotometric method) เปเปอร์โครมาโตกราฟี (paper chromatography, PC) ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC) ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (high performance thin-layer chromatography, HPTLC) แกสโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (high performance liquid chromatography, HPLC) ซึ่งแต่ละวิธีการมีรายละเอียดดังนี้

1.6.1 วิธีทางชีวภาพ (Biological assay)

อาศัยหลักการตอบสนองของเมล็ดพืชแคระซึ่งไวต่อจิบเบอเรลลินที่เติมลงไป เนื่องจาก pathway ของการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินในพืชแคระนั้นถูกทำลาย ไม่สามารถผลิตได้ตามปกติ จิบเบอเรลลินที่เติมลงไปสามารถชักนำให้เกิดการขยายตัวของพืชแคระได้ พืชแคระที่นำมาทดสอบมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีความไวต่อจิบเบอเรลลินแตกต่างกัน เช่น ถั่วแคระ(dwarf pea) และ ข้าวแคระ (dwarf rice) (Crozier et al., 1970) วิธีนี้ใช้ยืนยันฤทธิ์ทางชีวภาพ (biological activity) แต่ไม่เหมาะในการตรวจสอบชนิดและปริมาณ เนื่องจากจิบเบอเรลลินบางชนิดให้ผลต่อพืชคล้ายกัน ใช้เวลานานในการตรวจสอบ (Lonsane and Kumar, 1986)

1.6.2 อิมมูโนเอสเสย์ (Immunoassay)

ได้มีการพัฒนาการใช้ Enzyme Immunoassay ในการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน (Takahashi et al., 1986) วิธีนี้มีความไวสูงมาก และจำเพาะกับจิบเบอเรลลินแต่ละชนิด ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์จึงไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์ หลักการคือ เกิด antigen-antibody complex แต่จิบเบอเรลลินเป็นโมเลกุลเล็กเกินกว่าจะเป็นอิมมูโนเจนด้วยตัวเองได้ จึงต้องไปเชื่อม (conjugate) กับโมเลกุลใหญ่ เช่น bovine serum albumin (BSA) หรือ human serum albumin (HSA) ให้กลายเป็นอิมมูโนเจนที่ดี แต่เนื่องจากจิบเบอเรลลินบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายกันมาก จึงต้องระวังการเกิด cross reactivity ของจิบเบอเรลลิน

ซึ่งมีถึง 86 ชนิด ส่วนการเตรียมอิมมูโนเจนยุ่งยาก และต้องใช้สารราคาแพง จึงไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์เป็นงานประจำ

1.6.3 สเปกโทรโฟโตเมตรี (Spectrophotometric method)

Holbrook, Edge และ Bailey (1961) ใช้วิธีการเปลี่ยนกรดจิบเบอเรลลิกให้เป็นกรดจิบเบอเรลลีนิก โดยใช้กรดเข้มข้น แล้ววัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Holbrook et al., 1961 อ้างถึงใน Kumar and Lonsane, 1986)

Shen และ Chang (1981) ใช้วิธีการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดจิบเบอเรลลิกกับกรดฟอสฟอโมลิบดิก (phosphomolybdic acid) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ได้ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร ซึ่งวิธีนี้ไม่สามารถใช้วิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน แต่ละชนิดได้ ทั้งยังถูกรบกวนจากกรดอะมิโนและน้ำตาล ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนในน้ำหมัก ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงผิดพลาดได้

Candau, Avalos และ Cerda-Olmedo (1991) ใช้ fluorescence spectrum ของกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายที่เย็นจัดของเอธานอลิกซัลฟูริก (ethanolic sulfuric) ซึ่งมีสัดส่วนของเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 96 ต่อกรดซัลฟูริกเข้มข้น เท่ากับ 1:1 บ่มที่ 50°ซ นาน 30 นาที แล้ววัดค่าความเข้มของฟลูออเรสเซนซ์ด้วยเครื่องสเปกโทรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) โดยใช้ความยาวคลื่นเร้า (excitation wavelength, λ_{ex}) เท่ากับ 422 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคาย (emission wavelength, λ_{em}) เท่ากับ 460 นาโนเมตร สามารถประมาณค่าปริมาณ GA_3 ได้ แต่เนื่องจากน้ำหมักมีจิบเบอเรลลินหลายชนิด ทำให้วัดค่าดูดกลืนแสงผิดพลาด เพราะจิบเบอเรลลินบางชนิดมีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกัน วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยม

1.6.4 เปเปอร์โครมาโตกราฟี (Paper Chromatography, PC)

วิธีนี้มีผู้นิยมใช้น้อย เนื่องจากต้องใช้เวลาในการแยกสารนาน ประสิทธิภาพในการแยกสารต่ำ Harold, Rird และ Charles (1957) วิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกโดยพ่นแผ่นเปเปอร์โครมาโตกราฟีที่จุดตัวอย่างแล้วด้วย 0.5 เปอร์เซนต์สารละลายโพแทสเซียมเปอร์มังกาเนต จะปรากฏจุดสีน้ำตาลของกรดจิบเบอเรลลิก มีบางรายงานใช้ 70 เปอร์เซนต์กรด

ซัลฟูริกพ่นแผ่นเปเปอร์โครมาโตกราฟี เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก โดยอาศัยการเกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์เมื่อส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Phinney et al., 1957 อ้างถึงใน Harold et al.,1957)

1.6.5 ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography, TLC)

วิธีนี้สะดวกและมีประสิทธิภาพในการแยกสารดี แต่สามารถหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกได้มากน้อยตามความเข้มของจุดที่เรืองแสงเมื่อประเมินด้วยตาเปล่า อาจผิดพลาดได้ง่าย MacMillan และ Suter (1963) ได้ศึกษาการแยก GA_3 ออกจากจิบเบอเรลลินชนิดอื่นๆ โดยใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วย Silica gel G ระบบตัวพาประกอบด้วย เบนซีน : กรดอะซีติก : น้ำ ในอัตราส่วน 4 : 1 : 2 พ่นด้วย 5 เปอร์เซนต์กรดซัลฟูริกในเอธานอล อบที่ 120 °ซ นาน 10 นาที สังเกตจุดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

Kumar และ Lonsane (1986) ได้ศึกษาเทคนิคการประมาณค่า GA_3 ในสาร สกัดที่ได้จากการหมักเชื้อ Gibberella fujikuroi ที่เจริญในอาหารแข็ง โดยใช้แผ่น TLC ที่เคลือบด้วย silica gel G ความหนา 300 ไมโครเมตร ระบบตัวพาประกอบด้วย คลอโรฟอร์ม : เอทธิลอะซิเตต : กรดอะซิติกในอัตราส่วน 5 : 4 : 1 พ่นด้วย 5% กรดซัลฟูริกในเอธานอล อบที่ 100°ซ นาน 30 นาที สังเกตจุดสารภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร วัดความเข้มของจุดภายใต้เครื่อง spectrofluorodensitometer พบว่าวิธีนี้จำเพาะกับ GA_3 ไม่ปนเปื้อนสารอื่น สามารถแยก GA_3 ออกจากสารอื่นในน้ำหมักได้

Saucedo, Barbotin และ Thomas (1989) ได้ตรึงเส้นใยของเชื้อ Gibberella fujikuroi ใน calcium alginate แล้วตรวจสอบปริมาณ GA_3 บนแผ่น TLC โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักเป็น 2.5 ด้วย 10% กรดซัลฟูริก สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต วิเคราะห์ปริมาณ GA_3 บนแผ่น TLC silica gel 60 F_{254} ในระบบตัวพาที่ประกอบด้วย เบนซีน : กรดโพรพิโอนิค : น้ำ (6 : 3 : 1) และเอทธิลอะซิเตตในอัตราส่วน 6 :4 ตรวจสอบจุดสารโดยการพ่นด้วย 5% กรดซัลฟูริกในเอธานอล วัดความเข้มของจุด GA_3 ภายใต้เครื่อง Scanning densitometer

จันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) ได้แยก GA_3 ออกจากน้ำหมักตามวิธีของ Saucedo และคณะ (1989) เมื่อพ่นแผ่น TLC ด้วย 5 เปอร์เซนต์กรดซัลฟูริกในเอธานอล จะเกิดสีเหลืองอ่อน ขณะเดียวกันสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้เมื่อส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

สังเกตความเข้มของจุด GA_3 ด้วยสายตา แต่ไม่สามารถระบุปริมาณได้ ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้เป็นวิธีในการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิอย่างคร่าวๆ สะดวกรวดเร็วในการคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

1.6.6 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี

(High performance thin-layer chromatography, HPTLC)

วิธีนี้สะดวก เป็นวิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ให้มีความถูกต้องมากขึ้น สามารถหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกได้ Betina (1985) รายงานการวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำหมัก โดยใช้แผ่น HPTLC silica gel 60 จากนั้นจุดตัวอย่างและสารมาตรฐานบนแผ่น HPTLC และนำไปทำปฏิกิริยากับ 27 เปอร์เซนต์กรดซัลฟูริก แล้ววางในถังแก้วที่มีระบบตัวทำละลายอิ่มตัว ประกอบด้วย ไซโคลเฮกเซน: อะซิโตน อัตราส่วน 4 : 5 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 เซนติเมตร วางแผ่น HPTLC ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปวางในถังแก้วที่ประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำออกมาและไปอบที่ 105-110 °ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วสแกนด้วยเครื่อง HPTLC วิธีนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสารสูง และตรวจวิเคราะห์ความเข้มของจุดโดยสามารถสแกนได้ครั้งละมากตัวอย่าง และทำได้อย่างรวดเร็ว

อุษามาส วังชัยสุนทร (2538) ได้ปรับปรุงจากวิธี TLC เพื่อใช้เป็นวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ โดยการนำแผ่น TLC ที่จุดตัวอย่างแล้ว ไปสแกนด้วยเครื่อง TLC-densitometer ซึ่งจะทราบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกได้อย่างถูกต้องกว่าวิธี TLC แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังคงเสียเวลาในขั้นตอนของการสกัดน้ำหมักก่อนที่จะนำไปจุดบนแผ่น TLC

1.6.7 แกสโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC)

เป็นการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน โดยเปลี่ยนให้อยู่ในรูปสารประกอบที่กลายเป็นไอได้ง่าย ในรูปของเมทธิลเอสเทอร์ (methyl ester) หรือ ไตรเมทธิลไซลิล (trimethylsilyl) เป็นต้น (Takahashi et al., 1986 อ้างถึงใน Bruckner et al., 1989) การเตรียมอนุพันธ์เพื่อตรวจวัดนี้ มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก การเตรียมสารละลายไดอะโซมีเทน

(diazomethane) สำหรับการเติมหมู่เมทธิล เป็นปฏิกิริยาที่รุนแรง ต้องการอุปกรณ์เฉพาะในการเตรียมและยังมีสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) จึงไม่ควรใช้วิเคราะห์เป็นงานประจำ

1.6.8 ไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี

(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้อย่างมากในการแยกและจำแนกผลิตภัณฑ์ในธรรมชาติ รวมทั้งการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน สามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว การเตรียมสารไม่ยุ่งยาก (Barendse and Vande Werken, 1980)

อรไท สุขเจริญ (2533) ได้ทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 จากน้ำหมักของเชื้อ Gibberella fujikuroi C โดยปรับปรุงจากวิธีของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532) ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ C_8 สารละลายตัวพาเป็น 35 เปอร์เซนต์เมธานอลในกรดฟอสฟอริก ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร ใช้พาราเซตามอล เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน

วิธีในการวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินที่กล่าวมาข้างต้น พอสรุปข้อดี ข้อเสียของแต่ละวิธีการ ดังแสดงในตารางที่ 1-2

ตารางที่ 1-2 เปรียบเทียบข้อดี ข้อเสีย ของวิธีการวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินวิธีต่างๆ

วิธีวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน	ข้อดี	ข้อเสีย
Biological assay (Crozier et al., 1970)	- ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์มาก	- ใช้เวลานาน ค่าที่ได้คลาดเคลื่อนมาก
Immunoassay (Takahashi et al., 1986)	- ความไวสูง จำเพาะกับ GA แต่ละชนิด	- ต้องเตรียมอิมมูโนเจน ขั้นตอนยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายสูง
Spectrophotometric method (Candau et al. 1991)	- สะดวก รวดเร็ว	- บอกปริมาณได้แม่นยำระดับหนึ่ง แต่ไม่แม่นยำเหมือนวิธี HPLC
PC (Harold et al., 1957)	- ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย	- ประสิทธิภาพการแยกสารต่ำ
TLC (MacMillan and Suter, 1963: Kumar and Lonsane, 1986: Saucedo et al.,1989)	- สะดวก - ประสิทธิภาพการแยกสารดี	- วัดปริมาณ GA_3ตามความเข้ม เมื่อประเมินด้วยตาเปล่า อาจผิดพลาดได้ง่าย
HPTLC (Betina, 1985)	- สะดวก	- เสียเวลาในการสกัดแยก - ค่าที่ได้ไม่แม่นยำเหมือนวิธี HPLC
GC (Takahashi et al.,1986)	- ประสิทธิภาพการแยกสารดี	- ต้องเตรียมตัวอย่างในรูปอนุพันธ์ ขั้นตอนยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายสูง
HPLC (Barendse and Vande Werken, 1980)	- จำเพาะกับ GA_3	- ค่าใช้จ่ายสูง

1.7 การแยกจิบเบอเรลลินและการทำให้บริสุทธิ์

การแยกสารจิบเบอเรลลินซึ่งผลิตด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวภาชนะลึก (Submerged Fermentation, SmF) โดยในระหว่างกระบวนการหมักจิบเบอเรลลินจะถูกขับออกนอกเซลล์สู่อาหารเหลว ดังนั้นก่อนที่จะทำการแยกสารจิบเบอเรลลิน จำเป็นต้องผ่านการแยกเส้นใยของเชื้อราจากน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก อาจทำได้โดยการกรอง (filtration) หรือการปั่นเหวี่ยง (centrifugation) จะได้น้ำหมักที่มีจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆผสมกันอยู่ รวมทั้งสารอาหารที่เหลือจากกระบวนการหมัก และสารเมตาบอไลท์อื่นของเชื้อราในระหว่างการหมัก น้ำหมักที่ได้จะถูกนำไปทำการแยกจิบเบอเรลลินและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งเทคนิคที่ใช้พอสรุปได้ 4 วิธีดังต่อไปนี้

1.7.1 วิธีทางโครมาโตกราฟี (Chromatographic method)

การใช้วิธีทางโครมาโตกราฟี ต้องทำการสกัดจิบเบอเรลลินออกจากน้ำหมักหรือจากส่วนของพืชก่อน โดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทธิลอะซิเตต เมธานอล เอธานอล หรืออะซิโตน จากนั้นนำสารสกัดในชั้นตัวทำละลายไประเหยภายใต้สูญญากาศให้แห้ง เตรียมให้อยู่ในรูปสารละลายที่เหมาะสม แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีทางโครมาโตกราฟี เช่น adsorption chromatography, partition chromatography, gel filtration ผู้รายงานอ้างว่าวิธีทางโครมาโตกราฟีสามารถแยกจิบเบอเรลลินหลายชนิดออกจากกัน ประสิทธิภาพในการแยก (recovery yield) ประมาณ 90-98% แต่ใช้แยกจิบเบอเรลลินปริมาณน้อยๆ ซึ่งไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Powel and Taulvydas, 1967; Glenn et al., 1972; Durley and Pharis, 1972; Durley et al., 1972; MacMillan and Wels, 1973; Reeve and Crozier, 1976)

1.7.2 วิธีการดูดซับบนผงถ่านกัมมันต์ (Adsorption on activated carbon)

เป็นวิธีการที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นสำหรับแยกจิบเบอเรลลินจากน้ำหมัก โดยการเติมผงถ่านประมาณ 10 เท่าของปริมาณจิบเบอเรลลินที่มีในน้ำหมัก กวนเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หรือผ่านน้ำหมักลงในคอลัมน์ที่มีผงถ่านบรรจุอยู่ แล้วชะผงถ่านด้วยตัวทำละลาย เช่น 1% โซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมธานอล หรือ 80% เมธานอล จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ขึ้น

โดยการสกัดด้วย 1% โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) อะซิโตน หรือวิธีทางโครมาโตกราฟี การสกัดแยกวิธีดังกล่าว สามารถตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกได้ประมาณ 65% เมื่อประเมินผลที่ได้จากกระบวนการนี้พบว่ามีค่าใช้จ่ายสูงกับผงถ่านที่สามารถใช้ได้เพียงครั้งเดียว ต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก และมีประสิทธิภาพต่ำ (Brian et al., 1957; Pitel, Vining and Arsenault, 1971)

1.7.3 <u>วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย</u> (Liquid-liquid extraction)

เป็นการสกัดน้ำหมักโดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ (water-immiscible solvents) เช่น เอทธิลอะซิเตต บิวทิลอะซิเตต เอทธิลเมทธิลคีโตน เมทธิลไอโซบิวทิลคีโตน บิวทานอล และไดเอทธิลอีเทอร์ (Calam and Curtis, 1960) เอทธิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลายที่นิยมใช้มากในระดับอุตสาหกรรม ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการสกัด คือ 2-4 แล้วทำการดูดซับจิบเบอเรลลินบนผลึกโซเดียมไบคาร์บอเนต หรือผลึกโพแทสเซียมไบคาร์บอเนต หรือใช้สารละลายบัฟเฟอร์ ประสิทธิภาพการสกัดอยู่ระหว่าง 40-100% (Jefferys, 1970) ปัญหาของวิธีนี้คือใช้ตัวทำละลายเป็นปริมาณมาก และความไม่คงที่ของประสิทธิภาพการสกัด จะเห็นได้ชัดว่าค่าใช้จ่ายในการแยกสารจิบเบอเรลลินสูงกว่าค่าใช้จ่ายในกระบวนการหมัก ดังนั้นทำให้ผลิตภัณฑ์มีราคาแพง

1.7.4 <u>วิธีการแลกเปลี่ยนประจุภาคด้วยเรซิน</u> (Ion-exchange)

เป็นวิธีการแยกจิบเบอเรลลิน โดยใช้เรซินหรือตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดแอนไอออน ที่มีสมบัติในการยึดกรดจิบเบอเรลลิกไว้บนหมู่ฟังก์ชันนัลของตัวเรซิน เช่น Amberlite IRA 401, Duolite A 41, Dowex 1-X2 (Merck & Co., 1960) แล้วชะด้วยตัวทำละลาย เช่น 5-7%กรดไฮโดรคลอริกในเมธานอล 5-7%กรดซัลฟุริกในเมธานอล แอมโมเนียมคลอไรด์ในเมธานอล หรือแอมโมเนีย จากนั้นนำชั้นตัวทำละลายที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายน้ำให้ถึงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับการตกผลึก แล้วสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต ทำให้สารสกัดที่ได้เข้มข้นขึ้น และชักนำให้เกิดการตกผลึกในตัวทำละลายที่เย็นจัด วิธีดังกล่าวสามารถสกัดแยกกรดจิบเบอเรลลิกได้ 80-90% วิธีนี้ทำให้เกิดการสิ้นเปลืองเรซินและตัวทำละลาย

เอกสารสิทธิบัตร US Patent 3,118,908 (Roux, 1964a) ได้รายงานการศึกษาโดยใช้วิธีการตกตะกอนของกรดอินทรีย์ โปรตีน และรงควัตถุซึ่งเป็นการกำจัดสิ่งปนเปื้อนในน้ำหมัก โดยการผสมน้ำหมักกับสารออกไซด์ของโลหะอัลคาไลน์เอิร์ธ (alkaline earth metal hydroxide) เช่น เติม $Ba(OH)_2$ 3-5 กรัมต่อลิตรของน้ำหมัก ทำการกรองแยกตะกอนออก แล้วผ่านสารละลายที่กรองได้ลงคอลัมน์ของ weak anion exchange resin เช่น Amberlite IR-4B (acetate or formate form) ความสามารถในการยึดกับจิบเบอเรลลินของเรซิน คิดปริมาณได้ประมาณ 150 มิลลิกรัมของจิบเบอเรลลินต่อลบ.ซม.ของเรซิน กรดจิบเบอเรลลิกถูกชะจากเรซินอย่างช้าๆด้วย 1N แอมโมเนีย หรือสารละลายเกลือของแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมไดฟอสเฟต หรืออาจใช้เมธานอลที่ถูก acidified ด้วยกรดซัลฟูริกหรือกรดไฮโดรคลอริก fraction แรกๆ ของสารละลายที่ชะได้ (eluate) จะมีความเข้มข้นของจิบเบอเรลลินสูงและมีความบริสุทธิ์พอที่จะทำการตกผลึกโดยตรง หลังจากทำการสกัดสารละลายที่ชะได้ด้วยเอทธิลอะซิเตต แล้วทำให้สารสกัดที่ได้เข้มข้นขึ้น ทำการตกผลึกจิบเบอเรลลิน ผลึกที่ได้จะมีจิบเบอเรลลิน 77% ประสิทธิภาพการสกัดของวิธีนี้เกือบถึง 100% นอกจากนี้ในเอกสารสิทธิบัตรยังอธิบายถึงขั้นตอนการทำผลึกดิบที่ได้จากการตกผลึกดังกล่าวให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นถึง 95% (จากเดิมมีความบริสุทธิ์ 77%purity) ไว้ในรายงานเอกสารสิทธิบัตร US Patent 3,118,909 (Roux, 1964b) ทำได้โดยการดูดซับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนแรกบนผงถ่านกัมมันต์ และชะจิบเบอเรลลินออกจากผงถ่านด้วยตัวทำละลาย เช่นเอทธิลอะซิเตต จากนั้นนำไประเหยให้เข้มข้นขึ้นและทำการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกในเอทธิลอะซิเตตบริสุทธิ์ ล้างผลึกและทำให้ผลึกแห้ง แต่ยังพบว่าการใช้เรซินนี้ในการแยกจิบเบอเรลลิน อาจประสบกับปัญหา ได้แก่ ปริมาณของเรซินมากที่ต้องการใช้ในกระบวนการนี้ เนื่องจากปริมาณที่มากของสิ่งปนเปื้อนและกรดอินทรีย์ในน้ำหมักที่ถูกดูดซับบนเรซินพร้อมกับจิบเบอเรลลิน นอกจากนั้นวงแลคโตนของโมเลกุลจิบเบอเรลลินอาจถูกทำลายได้บนเรซิน หรือในระหว่างทำการชะ ภายใต้ภาวะที่เป็นด่าง ทำให้จิบเบอเรลลินสูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพได้

ต่อมาในปี ค.ศ. 1981 Heropolitanski และคณะ (อ้างถึงใน Kumar and Lonsane, 1989) ได้หลีกเลี่ยงปัญหาข้างต้นซึ่งรายงานในเอกสารสิทธิบัตร German [East] Patent DD 152,578 โดยใช้เรซินสังเคราะห์ ชนิดที่ไม่มีประจุ และพื้นผิวไม่มีขั้วหรือมีขั้วอ่อนๆ เช่น Amberlite XAD-4, XAD-2 และ XAD-7 จิบเบอเรลลินยึดบนเรซินชนิดนี้ได้มากเมื่อเทียบกับปริมาณสิ่งปนเปื้อนที่ถูกดูดซับในปริมาณที่น้อยมาก จิบเบอเรลลินที่ถูกดูดซับถูกชะด้วยสาร

ละลายน้ำของตัวทำละลายเช่นเมธานอล อะซิโตน หรือ เอธานอล จิบเบอเรลลินและสิ่งปนเปื้อนสามารถถูกชะด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน แต่ต่างกันที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายที่ใช้ ตัวอย่างเช่น การชะจิบเบอเรลลินทำได้โดยการชะด้วย 35-80% เมธานอล และด้วย อะซิโตนที่ความเข้มข้น >70% หรือ <45% ส่วนสิ่งปนเปื้อนทำการชะได้ด้วย 80-95% เมธานอล หรือด้วย 45-70% อะซิโตน ในรายงานอ้างว่าโดยวิธีนี้สามารถแยกจิบเบอเรลลินจากน้ำหมักได้ ประมาณ 70 % อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการแยกของวิธีนี้ยังไม่เป็นที่น่าพอใจมากนัก กล่าวคือ เมื่อใช้ 35% เมธานอล จะชะกรดจิบเบอเรลลิก ได้ 55% และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมธานอลสูงขึ้น ทำให้ชะกรดจิบเบอเรลลิกได้ถึง 95% แต่ขณะเดียวกันก็สามารถชะสิ่งปนเปื้อนได้ถึง 85% ด้วย

ในปี ค.ศ.1983 มีเอกสารสิทธิบัตร European Patent EP 0024951(Graebe and Rademachev, 1983 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991) ได้รายงานถึงวิธีที่แก้ปัญหาดังกล่าว โดยใช้เรซินสังเคราะห์ที่มีสมบัติไม่มี ionic hydrophilic group เช่น Wofatit Y59 โดยให้จิบเบอเรลลินถูกดูดซับบนเรซินชนิดนี้ แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการชะจิบเบอเรลลินออกด้วยน้ำ พบว่าสิ่งปนเปื้อน 80% ของสิ่งปนเปื้อนที่มีในน้ำหมักจะถูกแยกออกจากน้ำหมักโดยไม่สูญเสียจิบเบอเรลลิน นอกจากนี้การชะจิบเบอเรลลินอาจทำได้โดยใช้น้ำหรือสารละลายน้ำของตัวทำละลายเช่น เมธานอล เอธานอล หรืออะซิโตน ความเข้มข้นที่ดีสุดของตัวทำละลายในสารละลายตัวชะคือ 40% จะได้จิบเบอเรลลิน 83-97% เมื่อเทียบกับจิบเบอเรลลินที่มีอยู่ในน้ำหมัก ปริมาณของตัวทำละลายอาจลดลงโดยการเพิ่ม pH ให้สูงเป็น 7-10 หรือโดยการเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายตัวชะเป็น 30-40 °ซ โดยประสิทธิภาพการแยกคงที่และไม่ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง

1.8 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

จิบเบอเรลลินเป็นผลิตภัณฑ์เทคโนโลยีทางชีวภาพที่นำมาใช้กันมากในอุตสาหกรรมการเกษตร เป็นฮอร์โมนพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด สามารถเพิ่มการติดผลและเพิ่มขนาดของผล ส่งเสริมการงอกของเมล็ดและการเจริญของตาที่มีการพักตัว กระตุ้นการลำเลียงอาหารและแร่ธาตุอาหารในเซลล์สะสมอาหารของเมล็ด (นพดล จรัสสัมฤทธิ์, 2537) ใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอาหารสำหรับ

เลี้ยงเนื้อเยื่อ (Brucker and Blechschmidt, 1991) นอกจากนี้ยังมีการนำกรดจิบเบอเรลลิกมาใช้ในวงการอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นส่วนประกอบใน ครีมเครื่องสำอาง (Parkinson, 1985) และ แฮร์โทนิค (Ayukawa, 1985)

ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกขึ้นใช้เองภายในประเทศ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เนื่องจากไม่สามารถรวบรวมตัวเลขการนำเข้าได้ แต่จากการประมาณการของผู้ประกอบการพบว่ามีการนำเข้ามีมูลค่าปีละประมาณ 10-15 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 10-20 ต่อปี โดยนำเข้าจากประเทศ อังกฤษ สเปน จีน และญี่ปุ่น เป็นส่วนใหญ่ โดยลักษณะที่นำเข้าอยู่ใน 2 ลักษณะ คือนำเข้าในรูปผงสำเร็จรูปที่เกษตรกรนำไปละลายใช้ได้เลย และในรูปของสารละลายเข้มข้น โดยผู้นำเข้าต้องมาผสมหรือเจือจางให้มีความเข้มข้นตามที่กำหนด แล้วจึงนำไปจำหน่ายให้กับเกษตรกรอีกต่อหนึ่ง (ศักดิ์ดา นำชัยสี่พัฒนา และ ประเสริฐ สุขเกษม, 2533)

จากการประมาณการนำเข้าของจิบเบอเรลลินที่เพิ่มขึ้นทุกปีนั้น จึงน่าจะมีการผลิตขึ้นเองภายในประเทศ สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ดำเนินงานวิจัยในประเด็นต่างๆเกี่ยวกับการผลิตจิบเบอเรลลินมาอย่างต่อเนื่อง การแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักและทำให้บริสุทธิ์ก็เป็นอีกประเด็นหนึ่งที่พึงได้รับการพิจารณาวิเคราะห์ วิจัย และดำเนินการให้มีประสิทธิภาพ เพื่อสร้างให้เทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นครบวงจร มีเศรษฐศาสตร์กระบวนการที่มีความเป็นไปได้เชิงพาณิชย์มากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้มุ่งที่จะหาขั้นตอนและวิธีการแยกสกัดกรดจิบเบอเรลลิกและทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคร่วมกับการใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย เพื่อปรับปรุงให้ได้วิธีที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์กรดจิบเบอเรลลิกตรงความต้องการ กล่าวคือวิธีการใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคจะสามารถช่วยลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดกรดจิบเบอเรลลิก เนื่องจากการใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคจะเป็นขั้นตอนที่ทำให้เพิ่มความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกและทำให้บริสุทธิ์ขึ้น

1.9 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลพื้นฐานจากรายงานและสิทธิบัตร
2. ศึกษาทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนต่างๆที่จำเป็นในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักของ Gibberella fujikuroi โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาค ชนิดแอนไอออนเรซิน
3. ปรับปรุงขั้นตอน Adsorption และ Elution ให้มีการดูดซับและชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากคอลัมน์อย่างมีประสิทธิภาพ
4. ประเมินประสิทธิผลการแยก และความบริสุทธิ์ของกรดจิบเบอเรลลิกที่แยกได้