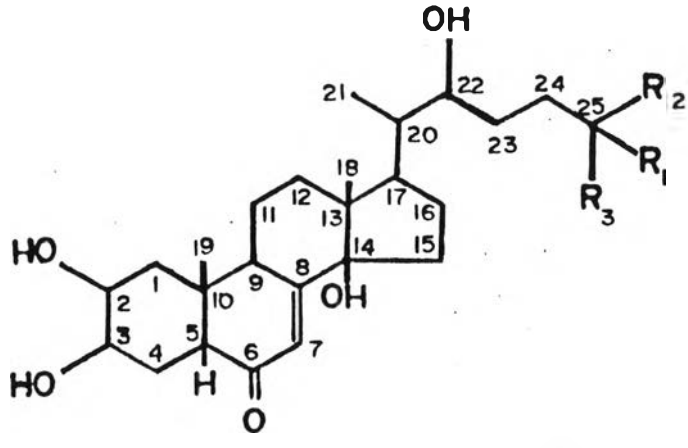
บทที่ 1

บทนำ

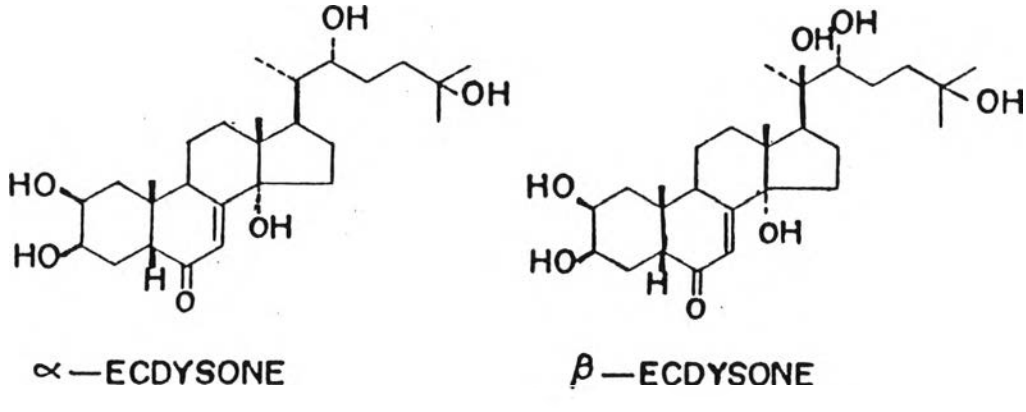
เอคไดโซน (Ecdysone) เป็นกลุ่มของฮอร์โมนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการลอกคราบและการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนในสัตว์จำพวกอาร์โธรพอด (Arthropod)(Butenandt และ Karlson, 1954) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์ (Zooecdysone) และฮอร์โมนลอกคราบจากพืช (Phytoecdysone) ฮอร์โมนทั้ง 2 ประเภทนี้ เป็นสารจำพวกโพลีไฮดรอกซีสเตอรอยด์ (Polyhydroxy Steroid) ซึ่งมีออกซิเจนที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 22 ของ side chain และมักจะเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxylgroup) (Siddall, 1971) ซึ่งเป็นโครงสร้างโดยทั่วไปของฮอร์โมนลอกคราบ (รูปที่ 1)

เอคไดโซนที่ค้นพบชนิดแรก คือ อัลฟา-เอคไดโซน (α-ecdysone) จากดักแด้ของหนอนไหม (silkworm; Bombyx mori) เมื่อปี ค.ศ.1954 (Butenandt และคณะ, 1954) ฮอร์โมนเอคไดโซนชนิดที่สองที่รู้จัก คือ เบตา-เอคไดโซน (β-ecdysone) หรือ 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20-hydroxyecdysone) ได้จากหนอนไหมเช่นกัน (Karlson, 1956) โดยที่เบตาเอคไดโซนมีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 20 ในขณะที่อัลฟา-เอคไดโซนเป็นอะตอมไฮโดรเจน (รูปที่ 2)

สำหรับเบตา-เอคไดโซนนี้ มีชื่อเรียกต่างกันในการค้นพบจากแหล่งต่างๆ ในเวลาใกล้เคียงกัน ได้แก่ Crustecdysone แยกจากกุ้งนาง (Crayfish; Jasus lalandei) เป็นฮอร์โมนลอกคราบที่แยกได้จากสัตว์พวก Crustacean เป็นครั้งแรก (Hamshire และ Horn, 1966) 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20-hydroxy ecdysone) จากหนอนไหม (Hocks และ Wiechert, 1966) เอคไดสเตอรอน (Ecdysterone) จากหนอนไหม (Hoffmeister และ Grutzmacher, 1966)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของฮอร์โมนลอกคราบโดยทั่วไป



รูปที่ 2 สูตรโครงสร้างของอัลฟาและเบตา-เอคไดโซน

นอกจากนี้มีฮอร์โมนลอกคราบที่แยกได้จากสัตว์อีกหลายชนิด เช่น 20,26-ไดไฮดรอกซีเอคไดโซน (20,26-dihydroxyecdysone) จาก Tobacco Hornworm (Manduca sexta) (Thompson และคณะ, 1967) คอลลินเอคไดโซนเอ และคอลลินเอคไดโซนบี (Callinecdysone A และ Callinecdysone B) จากปู Callinectes sapidus (Faux และคณะ, 1969)

สำหรับฮอร์โมนลอกคราบในพืชสกัดได้ครั้งแรก คือ เบตา-เอคไดโซน จาก Polypodium elatus ในปี ค.ศ.1966 (Galbraith และ Horn, 1966) ต่อมา คือ โพนาสเตอโรน (Ponasterone) จาก Podocarpus nakaii Hay (Nakanishi และคณะ, 1966) อัลฟา-เอคไดโซนจาก Polypodium vulgare L. (Heinrich และ Hoffmeister, 1967) และ Pteridinium aquilinum (Kaplanis และคณะ, 1967) เนื่องจากพบสารพวกเอคไดโซนจากพืชที่ต่างวงศ์ตระกูลกัน ทำให้มีการวิจัยหาฮอร์โมนลอกคราบจากพืชกันอย่างกว้างขวางพบว่ามีพืชต่างๆถึง 1,056 ชนิด ที่ผลิตฮอร์โมนลอกคราบได้ (Imai และคณะ, 1969) ปัจจุบันมีการค้นพบฮอร์โมนลอกคราบจากพืชที่มีโครงสร้างแตกต่างกันไปประมาณ 40 ชนิด (Nakanishi,1971) ในจำนวนนี้เบตา-เอคไดโซนเป็นฮอร์โมนลอกคราบที่กระจาย อยู่กว้างขวางมากที่สุดในพืชและสัตว์

มีการศึกษาผลของสารจำพวกเอคไดโซนต่อการลอกคราบในสัตว์จำพวกอาร์โธรพอด (Robbin และคณะ, 1968; Robbin และคณะ, 1970) พบว่าสารจำพวกเอคไดโซนมีผลต่อการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ในสัตว์จำพวกแมลง นอกจากนี้ยังมีผลต่อสัตว์จำพวก crustacean โดยช่วยย่นระยะการลอกคราบของกุ้งนางให้เร็วขึ้น (Krishnakumaran และSchneidermann, 1970) นอกจากนี้ยังพบว่าเบตา-เอคไดโซนสามารถย่นระยะเวลาในการลอกคราบของกุ้งนาง Procambarus simulans ที่ไม่มีก้านตาในช่วง early premolt ได้ (Lowe และคณะ, 1968) ในกุ้ง Lobster พบว่า เบตา-เอคไดโซน ลดระยะเวลา intermolt และชักนำ premature molt ได้ (Flint, 1972)

เนื่องจากฮอร์โมนลอกคราบที่แยกได้จากสัตว์พวก Arthropods มีปริมาณน้อยมาก ประมาณ 10^{-5} - 10^{-9} เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่สามารถตรวจพบในพืชได้สูงมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง (Hikino และ Takemoto, 1974) ดังนั้น จึงเห็นได้ว่า

พืชเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตฮอร์โมนลอกคราบ ในปี ค.ศ.1967 ได้มีการสกัดเบตา-เอคไดโซนจาก Vitex megapotamica (Rimpler และ Schulz, 1967) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานว่า เบตา-เอคไดโซนสามารถผลิตได้จากเปลือกต้นไข่เน่า Vitex glabrata ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองอยู่ในวงศ์ Verbenaceae (แผนกเภสัชศาสตร์และแผนกเภสัชเวท จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย, 2521) โดยสามารถสกัดเบตา-เอคไดโซน ได้ผลผลิตสูงมากใกล้เคียงกับ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้พบอนุพันธ์อีกตัวหนึ่ง คือ 11-อัลฟา-เอคไดสเตอโรน (11-α-ecdysterone) (Werawatanametin, Podimuang และ Suksamrarn, 1986) เบตา-เอคไดโซนที่แยกได้จากเปลือกต้นไข่เน่านี้ กลุ่มนักวิจัยของภาควิชาชีวเคมี และวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทดลองเสริมกับอาหารสูตรสำเร็จเลี้ยงกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนและวัยรุ่น พบว่ามีการเจริญเติบโตโดยความยาวและน้ำหนักดีกว่ากุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้ผสมฮอร์โมนลอกคราบ (พัฒนัญญา, 2525) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารที่สกัดได้จากผลแห้งของ Vitex glabrata ฉีดเข้าในกุ้งก้ามกรามพบว่าสามารถกระตุ้นให้กุ้งก้ามกรามลอกคราบได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Chaiwatcharakool, 1986) กลุ่มนักวิจัยของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิตเกาะสีชัง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พรศิลป์ ผลพันธิน และคณะ, 2530) ได้รายงานว่า ฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซน มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นของกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) และกุ้งแชบ๊วย (Penaeus merguiensis) ได้อย่างสมบูรณ์

ดังนั้นการผลิตฮอร์โมนลอกคราบจากพืชไข่เน่าให้ได้ปริมาณสูงจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ มีการใช้เทคนิค HPLC ศึกษาระดับของเบตา-เอคไดโซน ในส่วนใบและต้น เปรียบเทียบกับส่วนเปลือก (ปัทมา และคณะ, 2532) พบว่าเปลือกต้นไข่เน่ามีการผลิตและสะสมเบตา-เอคไดโซนไว้ได้สูงถึง 2.513 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง ในขณะที่ใบและต้นผลิตได้ระดับต่ำมาก คือ 0.133 และ 0.147 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่การที่จะผลิตฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซนโดยการลอกเปลือกต้นไข่เน่าจะทำให้ต้นแคระแกร็นและตายได้ อีกประการหนึ่งต้นไข่เน่าเป็นไม้ยืนต้น เจริญเติบโตช้า ไม่เหมาะในการลงทุนปลูกและบำรุงรักษา เทคนิคที่น่าสนใจและปัจจุบันกำลังเป็นที่นิยมกัน คือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture Technique)

เป็นเวลาหลายร้อยปีมาแล้วที่พืชเป็นแหล่งผลิตสารเคมีแหล่งใหญ่โดยเฉพาะทางด้านเภสัชกรรมและอาหาร ในช่วงเวลาไม่นานมานี้ได้มีความสนใจเกี่ยวกับการใช้พืชเป็นแหล่งผลิตสารเคมีให้กว้างขวางยิ่งขึ้นโดยเทคนิคที่นำมาใช้กันอย่างมากเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์นี้ ก็คือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ตลอดเวลา 50 ปีที่ผ่านมา ได้มีความพยายามในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดต่างๆกันอย่างกว้างขวาง (Butenko, 1985) อันเนื่องมาจากความสามารถของเซลล์พืชที่เจริญในอาหารแข็งและอาหารเหลว จนเกิดเป็นอวัยวะหรือต้นพืชได้ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งในการผลิตและเพิ่มผลผลิตจากพืชนอกเหนือจากการเพาะปลูกตามธรรมชาติ (Fowler, 1984) โดยมีข้อได้เปรียบดังต่อไปนี้

ก. ไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น สภาพอากาศ ศัตรูพืช สภาพพื้นดิน เป็นต้น

ข. สามารถควบคุมการผลิตทั้งในด้านปริมาณและเวลาที่ต้องการซึ่งนำไปถึงความสามารถควบคุมด้านการตลาดได้ดียิ่งขึ้น

ค. สามารถสร้างผลผลิตที่มีคุณภาพและปริมาณแน่นอน

ง. ควบคุมต้นทุนการผลิตได้รัดกุมกว่า

ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Tissue Culture Technique) เพื่อผลิตสารผลิตภัณฑ์กำลังเป็นที่สนใจของวงการอุตสาหกรรมทางเทคโนโลยีชีวภาพทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell) กลุ่มของเซลล์ (tissue) ตลอดจนอวัยวะ (organ) ของพืช นอกจากนี้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการขยายพันธุ์พืช (Plant Propagation) การปรับปรุงพันธุ์พืช (Plant Breeding) โรคพืช (Plant Pathology) และอื่น ๆ (Thomas และ Davey, 1975)

เนื่องจากสารเคมีที่ได้จากพืชซึ่งใช้กันอย่างกว้างขวาง ในด้านเภสัชกรรม อาหาร เกษตรกรรม ตลอดจนเครื่องสำอางค์ต่าง ๆ นั้นส่วนใหญ่เป็นสารจำพวกทุติยภูมิ (Secondary Metabolites) ได้แก่ สารจำพวก อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ฟีนอลลิคส์ (Phenolics) สเตอรอยด์ (Steroids) เทอร์ปีนอยด์ (Terpenoids) สารน้ำมันระเหย (Volatile oils) เป็นต้น (Mantell และ Smith, 1984; Fowler, 1984; Balandrin และ Klocke, 1988) ตัวอย่างสารจำพวกทุติยภูมิประเภท

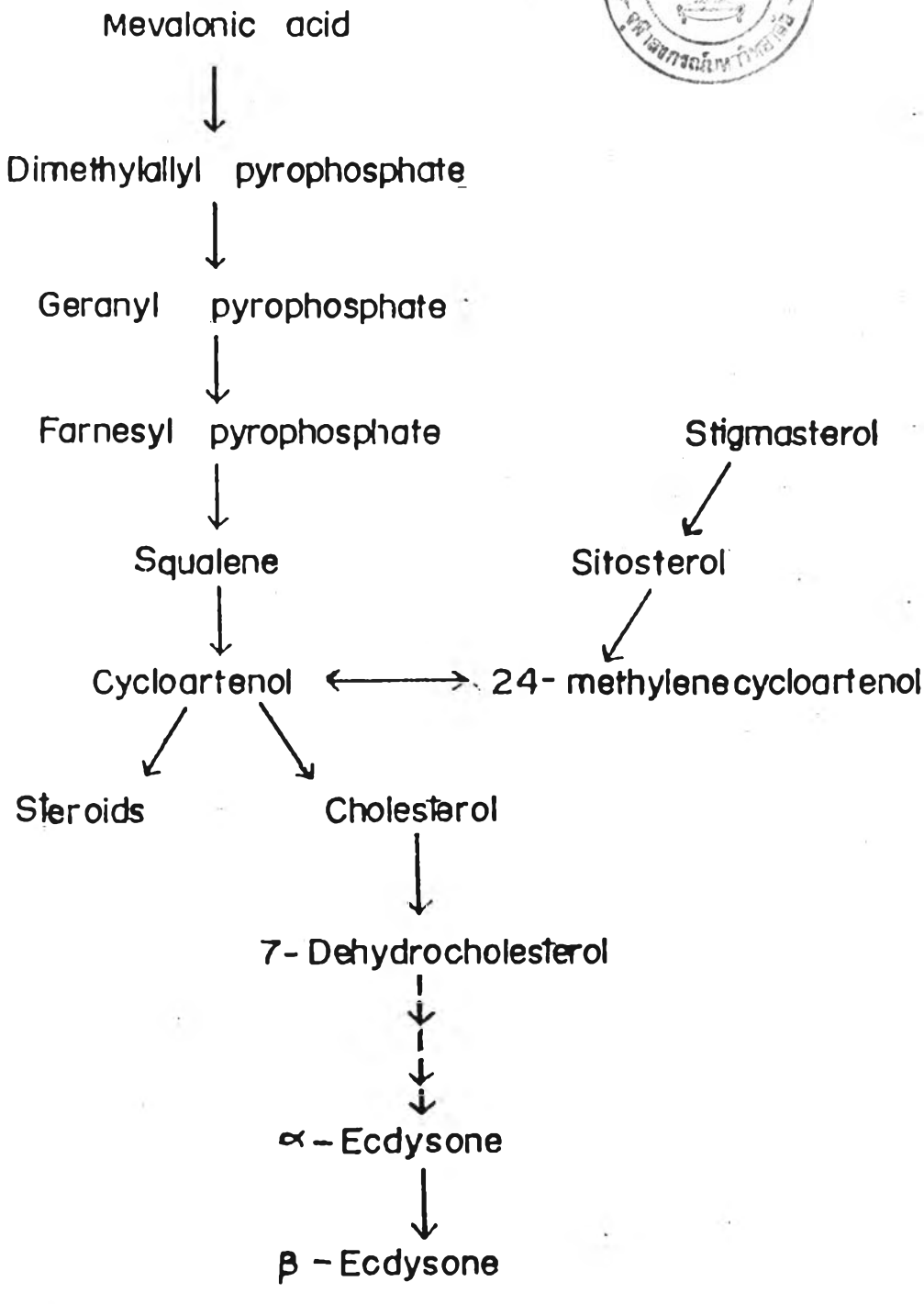
ต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 1

สารทุติยภูมิที่ได้จากพืชนั้นส่วนมากมีราคาแพง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่ออกฤทธิ์ต่อขบวนการชีววิทยาของสิ่งมีชีวิต (biologically active compounds) เช่น ยารักษาโรค สารปรุงกลิ่นอาหาร เป็นต้น ในธรรมชาติโดยทั่วไปพืชจะผลิตสารทุติยภูมิในปริมาณน้อยมาก ตลอดจนขั้นตอนในการสกัด การแยกสาร และการทำให้สารบริสุทธิ์มักจะยุ่งยากและใช้เวลานาน (Balandrin และ Klocke, 1988) ดังนั้นการเพิ่มผลผลิตของสารทุติยภูมิเหล่านี้จึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น การผลิตสารชิโคนิน (shikonin) จากการเลี้ยงเซลล์ Lithospermum erythrorhizon ในอาหารเหลว (Fujita และคณะ, 1981) การเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ของเบตา-เมทธิลดิจิท็อกซิน (β-metyldigitoxin)ไปเป็น เบตา-เมทธิลไดจ็อกซิน (β- methyldigoxin) ของเซลล์ Digitalis lanata (Alfermann และคณะ, 1984) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ดี ในการเปลี่ยนสารชนิดหนึ่งไปเป็นสารที่ต้องการ (biotransformation) วิธีการเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตสารทุติยภูมิกันอย่างแพร่หลาย โดยการเลือกใช้สารตัวกลางของวิถีการผลิตสาร (metabolite) และสารตั้งต้น(precursor) ตัวอย่างเช่น การเติมกรดซิตริก (citric acid) ออร์นิทีน (ornithine) และอะซิโตอะซีเตทเอสเทอร์ (aceto acetate ester) ลงในเซลล์ Hyoscyanus muticus L. สามารถเพิ่มผลผลิตอัลคาลอยด์ขึ้น 2.5 เท่า (Koul และคณะ, 1989) ผลผลิตของนิโคติน (nicotine) สามารถเพิ่มขึ้นได้ 3-4 เท่า ในเซลล์ Nicotiana tabacum โดยการใช้ยูเรีย (urea) (Ravishankar, 1982) ผลผลิตสารสเตอรอยด์ในเซลล์ Trigonella foeman-graecum Linn. เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า โดยการเพิ่มโคเลสเตอรอล (cholesterol) (Khanna และคณะ, 1975)

วิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบในพืชนั้นมีขั้นตอนการสังเคราะห์ และสารตั้งต้นหลายชนิด (Vickery และ Vickery, 1981) (รูปที่ 3) สารตั้งต้นที่สำคัญชนิดหนึ่ง คือ โคเลสเตอรอล โดยที่โคเลสเตอรอลจะเปลี่ยนเป็น 7-ดีไฮโดรโคเลสเตอรอล (7- dehydrocholesterol) จากนี้มีขั้นตอนต่าง ๆ อีกหลายขั้นตอนซึ่งยังไม่ทราบแน่นอน มาเป็น อัลฟา-เอคไดโซน ต่อจากนั้นจึงเป็น เบตา-เอคไดโซน (Robbin และคณะ,1970)

ตารางที่ 1 สารจำพวกทุติยภูมิจากพืชที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรม (Fowler, 1984)

ประเภทอุตสาหกรรม	สารทุติยภูมิ	ชนิดของพืช	ประโยชน์
เภสัชกรรม	Codeine (alkaloid)	Papaver somniferum	Analgesic
	Diosgenin (steroid)	Dioscorea deltoidea	Anti-fertility agents
	Quinine (alkaloid)	Cinchona ledgeriana	Antimalarial
	Digoxin (cardiac glycoside)	Digitalis lanata	Cardiatonic
	Scopolamine (alkaloid)	Datura stramonium	Antihypertensive
	Vincristine (alkaloid)	Catharanthus roseus	Antileukaemic
เคมีเกษตร	Pyrethrin	Chrysanthemum cinerariaefolium	Insecticide
อาหารและเครื่องดื่ม	Quinine (alkaloid)	Cinchona ledgerriana	Bittering agent
	Thaumatin (chalcone)	Thaumatococcus danielli	Non-nutritive sweetener
เครื่องสำอางค์	Jasmine	Jasminum sp.	Perfume

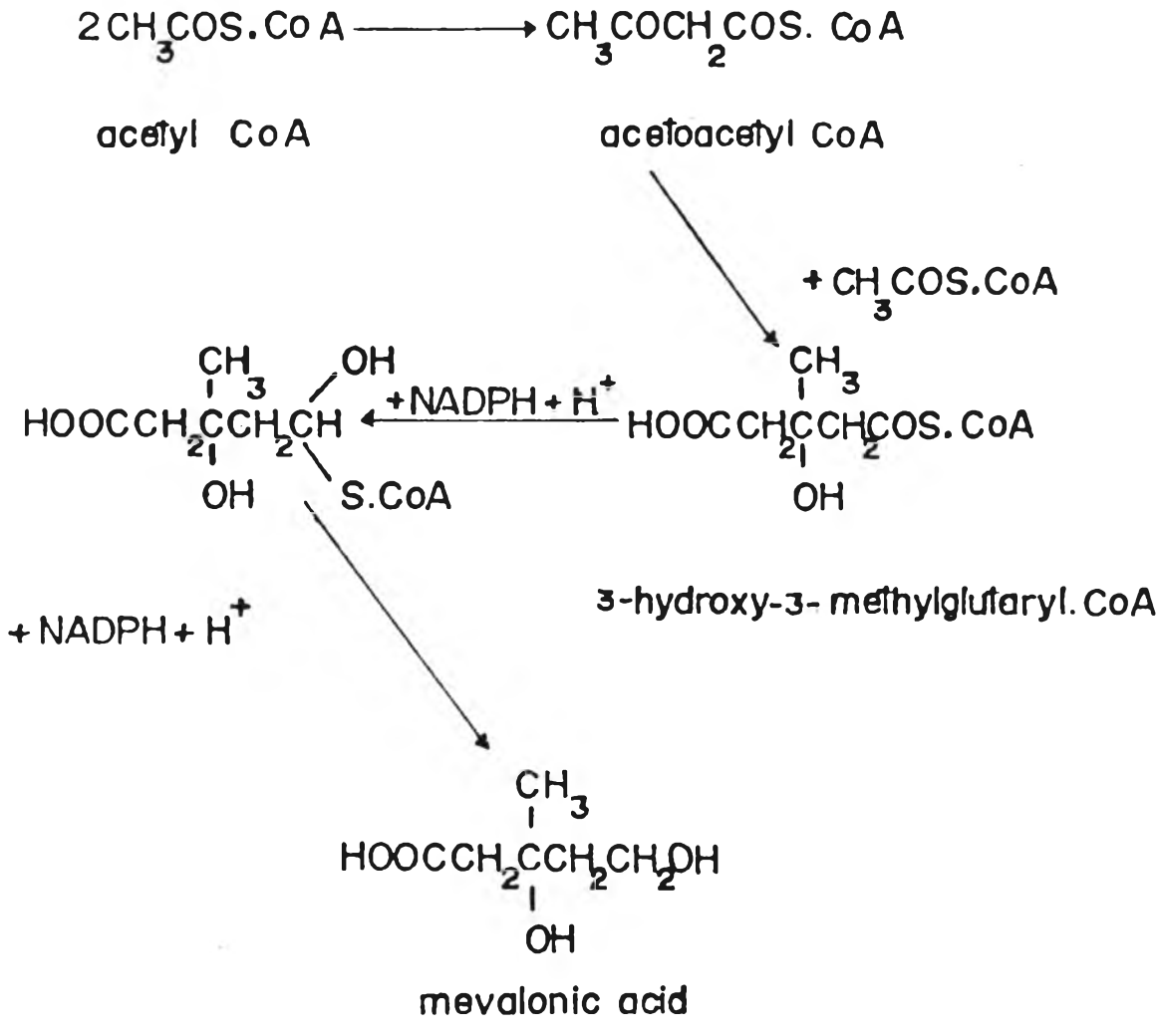


รูปที่ 3 การสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบในพืช (Vickery และ Vickery, 1981)

เนื่องจากโคเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นที่ใกล้ชิดกับขั้นตอนการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบเป็นอย่างมาก สารโคเลสเตอรอลหรือสารตัวกลางในวิถีการสังเคราะห์โคเลสเตอรอล เช่น กรดเมวาโลนิค (Mevalonic acid) (Vickery และ Vickery, 1981) ซึ่งสังเคราะห์มาจากอะซิติลโคเอนไซม์เอ (acetyl Co.A) (รูปที่ 4) ซิโตสเตอรอล (Sitosterol) และสติกมาสเตอรอล (Stigmasterol) (รูปที่ 5) ซึ่งเป็นสารสเตอรอลที่พบทั่วไปในพืช โดยสติกมาสเตอรอลได้จากปฏิกิริยาดีแสทูเรชั่น (desaturation) ของซิโตสเตอรอล (Vickery และ Vickery, 1981)(รูปที่ 3) ทั้งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารในกลุ่มสเตอรอลและอนุพันธ์ของพืชหลายชนิด เช่น การผลิตสารโพรเจสเตอโรน (Progesterone) จากเซลล์ Digitalis lanata (Bennett และคณะ, 1964) การผลิตสารไดออสเจนิน (diosgenin) ของเซลล์ Dioscorea deltoidea (Stohs และคณะ, 1974)

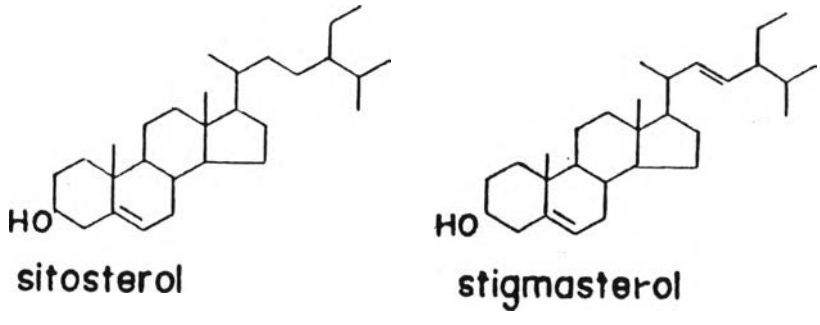
ได้มีการผลิตฮอร์โมนลอกคราบ เบตา-เอคไดโซน โดยการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากส่วนต้น ใบและเปลือกของพืชไข่เน่าในอาหารเพาะเลี้ยง Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) ที่มีสารกระตุ้นการเจริญ 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid และ Benzyl adenine ที่เหมาะสมจะได้เซลล์แคลลัสที่ผลิตเบตา-เอคไดโซนได้เฉลี่ยประมาณ 0.015-0.02 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง (ปัทมา, 2533) ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชอีกแบบ คือ ใช้อาหารเหลว น่าจะนำมาทดลองใช้ควบคู่ไปกับการเติมสารตั้งต้นต่างๆที่ได้กล่าวมาแล้ว เพื่อเพิ่มผลผลิตสาร เบตา-เอคไดโซน

วิธีการวัดปริมาณฮอร์โมนลอกคราบที่นิยมปัจจุบันใช้วัดด้วยเครื่องแกสโครมาโตกราฟฟี (Gas Chromatography - GC) (Poole และคณะ, 1975; Bielby, 1980; Webster, 1985) และเครื่องไฮเพอฟอร์มมานซ์ ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) (Scalia และ Morgan, 1982; Lafont และคณะ, 1982; Wilson และคณะ, 1982) สำหรับการใช้ GC ต้องทำการ derivertisation ฮอร์โมนลอกคราบให้ได้เป็นสารไตรเมธิลไซลิลอีเทอร์ (Trimethyl silyl Ethers) เสียก่อน (Morgan, 1976; Bielby, 1980; Webster, 1985) การใช้ HPLC นิยมใช้สารดูดซับเป็น Octadesyl (C-18) (Lafont และ Martin-Somme, 1979; Wilson, 1980; Wright, 1983) การใช้ GC มีความยุ่งยากในการ derivertisation ฮอร์โมน



รูปที่ 4 การสังเคราะห์กรดเมวาโลนิค (Vickery และ Vickery, 1981)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 สูตรโครงสร้างของซิโตสเตอรอลและสติกมาสเตอรอล

ลอกคราบให้เป็นไดรเมธิลไซลิลอีเทอร์ ส่วนวิธี HPLC การเตรียมสารตัวอย่างสะดวกกว่าและยังเป็นวิธีที่มีความไว (sensitivity) สูงกว่าวิธีวิเคราะห์ด้วยเทคนิคของ GC (Wright, 1983

โครงการวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงศักยภาพของการผลิตฮอร์โมนลอกคราบจากพืชไข่เน่าโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและผลิต เบตา-เอคไดโซนโดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ศึกษาและพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวจากเซลล์แคลลัสส่วนต้น ใบและเปลือกของพืชไข่เน่า

2. ศึกษาผลกระทบของอาหารสูตรต่างๆ ต่อการเจริญของเซลล์ในอาหารเหลว

3. ศึกษาปัจจัยและองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีผลกระทบต่อการผลิตฮอร์โมนลอกคราบของเซลล์ในอาหารเหลว ได้แก่

3.1 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยง คือ อาหารสูตร MS และอาหารสูตร B5

3.2 สารตั้งต้นของการสังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ คือ โคเลสเตอรอล สติกมาสเตอรอล-ซิโตสเตอรอล และกรดเมวาโลนิก