บทที่ 1

บทนำ

1.1 การค้นพบจิบเบอเรลลิน-กรดจิบเบอเรลลิก

จิบเบอเรลลิน เป็นกลุ่มฮอร์โมนพืชที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของพืชในหลายลักษณะ เช่น หยุดระยะพักตัวของเมล็ด ช่วยให้เมล็ดงอก กระตุ้นการยืดยาวของลำต้น ก้าน ช่อดอก ช่วยให้พืชออกดอกและติดผล มีผลต่อการปรับเปลี่ยนเพศดอกในพืชบางชนิด และช่วยให้พืชที่แคระแกร็นเจริญเติบโตต่อไปได้ (Takahashi, Yamaguchi, and Yamane, 1986) การค้นพบเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1898 โดยนักโรคพืชชาวญี่ปุ่นชื่อ Hori จากการสังเกตต้นข้าวที่เป็นโรคบากานี (bakanae) หรือ foolish seedlings ข้าวที่เป็นโรคนี้ จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีลำต้นสูงชะลูดผิดปกติ มีสีเหลืองซีด และจะตายก่อนให้ผลผลิต Hori พบว่าสาเหตุของโรคบากานีเกิดจากเชื้อราชนิดหนึ่ง (Hori, 1898 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991) และได้รับการยืนยันจากการทดลองของ Kurosawa ในปี ค.ศ. 1926 ว่าเชื้อราที่พบในพืชที่เป็นโรคบากานี เป็นสาเหตุของโรคนี้ โดยการสร้างสารเคมีชนิดหนึ่งออกมา มีผลกระตุ้นให้ต้นพืชยืดยาวกว่าปกติ ทำลายระบบรากและยับยั้งการสร้างคลอโรฟิล (Kurosawa, 1926 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991) ปี ค.ศ. 1931 Wollenweber ได้จำแนกและเรียกราชนิดนี้ว่า " *Gibberella fujikuroi* " เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และเรียกว่า "*Fusarium moniliforme*" เมื่อมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Booth, 1971) ในปี ค.ศ. 1934 Yabuta และคณะสามารถสกัดแยกสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อพืช จากการเลี้ยงเชื้อราชนิดนี้ และตั้งชื่อสารนี้ว่า "จิบเบอเรลลิน" (Yabuta, Kambe, and Hayashi, 1934 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt,1991) หลังสงครามโลกครั้งที่ 2 การวิจัยเพื่อแยกสารจากเชื้อรานี้ ไม่ได้จำกัดอยู่ที่ญี่ปุ่นเท่านั้น ในอังกฤษและอเมริกาก็ได้มีการคัดเลือก ปรับปรุงสายพันธุ์และภาวะการเลี้ยงเชื้อรา จนสามารถแยกจิบเบอเรลลินได้อีกหลายชนิด ซึ่งมีโครงสร้างหลักเหมือนกัน แต่มีสมบัติทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน และเริ่มมีการวิจัยเพื่อนำจิบเบอเรลลินที่แยกได้มาใช้ประโยชน์ทางการเกษตร

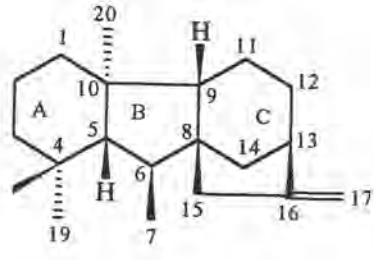
การค้นพบครั้งสำคัญเกิดในช่วงปี ค.ศ. 1950 บริษัท Imperial Chemical Industries (ICI) ประเทศอังกฤษ ได้ตกผลึกจิบเบอเรลลินจากเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อพืชเป็นอย่างมาก เรียกจิบเบอเรลลินชนิดนี้ว่า "กรดจิบเบอเรลลิก" (Curtis and Cross, 1954) ช่วงเวลา

เดียวกันในสหรัฐอเมริกา ได้มีการทดลองเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินสำหรับใช้ในการเกษตร และสามารถแยกจิบเบอเรลลินที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างสูงต่อพืช โดยตั้งชื่อว่า "จิบเบอเรลลิน X" (Stodola, et al.,1955) เมื่อทำการเปรียบเทียบสมบัติต่าง ๆ ก็พบว่า จิบเบอเรลลิน X ก็คือ กรดจิบเบอเรลลิกนั้นเอง ในเวลาต่อมา ญี่ปุ่นก็ประสบความสำเร็จในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกเช่นกัน โดยเรียกว่า "จิบเบอเรลลิน A_3" (Takahashi , et al., 1955)

ในเวลาใกล้เคียงกัน มีการค้นพบและสามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดต่าง ๆ และกรดจิบเบอเรลลิกจากพืชชั้นสูง หลังจากนั้น มีการค้นคว้าและค้นพบจิบเบอเรลลินชนิดใหม่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งจากพืชและเชื้อรา จนถึงปัจจุบัน สามารถแยกจิบเบอเรลลินชนิดที่ 110 ได้จากต้นผักขมและ oil palm sap เป็นผลสำเร็จ (Owen, et al., 1998) อย่างไรก็ตาม จิบเบอเรลลินที่นำมาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ กรดจิบเบอเรลลิก จิบเบอเรลลิน A_4 และ จิบเบอเรลลิน A_7 เท่านั้น โดยกรดจิบเบอเรลลิกเป็นจิบเบอเรลลินที่มีความสำคัญทางการเศรษฐกิจและให้ผลต่อพืชสูงสุดในปัจจุบัน (Bruckner and Blechschmidt,1991)

1.2 โครงสร้างและชนิดของจิบเบอเรลลิน

จิบเบอเรลลิน (gibberellin, GA_x) เป็นสารกลุ่มไดเทอร์พีนอยด์ (diterpene) ประกอบด้วยไอโซพีน (isopene) 4 โมเลกุล เรียงกันเป็นวงแหวน 4 วง เรียกว่า เอ็นท์-จิบเบอเรลเลน (ent-gibberellane) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของจิบเบอเรลลิน (Metzger, 1992) มีโครงสร้างดังรูปที่ 1-1

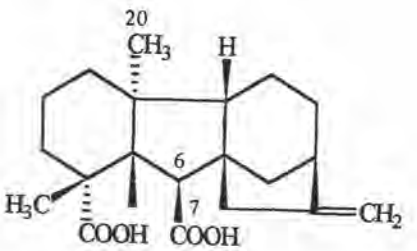


รูปที่ 1-1 โครงสร้างของ เอ็นท์-จิบเบอเรลเลน (Metzger, 1992)

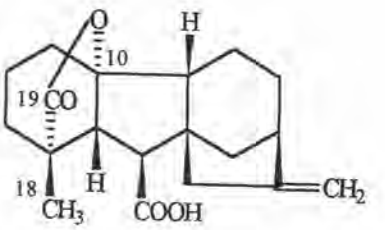
จิบเบอเรลลิน แบ่งเป็นชนิดต่าง ๆ ได้ประมาณ 110 ชนิด โดยมีตัวเลขกำกับเพื่อบอกชนิดของจิบเบอเรลลินและลำดับการค้นพบ เช่น GA_1, GA_2, และ GA_3 เป็นต้น จัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามจำนวนคาร์บอนที่พบในโมเลกุล คือ กลุ่มที่มีคาร์บอน 20 อะตอม มีโครงสร้างไดเทอร์พีนอย่าง

สมบูรณ์ ดังรูปที่ 1-2 ก ตัวอย่างเช่น GA_{12}, GA_{14}, GA_{23}, GA_{38} และ GA_{42} เป็นต้น และกลุ่มที่มีคาร์บอน 19 อะตอม เป็นกลุ่มที่ขาดคาร์บอนตำแหน่งที่ 20 มีสะพานแลคโตน เชื่อมระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 กับ 10 ดังรูปที่ 1-2 ข เป็นกลุ่มที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ตัวอย่างเช่น GA_1, GA_3, GA_4, GA_{32} และ GA_{51} เป็นต้น (Metzger,1992)

(ก)



(ข)



รูปที่ 1-2 โครงสร้างของจิบเบอเรลลิน 2 กลุ่ม (Metzger, 1992)

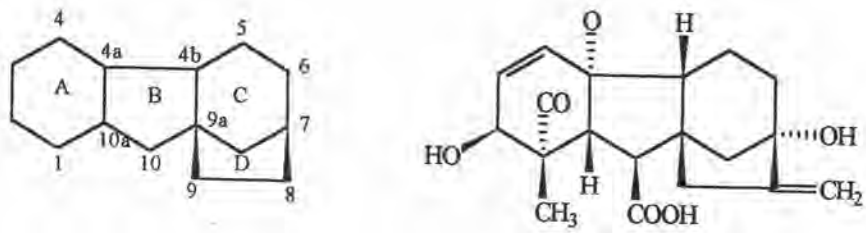
ก กลุ่มที่มีคาร์บอน 20 อะตอม

ข กลุ่มที่มีคาร์บอน 19 อะตอม

จิบเบอเรลลินชนิดต่าง ๆ ยังมีความแตกต่างของตำแหน่งพันธะคู่ ชนิดและตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชัน ความแตกต่างทางโครงสร้างนี้เอง ทำให้จิบเบอเรลลินแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทั้งด้านสมบัติทางเคมีและสมบัติทางชีวภาพ (Handson, 1983 ; Bruckner and Blechschmidt,1991) สำหรับจิบเบอเรลลินที่มีสมบัติเด่นที่สุดและถูกนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด คือ กรดจิบเบอเรลลิก (Bruckner and Blechschmidt, 1991)

1.3 กรดจิบเบอเรลลิก

กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid, GA_3) มีชื่อทางเคมีว่า 2, 4a, 7-Trihydroxy-1-methyl-8-methylenegibb-3ene-1,10-dicarboxylic acid 1,4a-lactone ชื่อสามัญอื่น ๆ คือ GA_3, จิบเบอเรลลิน A_3 และ จิบเบอเรลลิน X มีสูตรโมเลกุล $C_{19}H_{22}O_6$ มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1-3 น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 346.37 ลักษณะเป็นผลึกสีขาว จุดหลอมเหลว 232-235 องศาเซลเซียส มีค่าคงที่ของการแตกตัว (Ka) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเท่ากับ 1×10^{-4} ละลายได้เล็กน้อยในน้ำและอีเธอร์ ละลายได้ปานกลางในเอทธิลอะซิเตต ละลายได้ดีในเมธานอล เอทธานอล และอะซิโตน ละลายได้อย่างรวดเร็วในสารละลายไฮโดรเจนคาร์บอเนตและสารละลายโซเดียมอะซิเตต (Budarri, 1989) มีความเป็นพิษต่ำ คือมีค่า LD_{50} มากกว่า 15,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนูทดลอง 1 กิโลกรัม จึงไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Yubuta and Hayashi, 1939 อ้างถึงใน Kumar and Lonsane, 1989)



รูปที่ 1-3 สูตรโครงสร้างของกรดจิบเบอเรลลิก (Budarri, 1989)

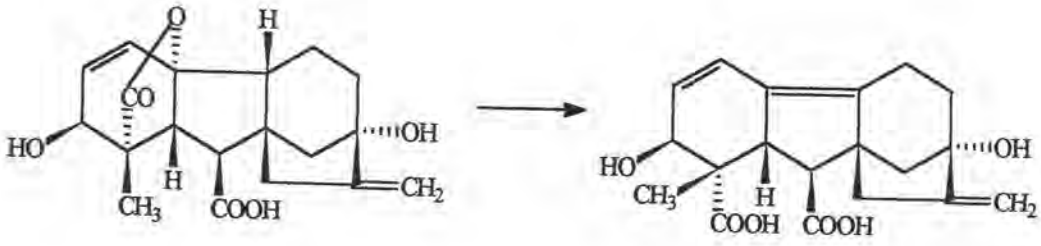
1.4 การสูญเสียเสถียรภาพของกรดจิบเบอเรลลิก

กรดจิบเบอเรลลิกมีความเสถียรสูงสุดเมื่ออยู่ในรูปผลึกแห้ง แต่จะเกิดการสลายตัวและสูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพไป เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายบางประเภท ดังต่อไปนี้

1.4.1 การสลายตัวเมื่อละลายในน้ำ

กรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายอยู่ในน้ำหรือในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย จะเกิดการสลายตัวไปเป็น กรดไอโซจิบเบอเรลลิก (iso-GA_3) , กรดจิบเบอเรลลีนิค (gibberellenic acid),

แอลโลจิบเบอริก (allogibberic), 9-อิพิแอลโลจิบเบอริก (9-epi-allogibberic) และกรด 9,11-ไดดีไฮโดรแอลโลจิบเบอริก (9,11-didehydroallo-gibberic acid) ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ขึ้นกับเวลาในการเกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิ และพีเอชของสารละลาย (Moffatt, 1960 ; Cross, Grove and Morrison, 1961 ; Pryce, 1973a, 1973b, 1974 อ้างถึงใน Perez,et al.,1996) ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกที่พบได้ในปริมาณสูงกว่าสารอื่น ๆ คือ กรดจิบเบอเรลลีนิค ดังแสดงในรูปที่ 1-4 โดยพบได้สูงถึง 4 % ในผลึกของกรดจิบเบอเรลลิก และสูงถึง 10 % ในน้ำหมักจากการผลิตระดับอุตสาหกรรม กรดจิบเบอเรลลีนิคเป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Kavanagh and Kuzel, 1958)



กรดจิบเบอเรลลิก กรดจิบเบอเรลลีนิค

รูปที่ 1-4 การสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกไปเป็นกรดจิบเบอเรลลีนิค
(Cross, et al., 1961)

Perez และคณะ (1996) ได้ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในสารละลายบัฟเฟอร์ในน้ำ ที่พีเอช 5 และ 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการติดตามปริมาณกรดจิบเบอเรลลีนิคที่เกิดขึ้นระหว่างการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิก พบว่า เมื่อพีเอชสูงขึ้น กรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายอยู่ในน้ำจะเกิดการสลายตัวได้มากขึ้น มีค่าครึ่งชีวิตของปฏิกิริยา (half-life of reaction) ที่พีเอช 5 เท่ากับ 77.8 ชั่วโมง ที่พีเอช 7 เท่ากับ 57.8 ชั่วโมง และเมื่ออุณหภูมิของสารละลายสูงขึ้น กรดจิบเบอเรลลิกก็จะเกิดการสลายตัวมากขึ้น (Cross, 1954) ค่าครึ่งชีวิตของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำ ซึ่งมีพีเอชเท่ากับ 3-4 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 1-1 (National Business Corporation)

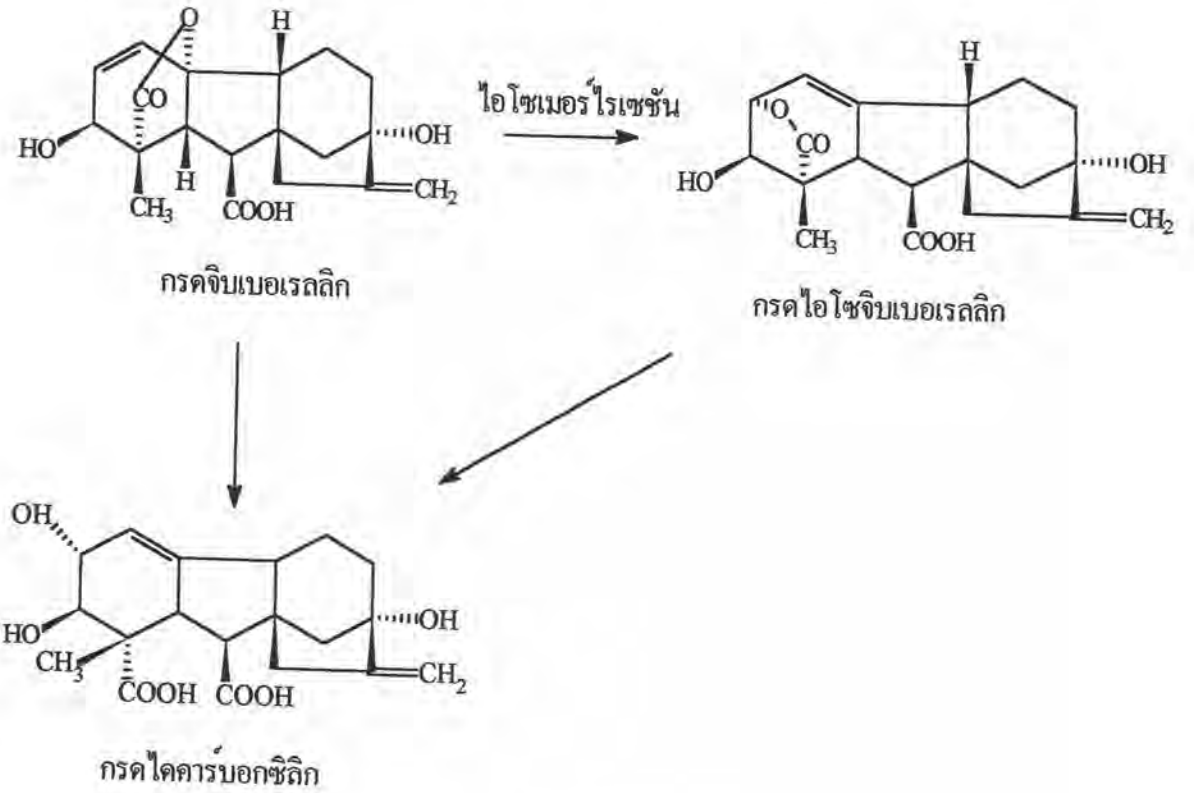
ตารางที่ 1-1 ค่าครึ่งชีวิตของสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกในน้ำ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (National Business Corporation)

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ค่าครึ่งชีวิต (ชั่วโมง)
20	336
27	78
32	36
36	19
50	2

1.4.2 การสลายตัวในเบส

กรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายในสารละลายเบสเจือจาง เช่น สารละลาย 0.01 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลาย 0.01 โมลาร์ แอมโมเนีย จะเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชัน (isomerization) ไปเป็นกรดไอโซจิบเบอเรลลิก แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นกรดไดคาร์บอกซิลิก (dicaboxylic acid) เมื่อความเข้มข้นของเบสสูงขึ้น ปฏิกิริยาการสลายตัวจะเกิดเร็วขึ้น เมื่อสารละลายมีความเป็นเบสสูงถึงค่าหนึ่ง เช่น 0.3 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดจิบเบอเรลลิกจะเกิดการสลายตัวไปเป็นกรดไดคาร์บอกซิลิก โดยตรง ปฏิกิริยาการสลายตัวแสดงดังรูปที่ 1-5 (Cross, et al., 1961 ; du Preez, Qian and Kilian, 1993)

du Preez และคณะ (1993) พบว่า กรดจิบเบอเรลลิกที่ละลายอยู่ในสารละลาย 0.01 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส จะสลายตัวไปเป็นกรดไอโซจิบเบอเรลลิกอย่างสมบูรณ์ ภายใน 2 ชั่วโมง ขณะเดียวกัน กรดไอโซจิบเบอเรลลิกจะค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดไดคาร์บอกซิลิก โดยใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 144 ชั่วโมง กรดไดคาร์บอกซิลิกที่เกิดขึ้น เป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพียง 20 % ของกรดจิบเบอเรลลิกเท่านั้น

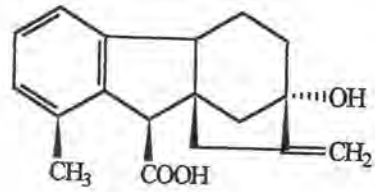


รูปที่ 1-5 ปฏิกิริยาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกไปเป็นกรดไอโซจิบเบอเรลลิก และกรดไดคาร์บอกซิลิก (Cross, et al., 1961)

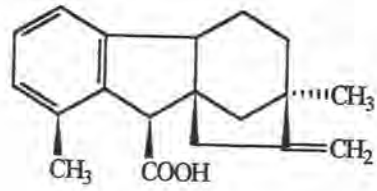
1.4.3 การสลายตัวในกรด

กรดจิบเบอเรลลิกเมื่อละลายในสารละลายกรด จะเกิดการสลายตัวให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด ที่พบได้ในปริมาณสูง คือ กรดแอลโลจิบเบอริก และกรดจิบเบอริก (gibberic acid) เมื่อกรดจิบเบอเรลลิกละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง เช่น สารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกในน้ำ ที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส จะสลายตัวได้เป็นกรดแอลโลจิบเบอริก มีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 1-6 ก และที่ภาวะรุนแรงขึ้น กรดแอลโลจิบเบอริกจะเกิดปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชันได้เป็นกรดจิบเบอริก สูตรโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 1-6 ข สารทั้ง 2 ชนิดที่เกิดขึ้น เป็นสารที่ไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อพืช (Cross, 1954, 1960 ; Grove and Mulholland, 1960)

(ก)



(ข)



รูปที่ 1-6 สูตรโครงสร้างของสารที่เกิดจากการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิก ในสารสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด (Cross, 1960)

ก. กรดแอลโลจิบเบอริก

ข. กรดจิบเบอริก

1.4.4 การถูกทำลายด้วยคลอรีน

กรดจิบเบอเรลลิกจะสลายตัวเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีคลอรีนอิสระ (Cl_2) ผสมอยู่ โดยคลอรีน 1 ส่วนในสารละลายล้านส่วน (ppm) จะทำลายกรดจิบเบอเรลลิกในปริมาณที่เท่ากัน (National Business Corporation)

1.5 แหล่งผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

กรดจิบเบอเรลลิกสามารถผลิตขึ้นจากแหล่งต่าง ๆ ดังนี้

1.5.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

มีการใช้ 2-อัลลีออกซีอนิโซล (2-allyoxyanisole) และ4-เบนซิลออกซีไซโดเฮกซาโนน (4-benzyloxycyclohexanone) เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์กรดจิบเบอเรลลิก วิธีนี้มีข้อเสีย คือ สารตั้งต้นมีราคาแพง และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้ไม่คงที่ (Coley, et al.,1978)

1.5.2 การสกัดจากพืช

กรดจิบเบอเรลลิกเป็นจิบเบอเรลลินที่พบได้มากที่สุดในพืชชั้นสูงโดยทั่วไป และมีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อพืชมากที่สุดด้วย (Bruckner and Blechschmidt, 1991) แหล่งสังเคราะห์กรดจิบเบอเรลลิกพบได้ในหลายส่วนของพืชในปริมาณที่แตกต่างกัน พบมากบริเวณยอดอ่อน ปลายราก และเมล็ดที่กำลังงอก การสกัดกรดจิบเบอเรลลิกจากพืช ต้องอาศัยตัวทำละลาย เช่น เมธานอล, อะซิโตน และเอทธิลอะซิเตต เป็นต้น (Russell, 1975) ข้อเสียของวิธีนี้ คือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่พบในพืชมีน้อยมาก ประมาณ 0.001-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักสดของพืช (Lonsane and Kumar, 1991) ดังนั้นการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยสกัดจากพืช ต้องใช้พืชจำนวนมากกว่าจะได้กรดจิบเบอเรลลิกปริมาณตามต้องการ จึงไม่เหมาะสำหรับการผลิตเพื่อการค้า

1.5.3 การหมักเชื้อรา

เป็นวิธีผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม โดยการเลี้ยงเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ในอาหารเหลวในถังหมักที่ควบคุมภาวะอย่างเหมาะสม มีการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อเพิ่มผลผลิตอย่างต่อเนื่อง โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา การหาสูตรอาหารและภาวะการหมักที่เหมาะสม (Bruckner and Blechschmidt, 1991)

1.6 การแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมัก

การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกจากการหมักเชื้อรา เป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกมากกว่าวิธีสกัดจากพืช และมีขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากและต้นทุนต่ำกว่าการสังเคราะห์ทางเคมี ในระหว่างการหมัก กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกขับออกมานอกเซลล์ ละลายอยู่ในน้ำหมัก ผลผลิตที่ได้จากการหมัก ประกอบด้วย เซลล์และเส้นใยของเชื้อรา กรดจิบเบอเรลลิก จิบเบอเรลลินชนิดอื่น ๆ อีกเล็กน้อย สารอาหารที่ใช้ไม่หมด กรดอินทรีย์ กรดอนินทรีย์ รงควัตถุ และสารเมธาบอไลต์อื่น ๆ (Merck & Co., 1960 ; Roux, Denis, and Oise, 1964a ; Bruckner and Blechschmidt, 1991) เซลล์ เส้นใยของเชื้อรา และอนุภาคของแข็งอื่น ๆ จะถูกแยกออกจากน้ำหมักด้วยวิธีกล เช่น การกรองหรือการปั่นเหวี่ยง น้ำหมักหลังการแยกเชื้อราสามารถนำมาแยกกรดจิบเบอเรลลิก ด้วยวิธีต่อไปนี้

1.6.1 การแยกด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟี

ก่อนการแยกด้วยวิธีทางโครมาโตรกราฟี ต้องทำการสกัดแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทธิลอะซิเตต (ethyl acetate), ไอโซเอมิวอะซิเตต (isoamyl acetate), เมธิลเอ็นโพรพิวคีโตน (methyl n-propyl ketone) และเมธิลไอโซบิวทิวคีโตน (methyl isobuthyl ketome) สารสกัดในชั้นตัวทำละลายอินทรีย์จะประกอบด้วย กรดจิบเบอเรลลิก จิบเบอเรลลินชนิดอื่น ๆ และสิ่งเจือปนบางส่วน นำสารสกัดไประเหยให้แห้งภายใต้สุญญากาศเตรียมสารจากการระเหยให้อยู่ในรูปของสารละลายที่เหมาะสม แล้วนำไปแยกด้วยวิธีทางโครมาโตรกราฟี เช่น ธิน-เลเยอร์โครมาโตรกราฟี (thin-layer chromatography), คอลัมน์โครมาโตรกราฟี (column chromatography), โพลีไวนิลไพโรลิคอนโครมาโตรกราฟี (polyvinylpyrrolidone chromatography), ซิลิกาเจล พาร์ทิชันโครมาโตรกราฟี (silica gel partition chromatography) เป็นต้น วิธีทางโครมาโตรกราฟี สามารถแยกกรดจิบเบอเรลลิกและจิบเบอเรลลินชนิดต่าง ๆ ออกจากกัน ประสิทธิภาพในการแยกสูงสุดที่มีรายงาน คือ 90-98 % แต่เป็นวิธีที่แยกสารได้ปริมาณน้อย มักใช้ในการแยกหรือตรวจสอบความบริสุทธิ์ของกรดจิบเบอเรลลิกในระดับห้องทดลอง ไม่เหมาะสำหรับการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Powell and Tautvydas, 1967 ; Durley et al., 1972 ; Durley and Pharis, 1972 ; Glenn et al., 1972)

1.6.2 การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์

เป็นวิธีแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมัก ที่ถูกพัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่น เพื่อใช้แยกกรดจิบเบอเรลลิกในระดับอุตสาหกรรม โดยเติมผงถ่านประมาณ 10 เท่าของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่มีในน้ำหมัก กวนเป็นเวลา 5 ชั่วโมง หรือผ่านน้ำหมักเข้าคอลัมน์บรรจุผงถ่าน เพื่อให้ผงถ่านดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกไว้ แล้วชะผงถ่านด้วยตัวทำละลาย เช่น เมธานอล และอะซิโตน เพื่อแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกมา วิธีนี้มีข้อเสีย คือ ผงถ่านมีความสามารถในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกได้น้อยและใช้ดูดซับได้เพียงครั้งเดียว ไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้มีต้นทุนสูง นอกจากนั้นการชะกรดจิบเบอเรลลิกต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก และไม่สามารถชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากผงถ่านได้ทั้งหมด จึงไม่นิยมใช้ในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกในปัจจุบัน (Imperial Chemical Industries Ltd., 1957 ; Merck & Co., 1960 ; Pitel, Vining, and Arsenault, 1971 ; Bruckner and Blechschmidt, 1991)

1.6.3 การสกัดด้วยตัวทำละลาย

เป็นการสกัดน้ำหมักด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ที่ไม่รวมตัวกับน้ำ (water-immiscible organic solvent ตัวทำละลายแต่ละชนิดจะให้ประสิทธิภาพในการสกัดแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 1-2 ตัวทำละลายที่นิยมใช้มากที่สุด คือ เอทธิลอะซิเตต เนื่องจากมีราคาถูก จุดเดือดต่ำ ละลายน้ำได้น้อย และมีความเป็นพิษต่ำ การสกัดแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักด้วยตัวทำละลาย มีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (Calam and Curtis, 1960)

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> เป็นการสกัดกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมัก ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม โดยปรับพีเอชของน้ำหมักก่อนการสกัดให้อยู่ระหว่าง 1.5-4

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> เป็นการสกัดสารละลายกรดจิบเบอเรลลิก ให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น โดยสกัดกรดจิบเบอเรลลิกจากชั้นตัวทำละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 6-8 นำชั้นบัฟเฟอร์ที่มีกรดจิบเบอเรลลิกละลายอยู่มาปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 3-4 แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอีกครั้ง นำชั้นตัวทำละลายมาระเหยจนได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง กรดจิบเบอเรลลิกก็จะตกผลึกออกมา

การสกัดด้วยตัวทำละลาย มีประสิทธิภาพในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักอยู่ระหว่าง 40-100 % (Jefferys, 1970) ปัญหาของวิธีนี้ คือ ต้องใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก การนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง ต้องใช้เวลานานในการสกัด และประสิทธิภาพในการสกัดไม่คงที่ (Merck & Co., 1960 ; Bruckner and Blechschmidt, 1991)

ตารางที่ 1-2 ประสิทธิภาพในการสกัดแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ของตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (Calam and Curtis, 1960)

ชนิดตัวทำละลาย	ประสิทธิภาพการสกัด (%)
เอธิลอีเธอร์ (ethyl ether)	32
ไดเอธิลคีโตน (diethyl ketone)	74
เมธิลนอร์มอลโพรพิวคีโตน (methyl n-propyl ketone)	79
เมธิลเอทธิลคีโตน (methyl ethyl ketone)	57
เมธิลไอโซบิวทิวคีโตน (methyl isobuthyl ketone)	72
1:1- ไดเมทอกซีอีเทน (1 : 1- dimethoxyethane)	19
ไดเอทธิลคาร์บอเนต (diethyl carbonate)	39
เบนซิลแอลกอฮอล์ (benzyl alcohol)	86
บิวทานอล (sec-buthanol)	85
นอร์มอลเอมิวแอลกอฮอล์ (n-amyl alcohol)	91
ไซโคเฮกซาโนน (cyclohexanone)	95
เมธิลไซโคเฮกซาโนน (methylcyclohexanone)	87
ไซโคเฮกซานอล (cyclohexanol)	98
เอธิลโพรพิโอเนต (ethyl propionate)	54
เอธิลนอร์มอลบิวธิเรต (ethyl n-butyrate)	39
นอร์มอลบิวทิวแลกเตต (n-butyl lactate)	89
เอธิลอะซิเตต (ethyl acetate)	71
ไอโซโพรพิวอะซิเตต (isopropyl acetate)	57
เบต้าเอททอกซีเอทธิลอะซิเตต (β-ethoxyethyl acetate)	88
นอร์มอลบิวธิลอะซิเตต (n-buthyl acetate)	54
3-เมทอกซีบิวธิลอะซิเตต (3-methoxybuthyl acetate)	88
นอร์มอลบิวธิลอะซิเตต + 10% นอร์มอลบิวทานอล (n-buthyl acetate + 10% n-butanol)	73
เอมิวอะซิเตต (amyl acetate)	68

1.6.4 การแยกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน

ในการดูดซับกรดจิบเบอเรลลิกของเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบ ไอออนลบของกรดจิบเบอเรลลิกจะเข้าจับกับเรซินแทนที่เคาน์เตอร์ไอออน โดยอาศัยการเกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอกซิล (COO^-) ที่มีประจุลบของกรดจิบเบอเรลลิกกับหมู่ฟังก์ชันที่มีประจุบวกของเรซิน เป็นวิธีแยกกรดจิบเบอเรลลิกที่มีรายงานว่าใช้ในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักในการผลิตระดับอุตสาหกรรม (Crueger, 1987 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991) มีเอกสารสิทธิบัตรหลายฉบับได้กล่าวถึงวิธีแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักด้วยตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออน โดยมีขั้นตอนแตกต่างกันไป ดังต่อไปนี้

บริษัท Merck & Co. (1960) ใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดแรง (strong anion exchange resin) เช่น Dowex-1, Dowex-2, Amberlite IRA-400, Amberlite IRA-401, Amberlite IRA-411, Duolite A-41, Duolite A-101 และ Duolite A-102 โดยผ่านน้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิกเข้าคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน แล้วชะออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายของตัวทำละลายอินทรีย์ในน้ำ เช่น สารละลายเมธานอล, ไอโซโพรพานอล หรือสารละลายอะซิโตนในน้ำ ที่มีการเติมกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดอะซิติก ในสารละลาย วิธีการนี้สามารถแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักได้สูงถึง 98 %

เอกสารสิทธิบัตรประเทศสหรัฐอเมริกา US Patent 3,118,908 และ 3,118,909 (Roux, Denis and Oise, 1964a , 1964b) รายงานการแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักไว้ 2 ขั้นตอน คือ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> เป็นการกำจัดสิ่งเจือปนบางส่วนออกจากน้ำหมัก โดยเติมสารประกอบของโลหะอัลคาไลเอิร์ธที่มีฤทธิ์เป็นเบส (basic alkaline earth compound) เช่น แบเรียมออกไซด์ ลงในน้ำหมัก เพื่อตกตะกอนกรดอินทรีย์และกรดอนินทรีย์ที่เจือปนอยู่ในน้ำหมัก นำน้ำหมักที่กรองแยกตะกอนออกแล้ว ผ่านเข้าคอลัมน์บรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนบวกชนิดอ่อน (weak cation exchange resin) เช่น Amberlite IRC-50 เพื่อกำจัดสารประกอบอัลคาไลเอิร์ทที่เหลือ

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> แยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมัก โดยผ่านน้ำหมักเข้าคอลัมน์ที่บรรจุเรซินแลกเปลี่ยนไอออนลบชนิดอ่อน (weak anion exchange resin) เช่น Amberlite IR-4B กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกดูดซับด้วยเรซิน

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> ชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากเรซินอย่างช้า ๆ ด้วยสารละลายแอมโมเนียในน้ำ หรือสารละลายของเกลือแอมโมเนียมในน้ำ ที่มีพีเอชไม่น้อยกว่า 7 แล้วนำสารที่ชะได้มาตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก

ในเอกสารอ้างว่า ประสิทธิภาพในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกด้วยวิธีนี้สูงเกือบ 100 %

ปัญหาที่อาจจะเกิดกับการแยกกรดจิบเบอเรลลิกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน คือ กรดจิบเบอเรลลิกอาจเกิดการสลายตัวและสูญเสียฤทธิ์ทางชีวภาพไป เนื่องจากวงแหวนแลคโตนซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในโมเลกุลที่ทำให้กรดจิบเบอเรลลิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพ อาจถูกทำลายระหว่างการชะกรดจิบเบอเรลลิกออกจากเรซินด้วยสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นเบส หรือระหว่างการเกิดอันตรกิริยากับหมู่ฟังก์ชันของเรซิน (Bruckner and Blechschmidt,1991)

ในเอกสารสิทธิบัตรประเทศเยอรมัน Germany (East) Patent DD 152,578 (Heropolitahski, 1981) ได้เสนอทางเลือกเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกระหว่างการแยกด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน โดยใช้เรซินที่ไม่มีประจุ และมีความพรุนสูง เช่น Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-2 และ Amberlite XAD-7 ในการดูดซับ ในเอกสารอ้างว่า กรดจิบเบอเรลลิกถูกดูดซับบนเรซินชนิดนี้ได้ในปริมาณมาก ขณะที่สิ่งเจือปนจะถูกดูดซับได้น้อยมาก กรดจิบเบอเรลลิกและสิ่งเจือปน สามารถถูกชะออกจากเรซินด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน แต่ที่ความเข้มข้นของตัวทำละลายแตกต่างกัน กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกชะได้ด้วยสารละลาย 35-80 % เมธานอลในน้ำ สารละลาย 40-96 % เอทธานอลในน้ำ และสารละลายอะซิโตนในน้ำ ที่มีปริมาณอะซิโตนน้อยกว่า 40 % หรือมากกว่า 70 % ส่วนสิ่งเจือปนจะถูกชะได้ด้วย สารละลาย 80-95 % เมธานอลในน้ำ หรือสารละลาย 45-70 % อะซิโตนในน้ำ เอกสารอ้างว่า วิธีนี้สามารถแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักได้ประมาณ 70 % และสามารถแยกได้สูงถึง 90 % เมื่อใช้ สารละลาย 90% อะซิโตนในน้ำเป็นตัวชะ อย่างไรก็ตาม (Bruckner and Blechschmidt, 1991) ประสิทธิภาพของการแยกด้วยวิธีนี้ยังไม่น่าพอใจมากนัก กล่าวคือ เมื่อใช้สารละลาย 35 % เมธานอลในน้ำจะชะกรดจิบเบอเรลลิกได้ 55 % และเมื่อความเข้มข้นของเมธานอลสูงขึ้น จะชะกรดจิบเบอเรลลิกได้ถึง 95 % แต่ขณะเดียวกันก็ชะสิ่งเจือปนได้ถึง 85 % ด้วย

ในเอกสารสิทธิบัตรยุโรป European Patent EP 0024951 (Graebe and Rademacher, 1983 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991) ได้กล่าวถึงวิธีแก้ไขปัญหา ที่สิ่งเจือปนถูกชะออกจากเรซินพร้อมๆ กับกรดจิบเบอเรลลิก โดยใช้เรซินสังเคราะห์ที่มีขนาดเล็กละเอียด และไม่มีหมู่ฟังก์ชั่นที่มีประจุและชอบที่จะทำปฏิกิริยากับน้ำ (ionic hydrophilic group) เช่น Wofatit Y 59 กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกดูดซับด้วยเรซินและถูกชะออกด้วยน้ำหรือสารละลายเมธานอล, เอทธานอล หรือ อะซิโตนในน้ำ ความเข้มข้นของตัวทำละลายในสารละลายตัวชะที่เหมาะสมที่สุด คือ 40 % จะชะกรดจิบเบอเรลลิกได้ 83-97 % โดยที่ 80 % ของสิ่งเจือปนในน้ำหมักจะถูกดูดซับไว้ในเรซิน

1.7 การตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก

การตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก เป็นกระบวนการเพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ของกรดจิบเบอเรลลิก มีรายงานหลายฉบับกล่าวถึงการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก (Cross,1954 ; Calam, et al., 1960 ; Roux, et al.,1964) ว่า กรดจิบเบอเรลลิกที่แยกได้จากน้ำหมัก จะถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของสารละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทธิลอะซิเตต , สารละลายผสมของเมธานอลกับไลท์ปิโตรเลียม และสารละลายผสมของเอทธิลอะซิเตตกับไลท์ปิโตรเลียม จากนั้นจะนำไประเหยให้มีความเข้มข้นสูงพอ แล้วทิ้งให้ตกผลึก อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานฉบับใดกล่าวถึงขั้นตอนการตกผลึกที่แน่นอน

1.8 ประโยชน์ของกรดจิบเบอเรลลิก

กรดจิบเบอเรลลิกเป็นจิบเบอเรลลินที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการเกษตรมากที่สุด เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงต่อพืช และสามารถผลิตได้ในปริมาณมากจากการเลี้ยงเชื้อราเมื่อเปรียบเทียบกับจิบเบอเรลลินตัวอื่น ๆ การเปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของจิบเบอเรลลินชนิดต่าง ๆ ในตารางที่ 1-3 จากการทดสอบทางชีวภาพ 5 วิธี ได้แก่ Barley aleurone bioassay เป็นการทดสอบผลของจิบเบอเรลลินที่มีต่อการเพิ่มปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ที่เมล็ดข้าวบาร์เลย์ผลิตออกมาจากเนื้อเยื่อชั้น aleurone Dwarf pea bioassay เป็นการทดสอบความสามารถของจิบเบอเรลลินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของลำต้นของถั่วแคระ ภายใต้แสงสีแดง โดยวัดความยาวที่เพิ่มขึ้นของต้นถั่วแคระ Lettuce hypocotyl bioassay ทดสอบความสามารถของจิบเบอเรลลินในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นอ่อนของผักกาดหอม Tan-ginbozu dwarf rice microdrop bioassay ทดสอบผลของจิบเบอเรลลินที่มีต่อการยืดต้นของต้นข้าวแคระ และ Cucumber hypocotyl bioassay เป็นการทดสอบผลของจิบเบอเรลลินต่อการเจริญของต้นอ่อนของพืชตระกูลแตง แสดงให้เห็นว่า กรดจิบเบอเรลลิกมีฤทธิ์ทางชีวภาพโดยรวมสูงกว่าจิบเบอเรลลินชนิดอื่น ๆ (Reeve and Crozier, 1975)

ตารางที่ 1-3 เปรียบเทียบฤทธิ์ทางชีวภาพของจิบเบอเรลลินชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธีทดสอบทางชีวภาพ 5 วิธี (Reeve and Crozier, 1975)

จิบเบอเรลลิน	Barley aleurone	Dwarf Pea	Lettuce hypocotyl	Dwarf rice	Cucumber hypocotyl
GA_1	++++	+++	+++	+++	++
GA_2	++++	++	++	+++	++
GA_3	++++	++++	+++	++++	++
GA_4	+++	+++	++	++	+++
GA_5	++	+++	++	+++	+
GA_6	++	++	++	+++	+
GA7	+++	+++	++++	+++	++++
GA_8	+	+	+	+	0
GA_9	+	++	+++	++	+++
GA_{10}	+	0	0	+++	++
GA_{11}	+	0	0	+	+
GA_{12}	0	0	0	+	+
GA_{13}	+	0	+	+	0
GA_{14}	0	0	0	+	0
GA_{15}	0	+	++	++	++
GA_{16}	+	++	+	+	+
GA_{17}	0	0	0	+	0
GA_{18}	0	++	+	+++	0
GA_{19}	0	0	+	+++	0
GA_{20}	+	+	+++	+++	0
GA_{21}	0	0	+	0	0
GA_{22}	+++	+++	++	+++	0
GA_{23}	++	++	+	+++	0
GA_{24}	0	+	0	+++	+++
GA_{25}	0	0	0	0	+

ตารางที่ 1-3 (ต่อ)

จิบเบอเรลลิน	Barley aleurone	Dwarf Pea	Lettuce hypocotyl	Dwarf rice	Cucumber hypocotyl
GA_{26}	0	0	0	0	0
GA_{27}	0	+	0	+	0
GA_{28}	0	0	0	+	0
GA_{29}	+	0	0	+	0
GA_{30}	+++	+++	+	++	+
GA_{31}	+	++	0	++	0
GA_{32}	+++	+++	++	++++	+++
GA_{33}	+	+	+	+	0
GA_{34}	0	+	0	+	0
GA_{35}	+++	++	+	++	+++
GA_{36}	++	++	+	+++	+++
GA_{37}	++	++	++	+++	+++
GA_{38}	+	+++	0	+	+

หมายเหตุ

++++	หมายถึง	มีฤทธิ์ทางชีวภาพสัมพัทธ์สูงมาก
+++	หมายถึง	มีฤทธิ์ทางชีวภาพสัมพัทธ์สูง
++	หมายถึง	มีฤทธิ์ทางชีวภาพสัมพัทธ์ปานกลาง
+	หมายถึง	มีฤทธิ์ทางชีวภาพสัมพัทธ์ต่ำ
0	หมายถึง	มีฤทธิ์ทางชีวภาพสัมพัทธ์ต่ำมากหรือไม่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในทางการเกษตรได้นำกรดจิบเบอเรลลิก มาใช้เพิ่มคุณภาพและปริมาณของผลผลิตในหลายลักษณะ เช่น ใช้เร่งการเจริญเติบโต เพิ่มปริมาณผลผลิต เพิ่มการติดผลและเพิ่มคุณภาพผล ช่วยให้พืชออกดอก ใช้ในการเปลี่ยนแปลงเพศดอก และกระตุ้นการงอกของเมล็ดและตา เป็นต้น (วิชาญ ศิริผล, 2506 ; พีรเดช ทองอำไพ, 2529)

กรดจิบเบอเรลลิกถูกนำมาใช้ประโยชน์มากที่สุดและแพร่หลายที่สุด ในการเพาะปลูกองุ่น ช่วยทำให้ช่อองุ่นยืดยาวและโปร่งมากขึ้น เพิ่มขนาดของผล ใช้ฆ่าเกสรตัวผู้ทำให้องุ่นไม่มีเมล็ด ในพืชตระกูลซีตรัส กรดจิบเบอเรลลิกใช้เพิ่มขนาดผล การติดผล และปริมาณผลผลิตที่ไม่มีเมล็ด การพ่นกรดจิบเบอเรลลิกก่อนการเก็บเกี่ยวมะนาว (Citrus lemon) ช่วยยืดระยะการสุก ทำให้เก็บผลผลิตไว้ได้นานขึ้น การใช้กรดจิบเบอเรลลิกกับต้นส้ม ทำให้คุณภาพของเปลือกส้มดีขึ้น ลดรอยด่างดำ การโป่งพองและลดความหนาของเปลือก (พีรเดช ทองอำไพ, 2529 ; Rappaport, 1980 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt, 1991 ; Martin, 1983 อ้างถึงใน Bruckner and Blechschmidt)

ประโยชน์ที่สำคัญอีกประการของกรดจิบเบอเรลลิก คือ ใช้เร่งระยะเวลาในกระบวนการผลิตมอลต์จากข้าวบาร์เลย์ ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ (Paleg, 1960) นอกจากประโยชน์หลักๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว กรดจิบเบอเรลลิกยังถูกนำมาใช้ในการเพาะปลูกพืชอีกหลายชนิด ดังตัวอย่างในตารางที่ 1-4 อย่างไรก็ตามการพัฒนาเพื่อนำกรดจิบเบอเรลลิกมาประยุกต์ใช้ในทางเกษตรกรรม ยังเป็นไปด้วยความล่าช้า อุปสรรคสำคัญ ได้แก่ กรดจิบเบอเรลลิกเป็นสารที่มีราคาแพง ต้องใช้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์และมีฤทธิ์ทางชีวภาพแปรไปตามลักษณะของพืชและสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นการศึกษาถึงเวลาและปริมาณที่เหมาะสมในการใช้งานยังมีน้อยมาก การใช้กรดจิบเบอเรลลิกในปริมาณที่มากเกินไป อาจก่อให้เกิดผลเสียได้

นอกจากประโยชน์ทางการเกษตร กรดจิบเบอเรลลิกยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเป็นส่วนผสมในครีม (Parkison, 1985) และแฮร์โทนิค (Ayukawa , 1985)

ตารางที่ 1-4 ประโยชน์ของกรดจิบเบอเรลลิก สำหรับพืชชนิดต่าง ๆ

ชนิดพืช	ประโยชน์จากการใช้กรดจิบเบอเรลลิก
ข้าวโพด	เพิ่มเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์
คื่นไช่	เพิ่มขนาดต้น
เงาะโรงเรียน	สีผลเปลี่ยนอย่างสม่ำเสมอ เปลี่ยนสีเร็วขึ้น
ถั่วฟักยาว	ทำให้ผักยาวอวบ ไม่กลวง
เบญจมาศ	เร่งการออกดอก
ปวยเล้ง	เพิ่มความสูง ทรงพุ่ม น้ำหนักต้น
ฝ้าย	เพิ่มผลผลิต เร่งการเจริญ
ฟักทอง	เพิ่มการติดผล
มันฝรั่ง	เร่งการงอกของราก เร่งระยะพักตัวของหัว
มะม่วงน้ำดอกไม้ทวาย	ยืดช่อดอก เปลี่ยนเพศดอกเป็นเพศผู้
มะละกอ	ทำให้ออกดอกเร็วกว่าปกติ
มะเขือเทศ, มะเขือ	เพิ่มผลผลิต
ยาสูบ	เร่งการเจริญเติบโต เพิ่มผลผลิต
เยอราเนียม	เพิ่มขนาดดอก ช่อยาวขึ้น
ลางสาด, ลองกอง	เพิ่มการติดผล เพิ่มขนาดผล
ส้มเขียวหวาน	เพิ่มการติดผล
อ้อย	เร่งการเจริญเติบโต เพิ่มผลผลิต
ไฮเดรนเยียคอสมอส	เร่งการออกดอก

ที่มาของข้อมูล : วิชาญ ศิริผล (2506)
พีรเดช ทองอำไพ (2529),
ปราโมชน์ ร่วมสุข (2530)

1.9 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

กรดจิบเบอเรลลิก เป็นสารที่มีประโยชน์ต่อการเกษตรเป็นอย่างมาก เป็นฮอร์โมนพืชที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงและหลากหลาย เป็นสารที่มีการใช้งานในภาคเกษตรกรรมทั่วโลก แต่อุปสรรคสำคัญของการนำมาใช้งานและการนำไปพัฒนาให้เกิดประโยชน์ยิ่งขึ้น คือ กรดจิบเบอเรลลิกเป็นสารที่มีราคาแพง เนื่องจากมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมในไม่กี่ประเทศทั่วโลก (Bruckner and Blechschmidt , 1991) โดยเฉพาะประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศเกษตรกรรม ได้รับประโยชน์จากการใช้กรดจิบเบอเรลลิกโดยตรง แต่กลับไม่สามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกขึ้นใช้เองได้ จากการประมาณการของผู้ประกอบการพบว่า การนำเข้ามีมูลค่าปีละประมาณ 10-15 ล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 10-20 ต่อปี (ศักดิ์ดา นำชัยสี่พัฒนา และประเสริฐสุขเกษม, 2533) จึงน่าจะมีการศึกษาแนวทางการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกขึ้น เพื่อนำมาใช้ภายในประเทศ

ทางสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ดำเนินงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกมาอย่างต่อเนื่อง ได้แก่ การคัดเลือกและการปรับปรุงสายพันธุ์ราเพื่อเพิ่มผลผลิต การศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมัก สำหรับขั้นตอนการแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักและการทำให้บริสุทธิ์ เป็นอีกหนึ่งขั้นตอนสำคัญของกระบวนการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก นางสาวสุภาพร พรพรหมกุล (2533) ได้ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักด้วยวิธีสกัดด้วยตัวทำละลาย และสามารถแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักได้สูงถึง 97 % การแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีรายงานว่า ใช้ในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกในระดับอุตสาหกรรม และมีเอกสารสิทธิบัตรเกี่ยวกับการคิดค้นและพัฒนากระบวนการนี้มาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน แต่รายละเอียดสำคัญกลับไม่ได้รับการเปิดเผย เช่นเดียวกับการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งเป็นขั้นตอนสุดท้ายในกระบวนการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ก็ไม่มีการรายงานถึงขั้นตอนที่ชัดเจนเช่นกัน

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักด้วยเรซินแลกเปลี่ยนไอออน และศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกต่อไป

1.10 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมักของเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ด้วยกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน และหาภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากสารละลายที่แยกได้

1.11 ขั้นตอนการวิจัย

1. เตรียมน้ำหมักของกรดจิบเบอเรลลิก โดยการหมักเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* ในถังหมัก 30 ลิตร
2. ศึกษาการสลายตัวของกรดจิบเบอเรลลิกในภาวะต่าง ๆ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดภาวะการแยกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักในขั้นตอนต่อไป
3. หาภาวะที่เหมาะสมในการแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกจากน้ำหมัก โดยใช้กระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน
4. หาภาวะที่เหมาะสมในการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิก
5. ศึกษาสมบัติของกรดจิบเบอเรลลิกที่ตกผลึกได้