เอกสารอ้างอิง

1. Kumar,P.K.R.,and B.K.Lonsane,"Microbial Production of Gibberellins :State of the Art, " Advances in Applied Microbiology , Vol.34,pp.31-37, Academic Press,New York,1989.
2. Barendse, G.W.M., " High Performance Liquid Chromatography of Gibberellins," Principles of Plant Hormone Analysis , (Hedden, P.,Rivier,L. and A,Grozier.,eds.), Vol 1, pp.1-20, Academic Press, London,1987.
3. Gray,M.,and D.Eckrot, "Gibberellins," Plant Growth Substances, (Herman,F.M.,Donald,F.O.,Charles,G.O.,and T.S.Glennnn,eds.), Vol.18, pp.1-11, Mc Graw-Hill Book Co., Massachusetts,1983.
4. พีรเดช ทองอำไพ,ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย, หน้า 93-132, ไดนามิคการพิมพ์, กรุงเทพมหานคร, 2529.
5. Takahashi,N.,Yamaguchi,I.,and H.Yamane, "Gibberellins," Chemistry of Plant Hormones , (Takahashi, N.ed.), pp. 282, CRC Press Inc., Florida,1986.
6. Shechter,I., and C.A.West, " Biosynthesis of Gibberellins: Biosynthesis of Cyclic Diterpenes from trans-Geranyl geranyl Pyrophosphate," J.Biol.Chem, 244, 3200-3209,1969.
7. Birch,A.J., Richards,R.W., Smith, H.,Harris,A., and W.B.Whalley, " Fungal Products. XIV . Metabolic Pathways from ent-Kaurenolic Acid to the Fungal Gibberellins in Mutant B1-41a of Gibberella fujikuroi," J.Chem.Soc.,Perkins Trans.1. 721-726,1975.
8. Bruckner,B., and D.Blechschmidt, " Microbial Biosynthesis of Gibberellins," J.Basic Microbiol. 26,8, 483-497,1986.
9. Mahadevan,A., "Gibberellins in Microorganisms and Infected Plants" Growth regulators, Microorganisms and Diseased Plants, pp.270-275, Oxford and Ibh Publishing Co.,New Dalhi,1984.
10. Yabuta,T., and T.Hayashi, J.Agric. Chem.Soc. ,15,257-266
11. Darken,M.A.,Jensen,A.L., and P.Shu, "Production of Gibberellic Acid by Fermentation," Appl.Microbiol. 7 , 301-303,1959.

12. Borrow,A.,Jefferys,E.G.,andI.S.Nixon, "Process of Producing Gibberellic Acid by Cultivation of Gibberella fujikuroi," U.S.Pat 2,906,671, September 29, 1959.

13. Stodola,F.H., Raper,K.B., Fennell,D.I., Conway,H.F.,Johns,V.E., Langford, C.T., and R.W. Jackson, " The Microbiological Production of Gibberellins A and X, " Arch.Biochem. Biophys. 54, 240-245, 1955.

14. Cross,B.E.,and J.R.Hanson, "A New Gibberellin and Its Derivatives and Process for Its Production," Brit. Pat 914,893, February 9, 1960.

15. Cross,B.E.,Galt,R.H.B.,andJ.R.Hanson, "Fermentation Process for the Production of Gibberellic Acid," Brit.Pat 957,634, January 15, 1962.

16. Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd, "Production of Gibberellin A_4," JP.Pat. 58,152,499, March 5, 1982.

17. Brich,A.J., Nixon,I.S., and J.F.Grove, " Process of Producing Gibberellic Acid," U.S.Pat 2,977,285, Mar 28,1961.

18. Surinder,S.K.,and M.Sangeeta, "Production of Gibberellic Acid by Fungal Mycelium Immobilized in Sodium Alginate," Enz.Microb. Tech. 8, 613-616, 1986.

19. Jones A., and R.P.Pharis, "Production of Gibberellins and Bikaverin by Cells of Gibberella fujikuroi Immobilized in Carageenan," J.Ferment Technol. 65, 717-722, 1987.

20. Kumar,P.K.R. and B.K.Lansane, "Potential of Fed-batch Culture in Solid State Fermentation for Production of Gibberellic Acid," Biotechnology Letters. 9,3,178-182,1987.

21. วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ , " สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา จิบเบอเรลลา ฟูจิคุรอย ซี,"วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.

22. Muromtsev,G.S.,Rakovskii,Y.S.,Dubovaya,L.P.,Taemnikova,t.v.,and A.N. Fedchenko," Sucrose and Fat as Carbon Source for the Biosynthesis of Gibberellins," Prikl.Biokhium: Mikrobiol. 4,398-407, 1968.

23. Borrow,A.,Brown,S., Jefferys,E.G.,Kessell,R.H.J.,Lloyed,E.C., Lloyed,P.B., Rothwell,A., Rothwell,B., and J.C.Swait, " The Kinetic of Metabolism of Gibberella fujikuroi in Stirred Culture," Can.J.Microbiol. 10 ,407-444, 1964.

24. Fuska,J.,Kuhr,I., Podojil,M., and V.Sevcik, "The Influence of the Nitrogen Source on the Production of Gibberellic Acid in Submerse Cultivation of Gibberella fujikuroi., Folia Microbiol. 6, 18-21, 1961.

25. Geiss,T.A., Vesbiscar,A.J.,Phinney,B.O., and G.Cragg, "Studies on the Biosynthesis of Gibberellins from (-)-Kaurenoic Acid in Culture of Gibberella fujikuroi,"Phytochemistry. 5, 933-947, 1966.

26. Borrow,A., Jefferys,E.G., and I.S.Nixon, " Improved Metabolic Processes," Brit. Pat 803,591, October 29, 1958.

27. Murphy,P.J., and C.A.West, Arch.Biochem.Biophys. 133,395-407,1969.

28. Borrow,A., Brown,S., Jefferys,E.G., Kessell,R.H.J., Lloyd,E.C., Lloyd, P.B., Rothwell, A., Rothwell, B., and J.C.Swait, " The Effect of Varied Temperature on the Kinetics of Metabolism of Gibberella fujikuroi in Stirred Culture," Can.J.Microbiol. 10, 445-466, 1964.

29. Weaver,R.J.,"Gibberellins,"Plant Growth Substsnces in Agriculture, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1972.

30. Crozier,A., Kuo,C.C., Durley,R.C., and R.P.Pharis,"The Biological Activities of 26 Gibberellins in Nine Plant Bioassays, " Can.J.of Bot. 48, 867-877, 1970.

31. Kavanagh,F.,and N.R.Kzel.,"Flurometric Determination of Gibberellic Acid and Gibberellenic Acids in Fermentation Products , Commercial Formulations , and Purified Materials , " J.Agric.Food.Chem. 6, 459-463, 1958.

32. Shen,N.,and F.Chang,"Gibberellins Determination by Spectrophotometry Using Molybdenum Blue," Yaoxue Xuebao. 16, 5,397-400,1981.

33. Kumar,P.K.R.,and B.K.Lonsane, "Spectrofluorodensitometric Estimation in Thin-layer Chromatography of Gibberellic Acid Produced by Solid-state Fermentation," J.Chromatogr. 369,222-226,1986.

34. Bernfeld,P.,"Amylase, α and β," Method in Enzymology (Colowick,P.S. and O.N. Kaplan. eds.), Vol.1, pp.149 , Academic Press Inc., Publishers, New York., 1955.

35. Huggett,A., and D.A.Nixon, "Enzymatic Determination of Blood Glucose," J.Biochem. 66, 1, 12, 1957.

36. Lowry,O.H.,Rosenbrough,N.J.,and R.J.Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," J.Biol.Chem. 193, 276-304, 1951.

37. Jensen,E.,Crozier,A.,and A.M.Monteiro,"Analysis of Gibberellins and Gibberellin Conjugates by Ion-Suppression Reversed-phase High -performance Liquid Chromatography," J.Chromatogr. 367, 377-384,1986.

38. Snyder,L.R., and J.J.Kirkland, Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2nd Academic press, Newyork,1979.

39. Balan,J.,Fuska,J., and V.Kuhrova, " Bikaverin, an Antibiotic from Gibberella fujikuroi, Effective against Leishmania brasiliensis , "Folia Microbiol. 15,479-484,1970.

40. Barendse,G.W.M.,and P.H.Werken,"High-performance Liquid Chromatography of Gibberellins"J.Chromatogr.198,449-455,1980.

41. Qiong,C., and J.Deming, " Effect of Vegetable Oils on their Fatty Acids and Trace Mineral Elements on Gibberellin

Fermentation,"Gongye Weishengwn.,17,17,1987.

42. Erokhina,L.I., and E.V.Sokolova,"Biochemical Mutants of Fusarium moniliforme (Sheld.)" Genetika,10,172,1970.

43. Leonidovna,R.L.,"Method of Isolating Gibberellins from Culture Fluid Obtained by Cultivating a Microorganism," U.S.Pat 3,600,402, August 17,1971.

44. Mabelis,R.P., " Plant Growth Regulators," Eur.Pat.112,629, July 4, 1984.

45. Crutcher,R.E., "Gibberellin A_4 Separation," U.S.Pat. 4,156,684, May 29,1979.

46. พิเชษฐ อิฐกอ,"การผลิตแอลฟาอะไมเลสจาก Bacillus amyloliquefaciensn KA 63," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2528.

47. Cornforth,J.W.,"Isolation and Charaterization of a Fungal Vacuolation Factor (Bikaverin)"J.Chem.Soc.C.2786-2788,1971.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารแข็งที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อ โพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ (potato dextrose agar) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง (ต้มให้เดือดแล้วกรองเอาเฉพาะน้ำใส)	300	กรัม
เดกซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารแข็งสำหรับสร้างสปอร์

ใช้อาหารสูตรเดียวกับ 1.1 แต่เพิ่มแร่ธาตุเสริมในอาหาร 1 ลิตร

อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.5	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	0.5	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4\ 5H_2O$)	0.01	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	120	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	4.8	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1	กรัม
แร่ธาตุเสริม A	2	มล.

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

แร่ธาตุเสริม A ใน 100 มล. ประกอบด้วย

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4\ 7H_2O$)	0.1	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4\ 5H_2O$)	0.015	กรัม
ซิงค์ซัลเฟต ($ZnSO_4\ 7H_2O$)	0.161	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4\ 4H_2O$)	0.01	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดท ($(NH_4)_6\ Mo_7O_{24}\ 4H_2O$)	0.01	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 สูตรอาหารเหลวสำหรับศึกษาแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในระบบเขย่าขวด

1.4.1 สูตรอาหารเหลวสำหรับหาชนิดของแร่ธาตุเสริมและชนิดของน้ำมันพืชที่เหมาะสม ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ชนิดของแร่ธาตุเสริม		
ชนิดของน้ำมันพืช		
กลูโคส	70	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้ว (defatted soybean meal) ที่มีปริมาณไนโตรเจน	0.14	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1.00	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับหาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกับข้อ 1.4.1 แต่มีแร่ธาตุเสริมเป็นอลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3) 0.10 กรัมต่อลิตร และน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ

1.4.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในอาหาร 1 ลิตร

แหล่งคาร์บอน	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้ว (defatted soybean meal) ที่มีปริมาณไนโตรเจน	0.14	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1.00	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ (ปริมาตรต่อปริมาตร)	0.2	

ปรับพีเอชเป็น 7 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4.4 สูตรอาหารเหลวสำหรับหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	50	กรัม
ซูโครส	50	กรัม
แหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณไนโตรเจน	0.54	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1.00	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ (ปริมาตรต่อปริมาตร)	0.2	

ปรับพีเอชเป็น 7 ก่อนอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สูตรอาหารเหลวสำหรับศึกษาแหล่งอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.5.1 สูตรอาหารเหลวสำหรับหาอัตราการกวนที่เหมาะสม เมื่อใช้อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง	30	กรัม
กลูโคส	70	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้ว (defatted soybean meal) ที่มีปริมาณไนโตรเจน	0.14	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1.00	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง ร้อยละ (ปริมาตรต่อปริมาตร)	0.2	

1.5.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับหาชนิดของแหล่งคาร์บอน และอัตราการกวนที่เหมาะสม เมื่อใช้อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้ว (defatted soybean meal) ที่มีปริมาณไนโตรเจน	0.14	กรัม

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1.00	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง ร้อยละ (ปริมาตรต่อปริมาตร)	0.2	

1.5.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักในปริมาณที่เหมาะสม เมื่อใช้อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ซูโครส	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้ว (defatted soybean meal)		
ที่มีปริมาณไนโตรเจน	0.14	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1.00	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง ร้อยละ (ปริมาตรต่อปริมาตร)	0.2	

1.5.4 สูตรอาหารเหลวสำหรับศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ GA_3 ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	25	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้ว (defatted soybean meal)		
ที่มีปริมาณไนโตรเจน	0.14	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$)	1.00	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.10	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง ร้อยละ (ปริมาตรต่อปริมาตร)	0.2	

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2.1 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid)

ละลาย 1 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ 20 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มล. เติมโปแตสเซียมทาเตรต 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2.2 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

นำพีจีโอเอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วย มาละลายในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 60 มล. เติมสารละลายของโอไดอะนิซิดีน (o-dianisidine) ร้อยละ 1 ในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 0.5 มล. ทำให้เป็น 100 มล. ด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7

2.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (สารอินทรีย์)

สารละลาย A ประกอบด้วย เมอร์คิวริกไอโอไดด์ (HgI_2)	100	กรัม
โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI)	70	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	50	มล.
สารละลาย B ประกอบด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	170	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	150	มล.

ค่อยๆเทสารละลาย A ลงในสารละลาย B พร้อมกับคนให้เข้ากัน และทำให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (สารอินทรีย์)

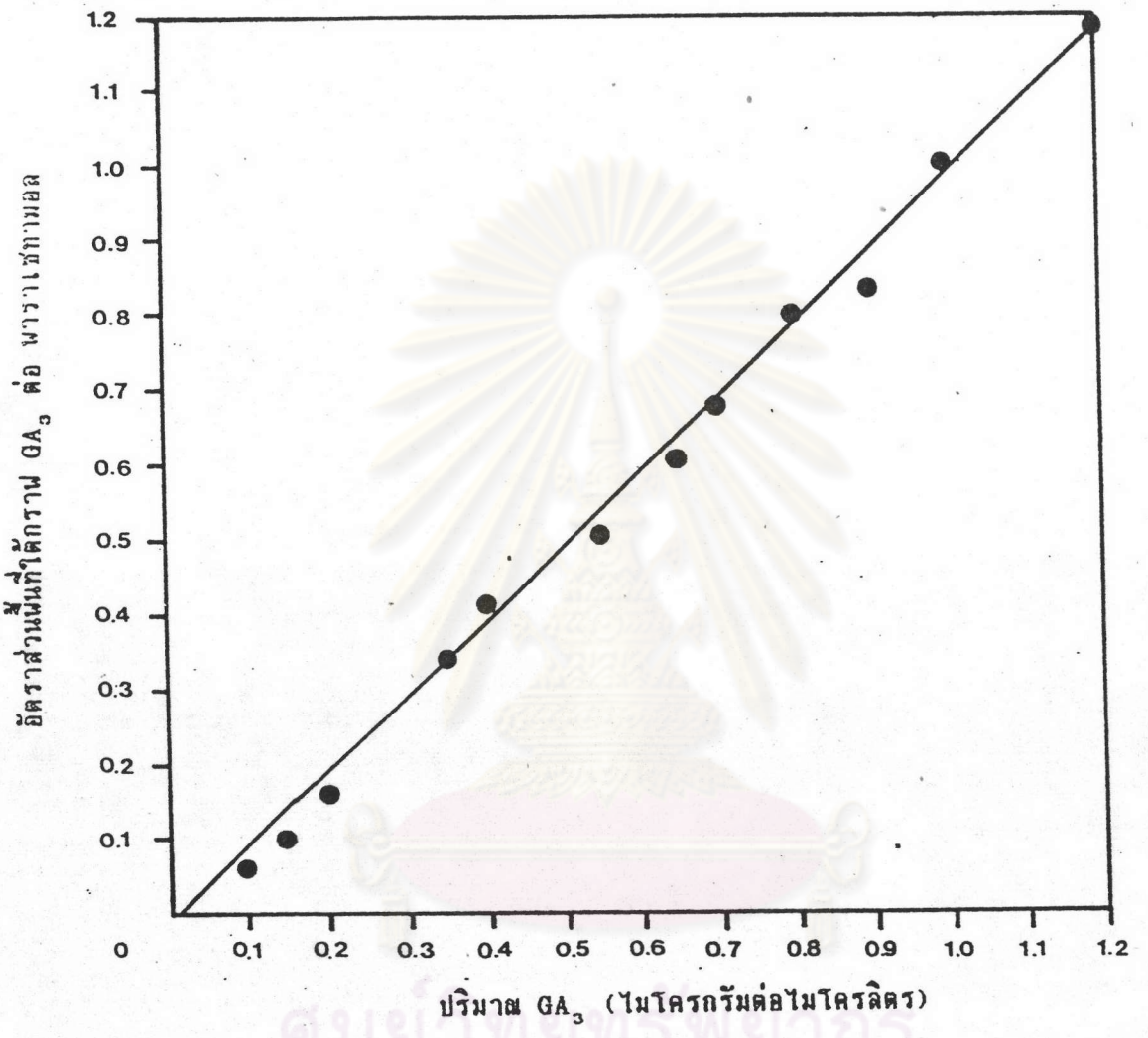
สารละลาย Lowry A ประกอบด้วย		
โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	12	กรัม
โซเดียมโปตัสเซียมตาเตรต ($C_4H_4KNaO_6\ 4H_2O$)	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3000	มล.
สารละลาย Lowry B ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4\ H_2O$)	5	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1000	มล.
สารละลาย Lowry C ประกอบด้วย		
สารละลาย Lowry A	50	มล.
สารละลาย Lowry B	1	มล.

2.5 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในเอสเซนดิงเปเปอร์โครมาโตกราฟี

2.5.1 สารละลายซิลเวอร์ไนเตรทในอะซีโตน เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทอิ่มตัว 1 มล.ลงในน้ำกลั่น 6 มล. เติมอะซิโตนปริมาตร 200 มล.

2.5.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 มล. ผสมกับเมทานอลปริมาตร 500 มล.

. 3. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณจิบเบอเรลลิน โดยวิธี HPLC

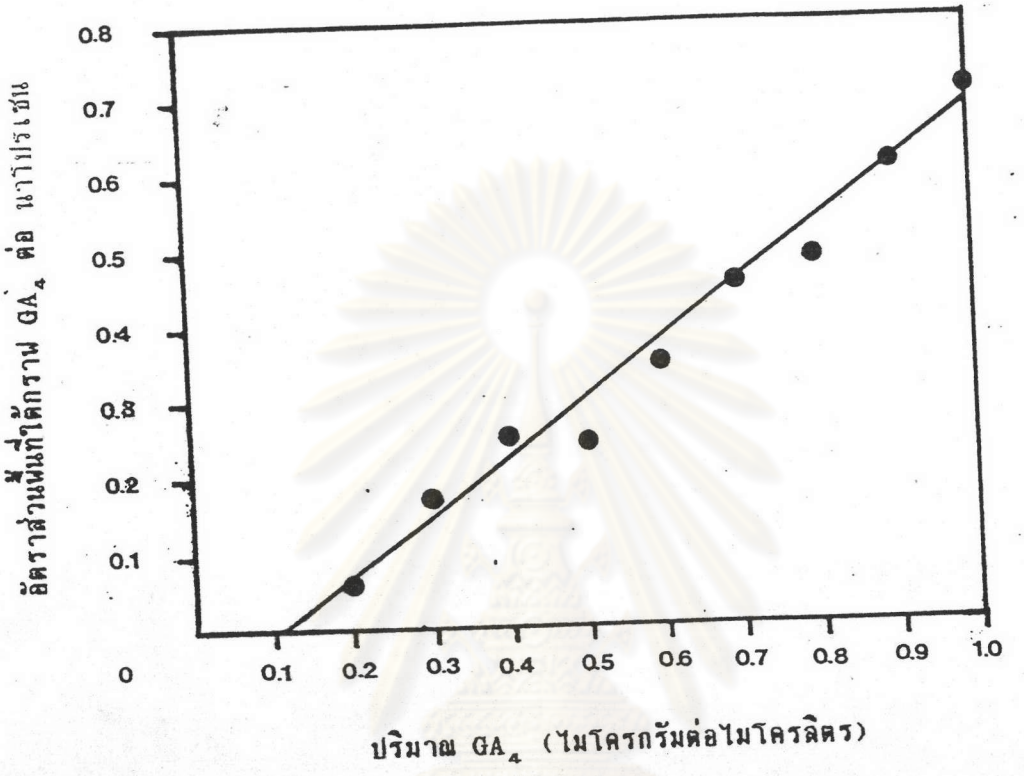


รูปที่ 40 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPLC ในน้ำหมักที่ผ่านการสกัดแล้ว

จากรูปที่ 40 ได้สมการเป็น $Y=2.06X-0.07$ ด้วยวิธีกำลังสองน้อยสุด และมีค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เป็น 0.994

โดย มีค่า Y คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ GA_3 ต่อ พาราเซทามอล

และค่า X คือ ปริมาณ GA_3 (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

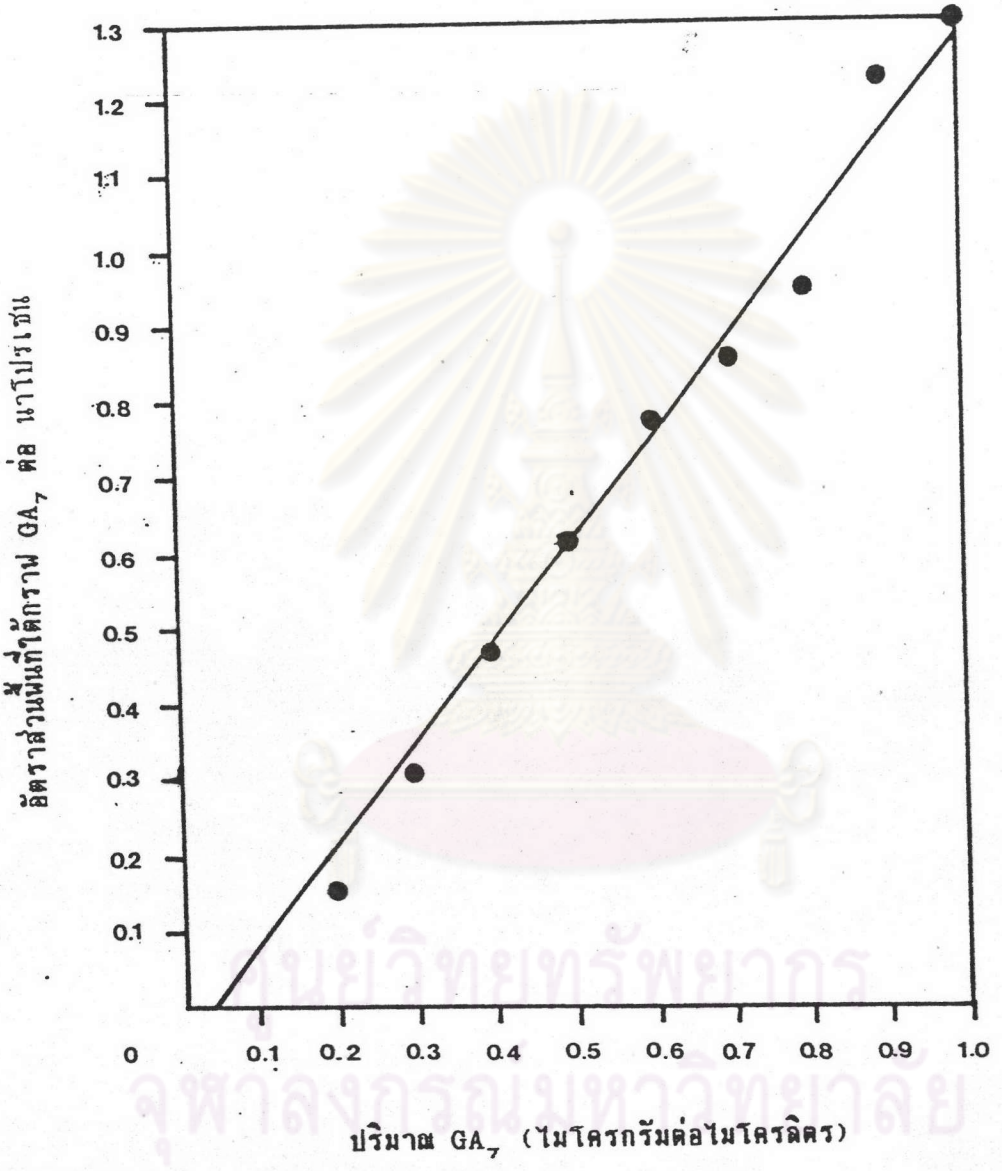


รูปที่ 41 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ GA_4 โดยวิธี HPLC ในน้ำหมักที่ผ่านการสกัดแล้ว

จากรูปที่ 41 ได้สมการเป็น $Y=0.78X-0.09$ ด้วยวิธีกำลังสองน้อยสุด และมีค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เป็น 0.986

โดย มีค่า Y คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ GA_4 ต่อ นาโปรเซน

และค่า X คือ ปริมาณ GA_4 (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)



รูปที่ 42 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ GA_7 โดยวิธี HPLC ในน้ำหมักที่ผ่านการสกัดแล้ว

จากรูปที่ 42 ได้สมการเป็น $Y=2.38X-0.09$ ด้วยวิธีกำลังสองน้อยสุด และมีค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เป็น 0.993

โดย มีค่า Y คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ GA_7 ต่อ นาโปรเซน

และค่า X คือ ปริมาณ GA_7 (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

4.1 การวิเคราะห์อิทธิพลของชนิดแร่ธาตุเสริมและชนิดของน้ำมันพืชต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เมื่อวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์

ตารางที่ 17 ปริมาณ GA_3 ที่เชื้อรา Gibberella fujikuroi C ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแร่ธาตุเสริมและชนิดของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของน้ำมันพืช	ชนิดของแร่ธาตุเสริม			
	Al_2O_3	$Al_2O_3+ZnCl_2+CuSO_4$	รวม	เฉลี่ย
ตัวควบคุม	353	359	712	356
น้ำมันรำข้าว	392	387	779	390
น้ำมันถั่วลิสง	381	370	751	376
น้ำมันมะกอก	351	377	728	364
น้ำมันปาล์ม	371	380	751	376
น้ำมันลินซีด	336	361	697	349
น้ำมันถั่วเหลือง	401	400	801	401
รวม	2585	2644	5219	
เฉลี่ย	370	377		

Correction Term $= \left(\sum_{ij} X_{ij}^2\right)^2 / N$

$= (5239.0)^2/7x2$

$= 1,960,508.6$

N = จำนวนค่าทั้งหมดที่วัดได้

SS. Total $= \sum_{ij} X_{ij}^2 - C.T.$

$= 353^2 + 359^2 + \ldots + 401^2 + 800^2 - 1,960,508.6$

SS.Block $= \sum_{ij}(X_{ij}^2/t) - C.T.$

$= (712^2 + 779^2 + \ldots + 697^2 + 801^2)/2 - 1,960,508.6$

$= 3,348.19$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SS.Treatments = $\Sigma(X_{ij}^2/r) - C.T$

= $(2,585^2 + 2,644^2 + 5,219^2)/7 - 1,960,508.6$

= 174.31

ตารางที่ 18 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลจากตารางที่ 17

แหล่งความแปรปรวน	การทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์				
	df	SS	MS	F_{cal}	F_{table}
Treatment	2	174.31	87.15	1.37	3.88
Block	6	3348.19	558.03	8.76 **	3.00
Error	12	763.96	63.66		

หมายเหตุ ** หมายถึง มีความแปรปรวนในระหว่างปัจจัยที่ทดสอบ

$S_x = \sqrt{MS_E / r}$

$= \sqrt{63.33/2}$

= 5.64

คำนวณค่า Least Significant Ranges (LSR) สำหรับการเปรียบเทียบค่าต่างๆ โดยอาศัยตาราง Significant Studentized Ranges (SSR) ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 ค่าที่ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของ GA_3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแร่ธาตุเสริมและชนิดของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

P	2	3	4	5	6
SSR	3.08	3.23	3.33	3.36	3.40
LSR	17.37	18.21	18.78	18.95	19.17

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละปัจจัยจากตารางที่ 14 โดยวิธี Duncan

ลำดับค่าเฉลี่ย	1	2	3	4	5	6	7
X	401	390	376	376	356	354	349

ค่าเฉลี่ยซึ่งอยู่ในเส้นตรงเดียวกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2 การวิเคราะห์อิทธิพลของปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibbereiia fujikuroi C เมื่อวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์

ตารางที่ 21 ปริมาณ GA_3 ที่เชื้อรา Gibberella fujikuroi C ผลิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ

ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง

(ร้อยละ)	0	0.1	0.2	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1
ปริมาณ GA_3	362	401	412	398	400	395	373	362

ตารางที่ 22 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลจากตารางที่ 21

แหล่งความแปรปรวน	ANOVA ของการใช้ Duncan's New Multiple Range Test		
	df	SS	MS
Treatment	7	3517	502
Error	8	340	42

$$S_x = \sqrt{MS_E / r}$$

$$= \sqrt{42.57/ 2}$$

$$= 4.613$$

ตารางที่ 23 ค่าที่ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของ GA_3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณต่างๆ

P	2	3	4	5	6	7	8
SSR	3.26	3.39	3.47	3.52	3.55	3.56	3.56
LSR	15.03	15.62	15.99	16.23	16.36	16.41	16.42

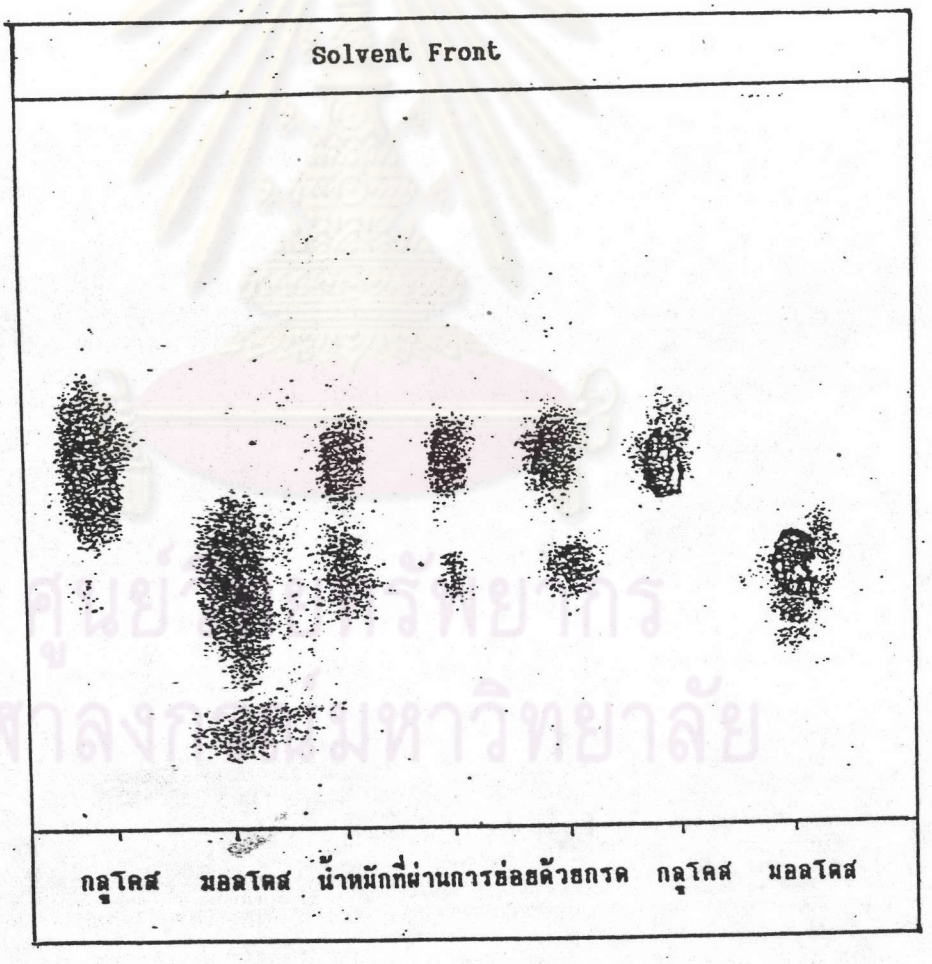
ตารางที่ 24 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละปัจจัยจากตารางที่ 21 โดยวิธี Duncan

ลำดับค่าเฉลี่ย	1	2	3	4	5	6	7	8
X	412	401	400	398	395	373	362	362

ค่าเฉลี่ยที่อยู่ในเส้นตรงเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5. การตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการย่อยน้ำหมักด้วยกรด

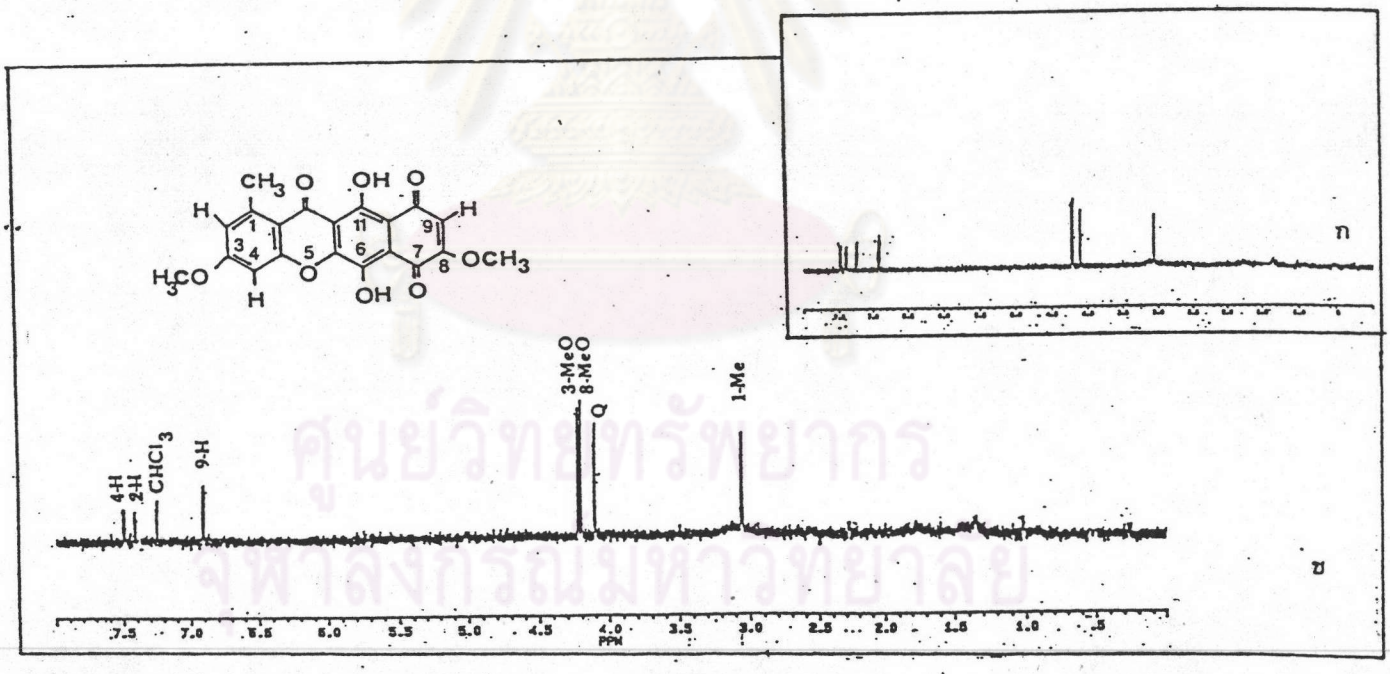
นำน้ำหมักที่ได้จากการย่อยด้วยกรดไปจุด (spot) ลงบนกระดาษโครมาโตแกรมวอทแมน เบอร์ 3 (whatman paper chromatogram no.3) ขนาด 15x20 เซนติเมตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เป่าให้แห้ง ใช้น้ำตาลกลูโคส และมอลโตส เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรเป็นสารมาตรฐาน นำแผ่นโครมาโตแกรมใส่ลงในถังแก้วที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย ซึ่งประกอบด้วยโพรพานอล (propan-1-ol)และน้ำในอัตราส่วน 7 ต่อ 3 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 20 เซนติเมตร นำออกมาทำให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 50 °ซ นำไปจุ่มในถาดที่มีสารละลายที่มีซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) ในอะซิโตน (ภาคผนวก 2.5) ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำไปจุ่มในถาดซึ่งมีสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล (ภาคผนวก 2.5) จนกระทั่งเกิดจุดสีดำ (black spot) ขึ้น นำไปล้างด้วยน้ำแล้วจุ่มลงในถาดที่มีสารละลายโซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) เข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนกระทั่งสีของกระดาษส่วนอื่นๆที่ไม่ใช่จุดสีดำจางหายไป (46)



รูปที่ 43 เปเปอร์โครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยน้ำหมักด้วยกรดไฮโดรคลอริกเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคส และมอลโตส โดยใช้ตัวทำละลายที่ประกอบด้วยสัดส่วนของโนรมานอลต่อน้ำ เป็น 7 ต่อ 3

6. การวิเคราะห์ชนิดของสารที่ทำให้เกิดสีแดงในน้ำหมัก

นำน้ำหมักมาปรับความเป็นกรดให้มีพีเอชเป็น 3 ด้วยกรดอะซิติก และสกัดแยกด้วยเอทธิลอะซิเตต ด้วยเครื่องเขย่าสำหรับแยกสาร จากนั้นนำชั้นของเอทธิลอะซิเตตมาระเหยเอาเอทธิลอะซิเตตออกจนแห้ง โดยใช้เครื่องระเหยภายใต้สูญญากาศแบบหมุน อุณหภูมิ 30-40 °ซ นำมาละลายด้วยเอทธิลอะซิเตต และบรรจุสารละลายนี้ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยซิลิกาเจล ผ่านด้วยระบบตัวทำละลายที่เป็นคลอโรฟอร์มต่อเมทานอลต่อกรดอะซิติก ในสัดส่วน 100 ต่อ 1 ต่อ 1 (47) อย่างต่อเนื่อง เก็บสารที่ผ่านคอลัมน์ลงในหลอดทดลองปริมาตรละ 10 มล.ต่อหลอด ตรวจหาสารสีแดงในหลอดทดลองที่เก็บด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบผิวบางตามข้อ 7 นำหลอดทดลองที่พบสารสีแดงมารวมกันแล้วระเหยเอาตัวทำละลายออกและละลายในคลอโรฟอร์ม ซึ่งจะถูกสกัดด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก(trifluoroacetic acid,TFA) นำชั้นของกรดไตรฟลูออโรอะซิติกไปตรวจวัดด้วยโปตรอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์ โดยมีไตรคลอโรมีเทน (trichromethane)เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน ดังแสดงในรูปที่ 44 และตารางที่ 25



รูปที่44 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ของไบคาเวอริน

ก. สารละลายไบคาเวอรินมาตรฐาน

ข. สารละลายไบคาเวอรินที่ผลิตโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

หมายเหตุ พีก Q เป็นพีกของสารเจือปนที่มีในสารละลายที่ใช้

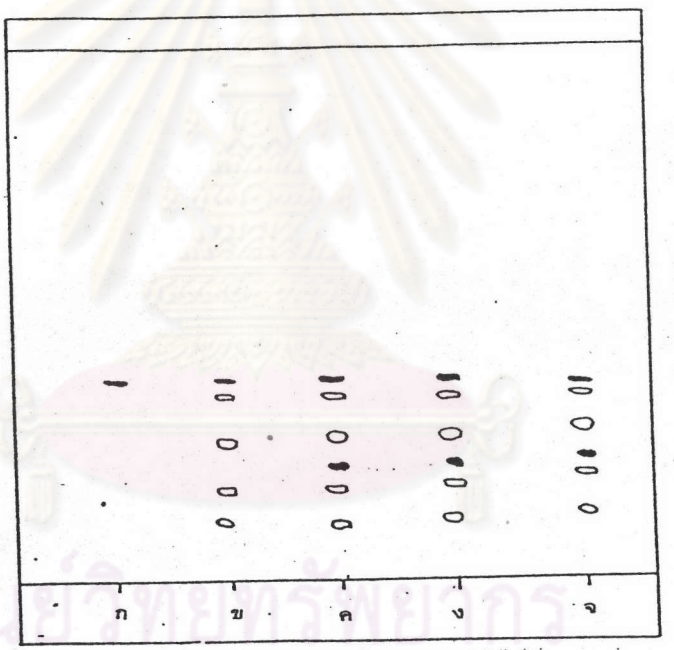
ตารางที่ 25 เคมิคัลชิฟท์(Chemical shift) ของสารไบคาเวอริน โดยวิธีโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์

เคมิคัลชิฟท์ (พีพีเอ็ม)	ตำแหน่งของโปรตอน
7.5	4-CH
7.4	2-CH
6.9	9-CH
4.2	3-MeO
4.15	8-MeO
3.0	1-Me

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. การวิเคราะห์ปริมาณไบคาเวอริน

นำแผ่นอลูมิเนียมเคลือบด้วยซิลิกาเจล (Thin Layer Chromatography Plate) ความหนา 0.25 มิลลิเมตร ขนาด 20x20 เซนติเมตร มาลากเส้นที่บริเวณห่างจากขอบด้านล่างและด้านบนด้านละ 1 เซนติเมตร หยด(spot)สารละลายมาตรฐานไบคาเวอริน และน้ำหมักที่ผ่านการสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต (น้ำหมักต่อเอทธิลอะซิเตตเป็น 2 ต่อ 5 มล.ตามลำดับ) โดยแต่ละจุดห่างกัน 1 เซนติเมตร นำแผ่นอลูมิเนียมเคลือบด้วยซิลิกาเจลใส่ในถังแก้วที่อิ่มตัวด้วยระบบสารละลายที่มีสัดส่วนระหว่างคลอโรฟอร์มต่อกรดอะซิติกเป็น 100 ต่อ 2 มล.ตามลำดับ เมื่อตัวทำละลายในระบบเคลื่อนที่ถึงเส้นด้านบน นำออกมาทำให้แห้ง สังเกตโครมาโตแกรมที่ได้ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 2536 อังสตรอม แล้วจึงพ่นโครมาโตแกรมด้วยสารละลายโปตัสเซียมเปอร์แมงกาเนตร้อยละ 1 ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °ซ นาน 10 นาที วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของจุดต่างๆที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นโครมาโตแกรม และสังเกตสีที่ปรากฏด้วย



รูปที่ 45 เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 4 และ 5 ตลอดการเพาะเลี้ยง และสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง กับสารละลายมาตรฐานของไบคาเวอริน

โดยที่ ก. สารละลายมาตรฐานไบคาเวอริน

ข. ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง

ค. ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3

ง. ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4

จ. ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติ

นางสาว อรไท สุขเจริญ เกิดวันที่ 2 กุมภาพันธ์ พ.ศ 2508 ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหารและเทคโนโลยีทางชีวภาพ จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์ ในปีการศึกษา 2529

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย