บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 ด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC)

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 ในน้ำหมักโดยวิธีต่างๆ (กาซโครมาโตกราฟฟี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี และไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี) ที่ศึกษาโดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21) พบว่าวิธี HPLC เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้วิธี HPLC สำหรับวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยปรับปรุงจากวิธีของวันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ เพื่อให้การวิเคราะห์มีความถูกต้องยิ่งขึ้น โดยสภาวะที่สำคัญในการวิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 ที่ใช้ศึกษา คือ ชนิดของสารที่อยู่ในคอลัมน์ สัดส่วนของสารละลายตัวพา และลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของสารละลายตัวพาขณะวิเคราะห์ที่เหมาะสมเพื่อแยก GA_3 GA_4 และ GA_7 แต่ละชนิดออกจากจิบเบอเรลลินชนิดอื่น และสารอื่นที่เชื้อรา Gibberella fujikuroi C สามารถสร้างได้ กับการหาชนิดของสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่เหมาะสม

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 ด้วยเครื่อง HPLC ประกอบด้วยชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ศึกษา คือ คอลัมน์ C_8 (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 250 มม.) และ คอลัมน์ C_{18} (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 250 มม.) สารละลายตัวพา (mobile phase) ที่ใช้ศึกษา คือ เมทานอล กับ สารละลายกรดฟอสฟอริก พีเอช 3 อัตราส่วน 60 ต่อ 40 55 ต่อ 45 50 ต่อ 50 40 ต่อ 60 35 ต่อ 65 และ 30 ต่อ 70 ตามลำดับ โดยมีอัตราการไหลของสารละลายตัวพาเป็น 1 มล.ต่อนาที ตรวจวัดชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินภายหลังที่แยกผ่านคอลัมน์ ด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตราไวโอเลท (ultraviolet detector) ที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร (37) และใช้ความไวของเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 0.08 AUFS (absorbance unit full scale) ปริมาตรที่ใช้วิเคราะห์ คือ 10 ไมโครลิตร

การเลือกชนิดของคอลัมน์ อัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริก และลักษณะการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของสารละลายตัวพาขณะวิเคราะห์ โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 นั้น ต้องเป็นสภาวะที่สามารถแยก GA_3 GA_4 และ GA_7 ออกจากจิบเบอเรลลินชนิดอื่น หรือสารอื่นที่เชื้อรา Gibberella fujikuroi C ผลิตขึ้น ซึ่งพิจารณาได้จากค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน (resolution) รูปร่างของพีกมีลักษณะสมมาตร และเวลาที่เหมาะสมของสารที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time)

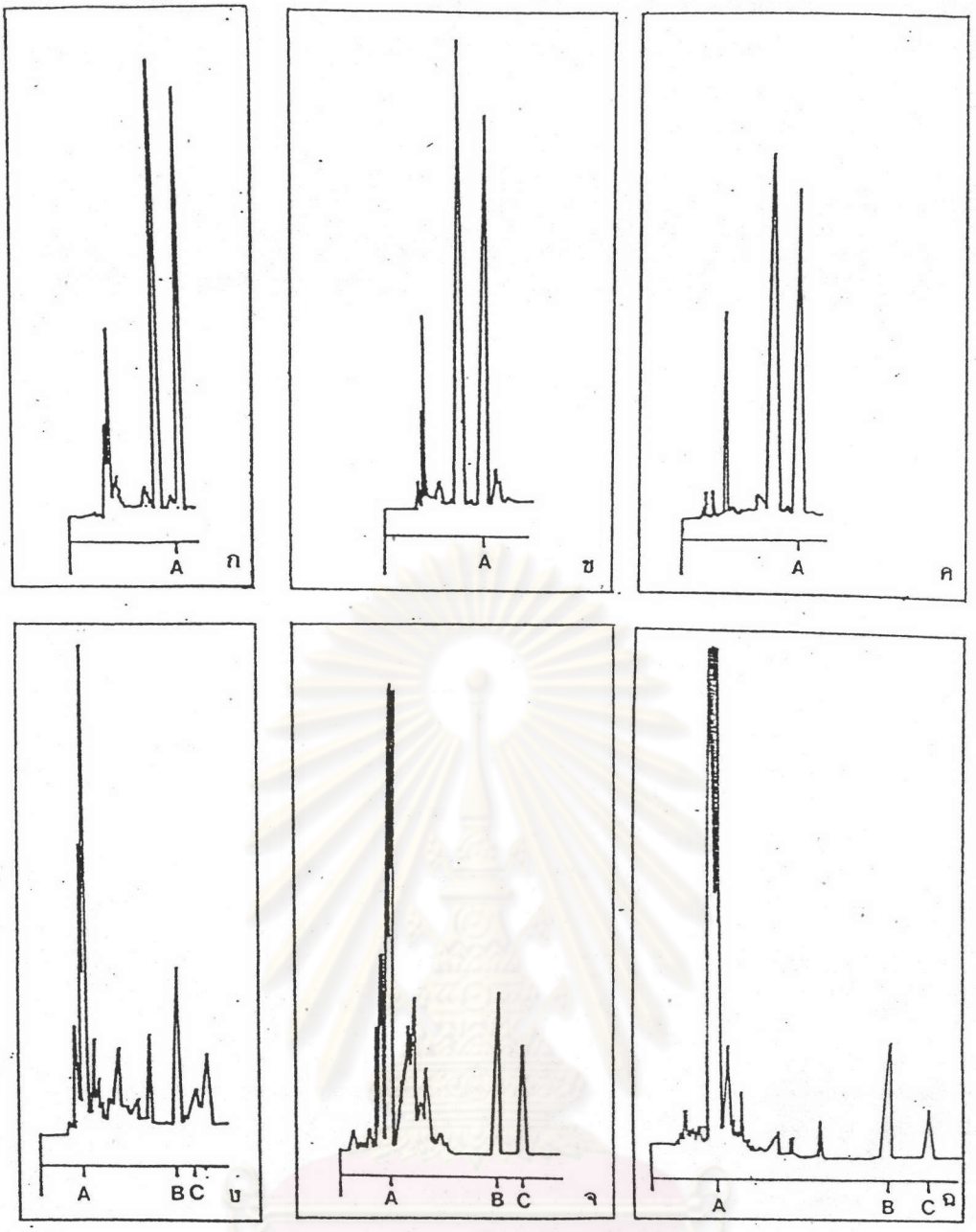
ผลการทดลองดังรูปที่ 8 และตารางที่ 2 พบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ C_8 ในการวิเคราะห์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GA_3 ที่มีในน้ำหมัก ด้วยสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65 และ 30 ต่อ 70 นั้นเป็นระบบสารละลายตัวพาที่สามารถแยก GA_3 ออกจากสารเจือปนอื่นที่อยู่ใกล้เคียงได้อย่างสมบูรณ์ เพราะให้ค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันได้มากกว่า 1.5 (38) โดยที่อัตราส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ GA_3 มากที่สุด เพราะใช้เวลาในการวิเคราะห์ได้เร็วกว่า ในขณะที่การวิเคราะห์ GA_4 กับ GA_7 ที่มีในน้ำหมักนั้น ใช้สารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 55 ต่อ 45 และ 50 ต่อ 50 เป็นระบบสารละลายตัวพาที่สามารถแยก GA_4 กับ GA_7 ออกจากสารเจือปนอื่นที่อยู่ใกล้เคียงได้อย่างสมบูรณ์ เพราะให้ค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันได้มากกว่า 1.5 โดยที่อัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 55 ต่อ 45 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ GA_4 กับ GA_7 มากที่สุด เพราะใช้เวลาในการวิเคราะห์ได้เร็วกว่า

ส่วนผลการใช้คอลัมน์ C_{18} สำหรับการวิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 ที่มีในน้ำหมัก ดังแสดงในรูปที่ 9 และตารางที่ 2 นั้น พบว่าอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 60 ต่อ 40 55 ต่อ 45 50 ต่อ 50 40 ต่อ 60 35 ต่อ 65 และ 30 ต่อ 70 เป็นระบบสารละลายตัวพาที่ยังไม่สามารถแยก GA_3 ออกจากสารเจือปนอื่นที่อยู่ใกล้เคียงได้อย่างสมบูรณ์ในเวลา 20 นาที เพราะระบบสารละลายดังกล่าว ให้ค่าความสามารถในการแยกของ GA_3 กับผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันน้อยกว่า 1.5 ดังนั้นถ้าต้องการใช้คอลัมน์ C_{18} ในการวิเคราะห์ GA_3 จึงต้องเพิ่มอัตราส่วนของสารละลายกรดฟอสฟอริกในระบบสารละลายตัวพาให้มากกว่าร้อยละ 70 ซึ่งการใช้ระบบสารละลายดังกล่าว ทำให้ใช้เวลาสำหรับการวิเคราะห์นานยิ่งขึ้น ส่วนการวิเคราะห์ GA_4 กับ GA_7 นั้น พบว่าอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริก เป็น 50 ต่อ 50 สามารถแยก GA_4 กับ GA_7 ออกจากสารเจือปนอื่นที่อยู่ใกล้เคียงได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้คอลัมน์ C_8 พบว่าการวิเคราะห์ GA_4 กับ GA_7 โดยใช้คอลัมน์ C_8 สามารถใช้เวลาในการวิเคราะห์ได้เร็วกว่า

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7ในการศึกษาต่อไป คือ สภาวะที่ประกอบด้วยคอลัมน์ C_8 และสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65 คงที่ตลอดการวิเคราะห์ GA_3(isocratic system) ส่วน GA_4 กับ GA_7 ใช้ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 55 ต่อ 45 คงที่ตลอดการวิเคราะห์ เพราะให้ค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันได้มากกว่า 1.5 โดยใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้นที่สุด



รูปที่ 8 ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ในน้ำหมักที่ได้จากการสกัดเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC กับคอลัมน์ C_8 โดยใช้สารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกต่างๆกัน

ก. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 40 ต่อ 60

ข. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65

ค. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 30 ต่อ 70

ง. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 60 ต่อ 40

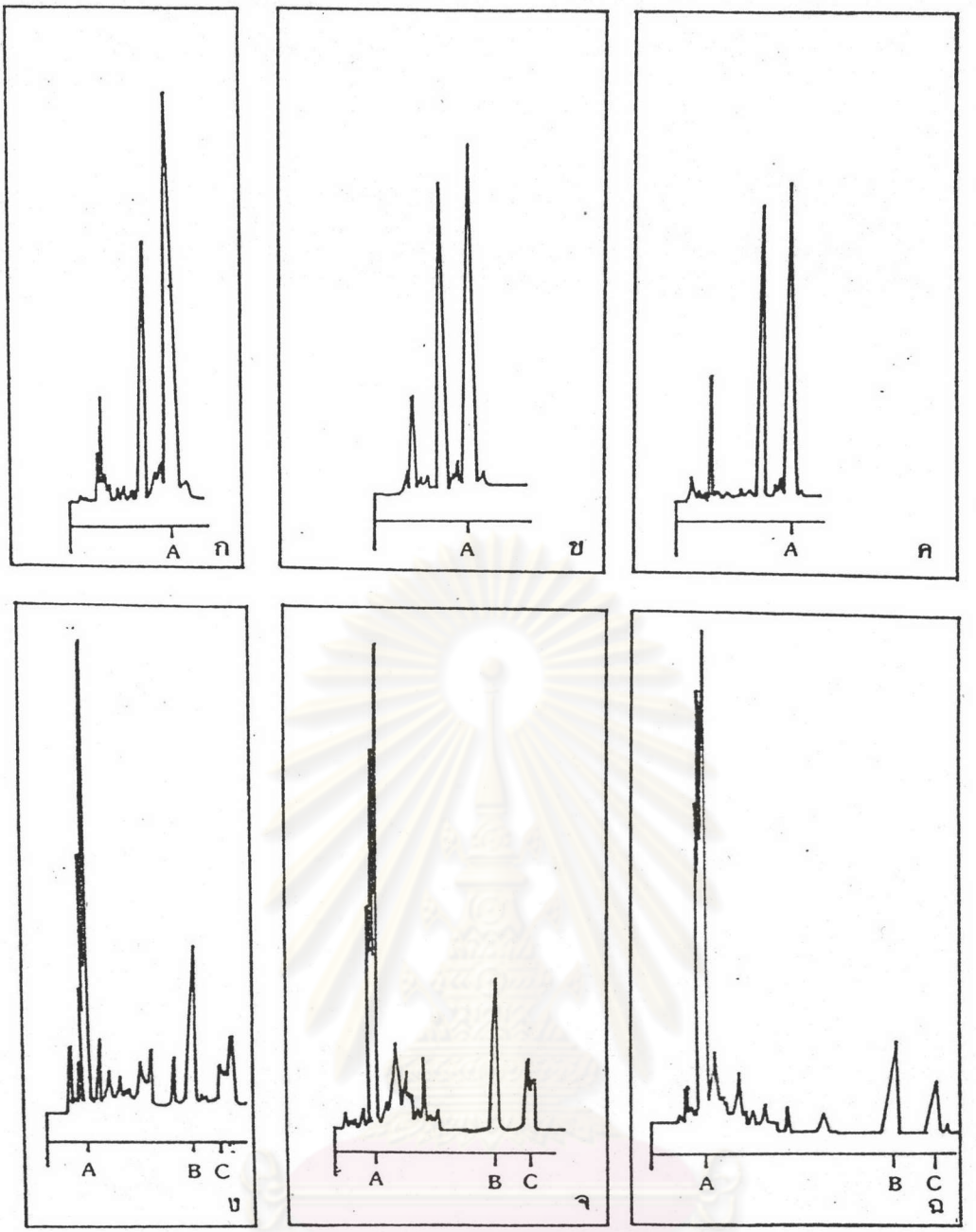
จ. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 55 ต่อ 45

ฉ. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 50 ต่อ 50

โดยที่พีก A คือ GA_3

พีก B คือ GA_7

พีก C คือ GA_4



รูปที่ 9 ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ในน้ำหมักที่ได้จากการสกัดเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC กับคอลัมน์ C_{18} โดยใช้สารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกต่างๆกัน

ก. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 40 ต่อ 60

ข. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65

ค. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 30 ต่อ 70

ง. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 60 ต่อ 40

จ. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 55 ต่อ 45

ฉ. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 50 ต่อ 50

โดยที่พีก A คือ GA_3

พีก B คือ GA_7

พีก C คือ GA_4

ตารางที่ 2 เวลาที่ GA_3 GA_4 และ GA_7 อยู่ในคอลัมน์ (retention time) และค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน (resolution) ในการตรวจวัดโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (HPLC)

ชนิดของคอลัมน์	อัตราส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก (ปริมาตรต่อปริมาตร)	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (นาที)			ความสามารถในการแยกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน	
		GA_3	GA_7	GA_4	GA_3	GA_7 กับ GA_4
คอลัมน์ C_8	30 ต่อ 70	8.143	>30	>30	1.935	-*
	35 ต่อ 65	7.868	>30	>30	1.779	-*
	40 ต่อ 60	6.915	>30	>30	0.500	-*
	50 ต่อ 50	3.998	13.585	14.815	<0.500	1.911
	55 ต่อ 45	3.590	11.537	13.555	<0.500	1.793
	60 ต่อ 40	3.015	11.327	12.047	<0.500	1.168
คอลัมน์ C_{18}	30 ต่อ 70	7.984	>30	>30	1.423	-*
	35 ต่อ 65	6.832	>30	>30	0.769	-*
	40 ต่อ 55	5.341	>30	>30	0.492	-*
	50 ต่อ 50	3.782	14.832	16.041	<0.500	1.322
	55 ต่อ 45	3.543	13.326	14.592	<0.500	1.174
	60 ต่อ 40	3.018	12.876	13.256	<0.500	0.967

หมายเหตุ ความสามารถในการแยกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน (resolution) = $2(V_2-V_1)/(W_2+W_1)$

W_1 และ V_1 เป็นความกว้างของพีกและปริมาตรของสารละลายตัวพาที่ใช้พา GA_3 GA_7 และ GA_4 ออกจากคอลัมน์

W_2 และ V_2 เป็นความกว้างของพีกและปริมาตรของสารละลายตัวพาที่ใช้พาผลิตภัณฑ์อื่นที่อยู่ใกล้กับ GA_3 GA_7 และ GA_4 มากที่สุดออกจากคอลัมน์

-* หมายถึงไม่สามารถคำนวณค่าความสามารถในการแยกผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กันได้ เนื่องจากเวลาของสารที่อยู่ในคอลัมน์นานเกิน 30 นาที

3.2 การศึกษาชนิดและปริมาณของสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 ด้วยวิธี HPLC

นำสารที่จะใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 มาละลายในเมทานอล ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นฉีดสารละลายดังกล่าว 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สารละลายตัวพาที่ประกอบด้วยสัดส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65 และ 55 ต่อ 45 สำหรับการหาสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในของ GA_3 และ GA_4 กับ GA_7 ตามลำดับ เลือกสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่ใช้เวลาอยู่ในคอลัมน์ที่เหมาะสม เติมสารที่ได้ดังกล่าวในน้ำหมัก 2 มล. ในปริมาตร 0.15 มล.เปรียบเทียบกับน้ำหมักที่ไม่ได้เติมสารดังกล่าว และสกัดด้วยวิธีตามข้อ 2.3.10 จากนั้นฉีดสารละลายตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC ศึกษาลักษณะโครมาโตแกรมที่ได้ เลือกสารที่ให้พีกที่ไม่ซ้อนทับกับพีกของสารชนิดอื่นที่มีในน้ำหมัก โดยพิจารณาจากค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์ที่อยู่ใกล้กัน

เมื่อวิเคราะห์สารต่างๆ ตามที่ปรากฏในตารางที่ 3 เพื่อใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 พบว่ามีสารที่ปรากฏพีกภายในเวลา 20 นาที ซึ่งเป็นเวลาสูงสุดที่ตั้งไว้สำหรับใช้วิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 เพราะเวลาที่ใช้สำหรับวิเคราะห์จิบเบอเรลลินที่ต้องการ ใช้เวลาประมาณ 13 นาที จากผลการทดลอง พบว่าโครมาโตแกรมของพาราเซทามอล (paracetamal) และ นาโปรเซน (naproxen) นั้นให้พีกของสารเพียงพีกเดียว และให้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ที่เหมาะสมคือมีค่าเท่ากับ 4.35 และ 13.49 นาที ตามลำดับ เมื่อใช้ระบบสารละลายตัวพาที่ประกอบด้วยสัดส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริก เป็น 35 ต่อ 65 และ 55 ต่อ 45 ตามลำดับ โดยที่โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในทั้งสอง ต่างให้พีกที่ไม่ซ้อนทับกับผลิตภัณฑ์อื่นที่เชื้อรา Gibberella fujikuroi C ผลิตขึ้น และให้ค่าความสามารถในการแยกของผลิตภัณฑ์อื่นที่อยู่ใกล้กับสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในมากกว่า 1.5 ในขณะที่สารอื่นที่ปรากฏโครมาโตแกรมภายใน 20 นาที ก็อาจใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในได้ ถ้าสารเหล่านั้นมีความบริสุทธิ์ หรือไม่มีสารเจือปนอื่นที่ให้พีกซ้อนทับกับพีกของ GA_3 GA_4 และ GA_7 และเมื่อเปรียบเทียบค่าพื้นที่ใต้พีกของพาราเซทามอล และนาโปรเซน ทั้งที่สกัดเดี่ยวกับเมื่อสกัดร่วมกับน้ำหมัก พบว่าค่าพื้นที่ใต้พีก และลักษณะโครมาโตแกรมของสารทั้งสองไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงได้ว่าสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในทั้งสองที่เติมในน้ำหมักนั้นไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่มีในน้ำหมัก ดังแสดงในรูปที่ 10

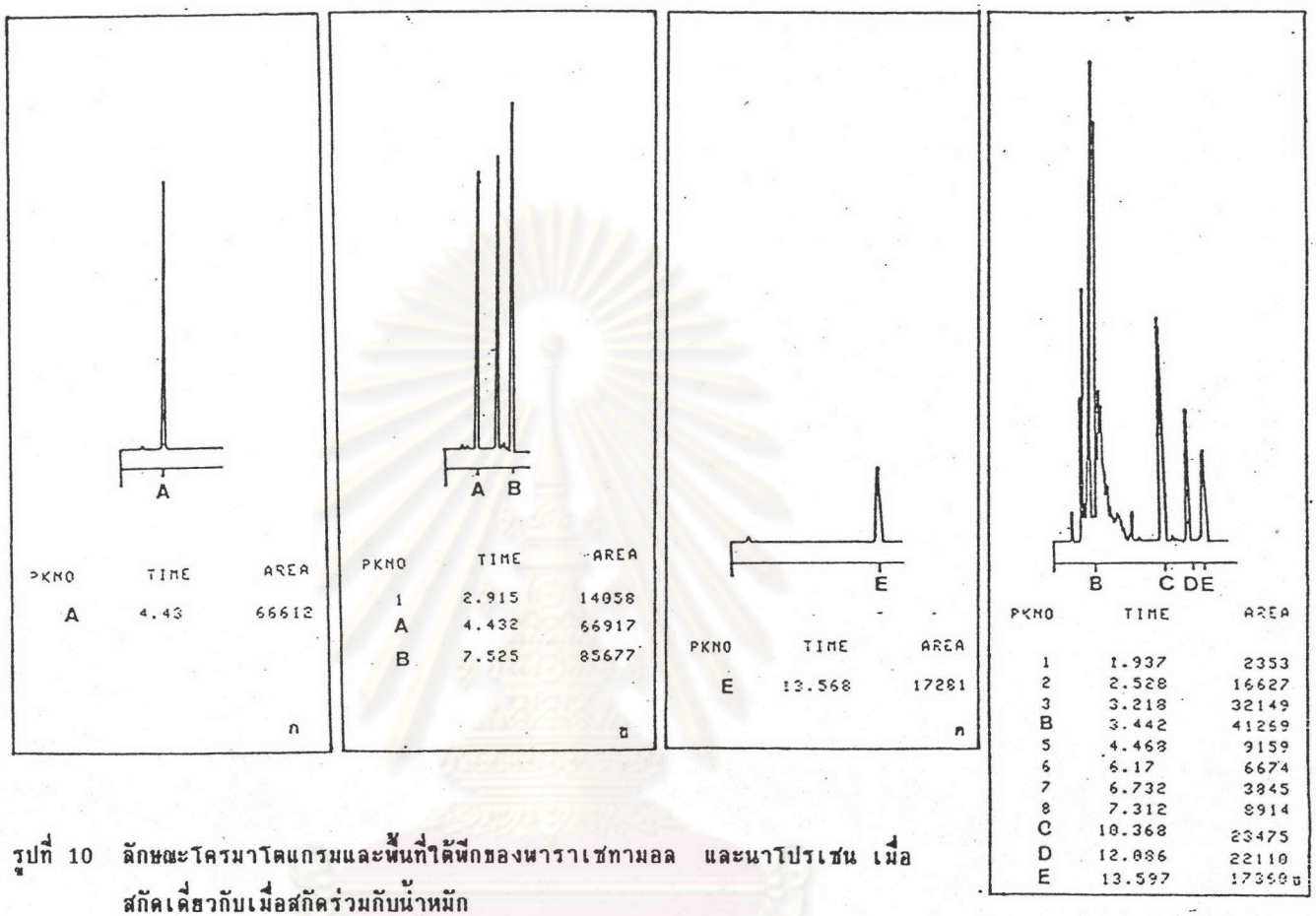
ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 ในน้ำหมัก จึงใช้วิธีตามข้อ

2.3.10 โดยมีพาราเซทามอลเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในของ GA_3 และนาโปรเซนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในของ GA_4 กับ GA_7 โดยใช้ระบบสารละลายตัวพาที่ประกอบด้วยสัดส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65 และ 55 ต่อ 45 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11

ตารางที่ 3 เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารต่างๆ ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในเมื่อตรวจวัดโดยวิธี HPLC กับคอลัมน์ C_8

สาร	เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (นาที)	
	อัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริก(ปริมาตรต่อปริมาตร)	
	35 ต่อ 65	55 ต่อ 45
Paracetamol	4.35	2.86
Glibenclamid	5.13	3.44
Methocarbamol	10.92	5.67
Penicillin G	>20	7.82
Cortisone	>20	9.08
Prednisolone	>20	10.60
Hydrocortisone	>20	10.85
Amoxicillin	>20	11.02
Naproxen	>20	13.49
Estrone	>20	14.16
Tertosterone	>20	15.35
Propyl paraben	>20	15.94
Caffeine	>20	15.95
Ampicillin	>20	16.05
Hydroxyprogesterone	>20	16.86
Carprofen	>20	18.83
Mebendazole	>20	>20
Progesterone	>20	>20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 ลักษณะโครมาโตแกรมและพื้นที่ใต้พีกของพาราเซทามอล และนาโปรเซน เมื่อสกัดเดี่ยวกับเมื่อสกัดร่วมกับน้ำหมัก

ก. เมื่อสกัดพาราเซทามอลเพียงสารเดียว

ข. เมื่อสกัดพาราเซทามอลร่วมกับน้ำหมัก

ค. เมื่อสกัดนาโปรเซนเพียงสารเดียว

ง. เมื่อสกัดนาโปรเซนร่วมกับน้ำหมัก

โดยที่พีก A คือ พาราเซทามอล

พีก B คือ GA_3

พีก C คือ GA_7

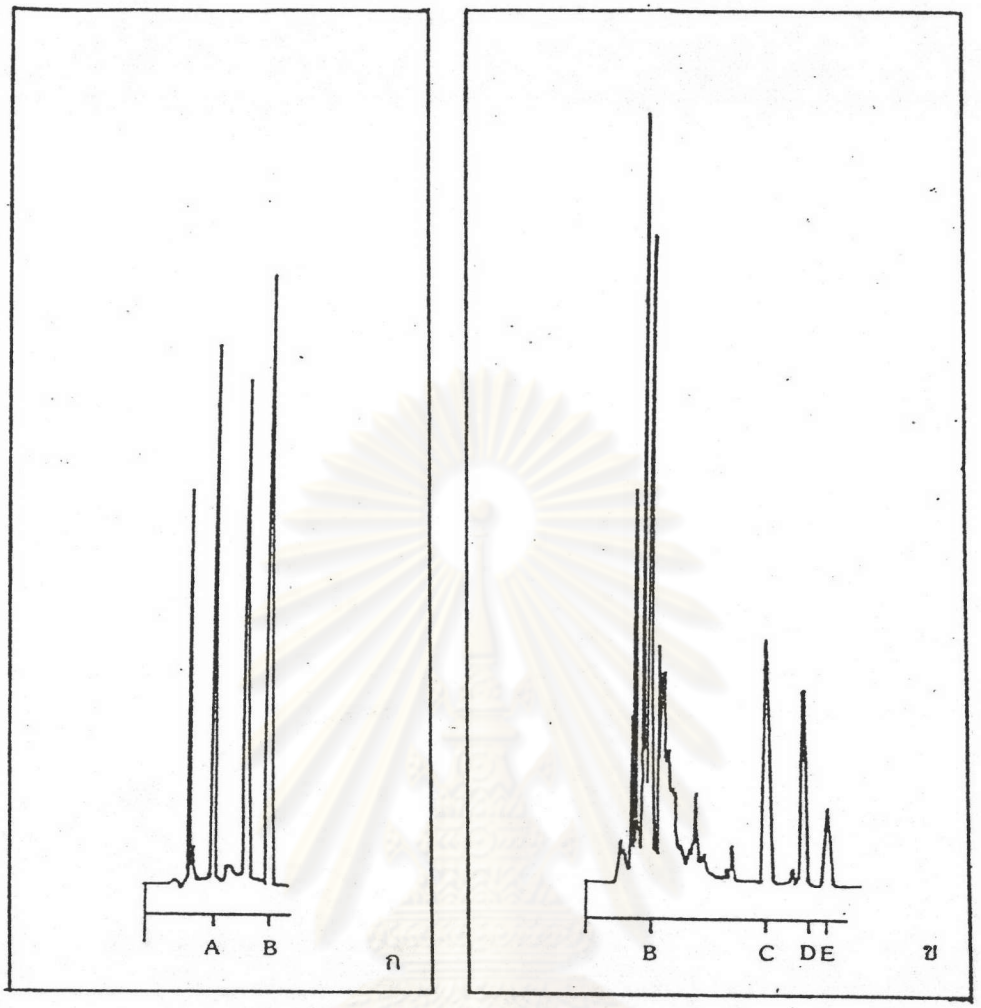
พีก D คือ GA_4

พีก E คือ นาโปเซน

หมายเหตุ ก.และ ข. ระบบสารละลายที่ใช้มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริก เป็น 35 ต่อ 65

ค.และ ง. ระบบสารละลายที่ใช้มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริก เป็น 55 ต่อ 45

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ๑๑ ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ในน้ำหมักที่ได้จากการสกัด เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC กับคอลัมน์ C_8 โดยมี พาราเซทามอล และ นาโปรเซนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน

ก. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65

ข. ระบบสารละลายตัวพาที่มีอัตราส่วนของเมทานอลกับสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 55 ต่อ 45

โดยที่พีก A คือ พาราเซทามอล

พีก B คือ GA_3

พีก C คือ GA_7

พีก D คือ GA_4

พีก E คือ นาโปรเซน

3.3 การศึกษาชนิดของแร่ธาตุเสริมและชนิดของน้ำมันพืชที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในขวดรูปชมพู่

จากการศึกษา อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินด้วยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในระดับขวดเขย่าโดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วซึ่งมีปริมาณไนโตรเจน 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุเสริมเป็นอลูมิเนียมออกไซด์ร่วมกับซิงค์คลอไรด์ และคอปเปอร์ซัลเฟตในปริมาณ 0.5 0.5 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เชื้อผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้ 683 27 และ 122 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุเสริมเป็นอลูมิเนียมออกไซด์ 0.10 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว ได้ปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 เป็น 621 26 และ 140 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ในสภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °ซ ตลอดการเพาะเลี้ยง จึงได้นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุเสริมทั้ง 2 แบบมาศึกษาผลของชนิดและปริมาณน้ำมันพืชต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 ในระบบขวดเขย่า โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินยิ่งขึ้น

เลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.4.1)ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.3 และวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ (randomized complete block design) โดยผันแปรชนิดของแร่ธาตุเป็น 2 แบบ แบบที่ 1 ประกอบด้วยอลูมิเนียมออกไซด์ 0.10 กรัมต่อลิตร แบบที่ 2 ประกอบด้วย อลูมิเนียมออกไซด์ร่วมกับซิงค์คลอไรด์ และคอปเปอร์ซัลเฟตในปริมาณ 0.5 0.5 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ กับผันแปรชนิดของน้ำมันพืชที่ใช้ร้อยละ 0.2 คือ น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันลินซีด และน้ำมันถั่วเหลือง

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 และ 5 เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) ของ GA_3 GA_4 และ GA_7 จากสภาพต่างๆ โดยระบบสุ่มในบลอคสมบูรณ์ดังแสดงในภาคผนวกที่ 4.1 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุเสริมที่ประกอบด้วยอลูมิเนียมออกไซด์ 0.10 กรัมต่อลิตร และที่ประกอบด้วยอลูมิเนียมออกไซด์ร่วมกับซิงค์คลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟตในปริมาณ 0.5 0.5 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ให้ปริมาณ GA_3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ

GA_3 แต่ละสภาพการทดลองโดยวิธี Duncan ดังแสดงในภาคผนวกที่ 4.1 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลือง หรือ น้ำมันรำข้าวร้อยละ 0.2 ในแร่ธาตุทั้ง 2 แบบ เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุด และแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยให้ปริมาณ GA_3 เป็น 401 400 392 และ 387 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแร่ธาตุเสริมและชนิดของน้ำมันพืชที่ใช้ศึกษาดังกล่าว พบว่าเชื้อสามารถผลิต GA_4 และ GA_7 ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยให้ปริมาณ GA_4 และ GA_7 ประมาณ 19 และ 60 มก.ต่อลิตรตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำหนักเซลแห้ง ในแต่ละสภาพการทดลอง พบว่าไม่แตกต่างกัน แต่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ทำให้เชื้อผลิต GA_3 ได้สูงสุดจะแตกต่างกัน โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะกอก และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันพืช เชื้อผลิต GA_3 ได้สูงสุดในวันที่ 7 ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืชชนิดอื่น เชื้อสามารถผลิต GA_3 สูงสุดในวันที่ 8 และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณและราคาของแร่ธาตุเสริมกับน้ำมันพืชที่ใช้ ร่วมกับปริมาณ GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 เชื้อสามารถผลิต GA_3 และ ผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้ประมาณ 400 และ 477 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ในแร่ธาตุเสริมทั้ง 2 แบบ ซึ่งสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืชชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จึงเลือกใช้แร่ธาตุเสริมที่เป็นอลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตรร่วมกับ ปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ในการศึกษาขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบผลการใช้อลูมิเนียมออกไซด์ 0.10 กรัมต่อลิตร กับชนิดของน้ำมันพืชร้อยละ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C

ชนิดของน้ำมันพืช	*เวลา(วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
				GA_3	GA_4	GA_7	รวม
ตัวควบคุม	7	3.5	20.4	353	21	64	438
น้ำมันรำข้าว	7	3.4	21.3	392	22	57	471
น้ำมันถั่วลิสง	7	3.6	20.5	381	18	63	462
น้ำมันมะกอก	8	3.4	22.8	351	19	62	432
น้ำมันปาล์ม	8	3.5	21.3	371	17	59	447
น้ำมันลินซีด	8	3.3	19.5	336	20	55	411
น้ำมันถั่วเหลือง	7	3.4	22.0	401	20	57	478

หมายเหตุ *เวลา(วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลการใช้อลูมิเนียมออกไซด์ ร่วมกับซิงค์คลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟต ในปริมาณ 0.5 0.5 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ กับชนิดของน้ำมันพืชร้อยละ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

ชนิดของน้ำมันพืช	*เวลา(วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
				GA_3	GA_4	GA_7	รวม
ตัวควบคุม	7	3.4	21.5	359	20	62	431
น้ำมันรำข้าว	7	3.6	20.9	387	20	56	463
น้ำมันถั่วลิสง	7	3.5	21.8	370	21	62	453
น้ำมันมะกอก	8	3.4	20.5	377	19	61	457
น้ำมันปาล์ม	8	3.2	21.3	380	16	57	453
น้ำมันลินซีด	8	3.3	19.1	361	18	59	438
น้ำมันถั่วเหลือง	7	3.4	21.8	400	17	60	477

หมายเหตุ * เวลา(วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การศึกษาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* C ในระบบขวดเขย่า

จากผลการทดลองตามข้อ 3.3 พบว่าการเติมน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุเสริมเป็นอลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตรนั้น เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันประมาณร้อยละ 14 ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ผันแปรปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* C ยิ่งขึ้น

เลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujukuroi* C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ(ภาคผนวกที่ 1.4.2) ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.3โดยมีองค์ประกอบของแร่ธาตุเสริมเป็นอลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตร และวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely ramdomized design) โดยผันแปรปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้เป็นร้อยละ 0.1 0.2 0.3 0.5 0.7 0.9 และ 1.1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตามลำดับ

ผลการทดลองในตารางที่ 6 เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 แบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ดังแสดงในภาคผนวกที่ 4.2 พบว่ามีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่แตกต่างกันอยู่อย่างน้อย 1 คู่ ที่ทำให้ปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 ที่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณ GA_3 GA_4 และ GA_7 ในแต่ละสภาพการทดลองโดยวิธี Duncan พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ให้ปริมาณ GA_3 ได้สูงสุดประมาณ 412 มก.ต่อลิตร และสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ประมาณร้อยละ 14 ส่วนผลการผลิต GA_4 และ GA_7 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 1.1 นั้น แม้ว่าเชื้อจะผลิต GA_3 ได้ปริมาณเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันถั่วเหลือง แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อสามารถผลิต GA_4 และ GA_7ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นรวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมน้ำมันถั่วเหลืองประมาณร้อยละ 36 และ 40 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำหนักของเซลแห้ง ในแต่ละสภาพการทดลอง พบว่าไม่แตกต่างกัน แต่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่ทำให้เชื้อผลิต GA_3 สูงสุดจะแตกต่างกัน โดยเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.1 ถึง 0.5 และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันถั่วเหลือง เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุดในวันที่ 7 ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.7 ถึง 1.1 เชื้อจะผลิต GA_3 สูงสุดในวันที่ 8 และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณ GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 เชื้อสามารถเจริญและผลิต GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4

และ GA_7 ได้ 412 และ 504 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันถั่วเหลืองประมาณร้อยละ 14 และ 12 ตามลำดับ ดังนั้นการทดลองต่อไปจะเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 สำหรับการเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

ตารางที่ 6 ผลการผันแปรปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C

ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง (ร้อยละ)	*เวลา(วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
				GA_3	GA_4	GA_7	รวม
0	7	3.2	20.9	362	30	59	451
0.1	7	3.4	21.8	401	21	60	482
0.2	7	3.5	22.5	412	28	64	504
0.3	7	3.6	20.5	398	25	65	488
0.5	7	3.2	21.8	400	27	58	485
0.7	8	3.5	22.4	395	28	52	485
0.9	8	3.4	21.4	373	30	62	465
1.1	8	3.3	20.9	362	42	80	484

หมายเหตุ *เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 ศึกษาผลการผันแปรอัตราการกวนที่มีต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาปัจจัยต่างๆในขวดรูปชมพู่โดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(21) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ประกอบด้วยสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตและกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร อลูมิเนียมออกไซด์ 0.10 กรัมต่อลิตร หรืออลูมิเนียมออกไซด์ร่วมกับซิงค์คลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟตใน ปริมาณ 0.5 0.5 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแร่ธาตุเสริม และจากผลการศึกษาตามข้อ 3.3 และ 3.4 พบว่าการเติมน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุเสริมเป็นอลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตรนั้น ทำให้เชื้อ Gibberella fujikuroi C ผลิต GA_3 ได้เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 14 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 พบว่าเป็นอุณหภูมิ 25°ซ (21) ดังนั้นจึงใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะดังกล่าว มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมอื่นๆที่ไม่สามารถศึกษาได้จากการทดลองในขวดรูปชมพู่ เช่น อัตราการกวนที่เหมาะสม อัตราการให้อากาศ การควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักในระดับต่างๆ และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในระหว่างการเพาะเลี้ยงเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อในภาคผนวกที่ 1.5.1 และวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยผันแปรอัตราการกวนเป็น 300 400 500 600 และ 700 รอบต่อนาทีตามลำดับ อัตราการให้อากาศคงที่ที่ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 17 (สรุปผลการทดลองจากรูปที่ 12 ถึง 16) พบว่าปริมาณ GA_3 ที่เชื้อผลิตจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการกวนจาก 300 ถึง 700 รอบต่อนาที และสภาวะที่มีอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที จะได้ปริมาณ GA_3 สูงสุดเป็น 491 มก.ต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 240 ซึ่งแตกต่างจากอัตราการกวนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนการผลิต GA_4 (ดังแสดงในรูปที่ 12 ถึง 16) พบว่าที่อัตราการกวน 500 ถึง 700 รอบต่อนาที เชื้อจะให้ผลผลิต GA_4 ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ปริมาณ GA_4 ประมาณ 150 มก.ต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าสภาวะที่ใช้อัตราการกวน 300 และ 400 รอบต่อนาที ในขณะที่อัตราการกวน 300 ถึง 700 รอบต่อนาที เชื้อให้ปริมาณ GA_7 ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณ GA_7 ที่ได้ประมาณ 144 มก.ต่อลิตร

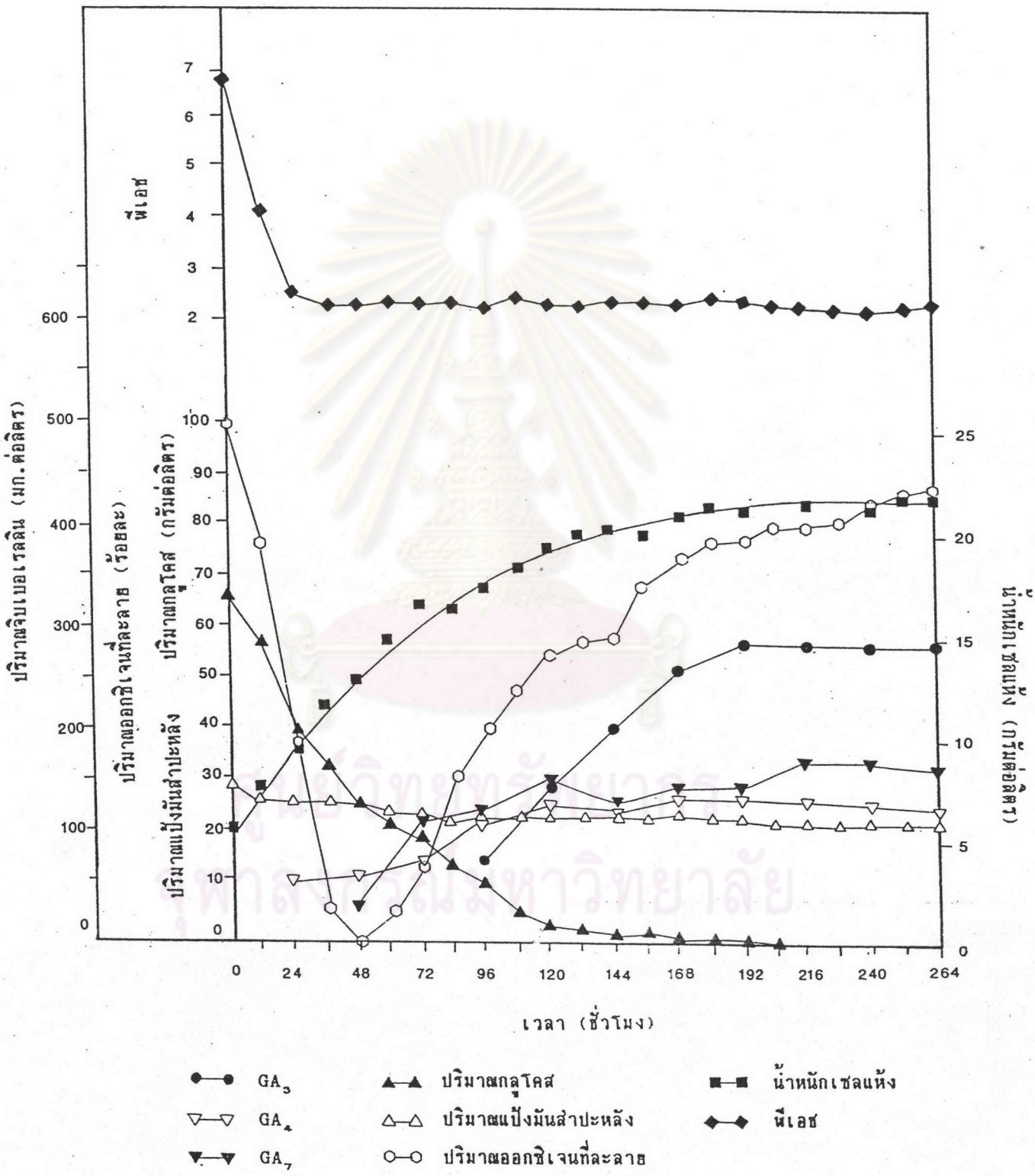
เมื่อพิจารณาความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก จะพบว่าเมื่ออัตราการกวนเพิ่มขึ้น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของน้ำหมักจะมีแนวโน้มที่เหมือนกัน คือความเป็นกรดของน้ำหมักจะลดลงจาก 6.5 เป็น 2.5 อย่างรวดเร็วภายใน 36 ชั่วโมง และรักษาความเป็นกรดในช่วง 2.5 ถึง 3 ตลอดการผลิตจิบเบอเรลลิน

เมื่อพิจารณาการใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลังของเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถใช้กลูโคสได้ดีกว่าใช้แป้งมันสำปะหลัง ทั้งที่ใช้เพื่อการเจริญเติบโตและการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อจะใช้กลูโคสได้อย่างรวดเร็ว จนไม่มีกลูโคสเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 216 ในขณะที่เชื้อสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังได้ปริมาณน้อยในช่วงแรกของการเจริญ และหลังจากที่กลูโคสถูกใช้หมดไป ปริมาณแป้งมันสำปะหลังยังคงเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 2 ซึ่งเป็นปริมาณที่ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อมีประสิทธิภาพการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ต่ำ จึงเป็นสาเหตุทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูง และความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวนี้ไม่ได้เกิดเนื่องจากสารโพลีแซกคาร์ไรด์ที่เชื้ออาจผลิตขึ้น ซึ่งสามารถตรวจสอบชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยน้ำหมักด้วยกรด ดังแสดงในภาคผนวกที่ 5 ความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนนี้ ทำให้ต้องใช้พลังงานสำหรับการกวนที่สูงถึง 700 รอบต่อนาที เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีการถ่ายเทมวลสาร และออกซิเจนได้อย่างทั่วถึง ทั้งยังทำให้เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้จะได้นำมาพิจารณาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมอื่นทดแทนต่อไป

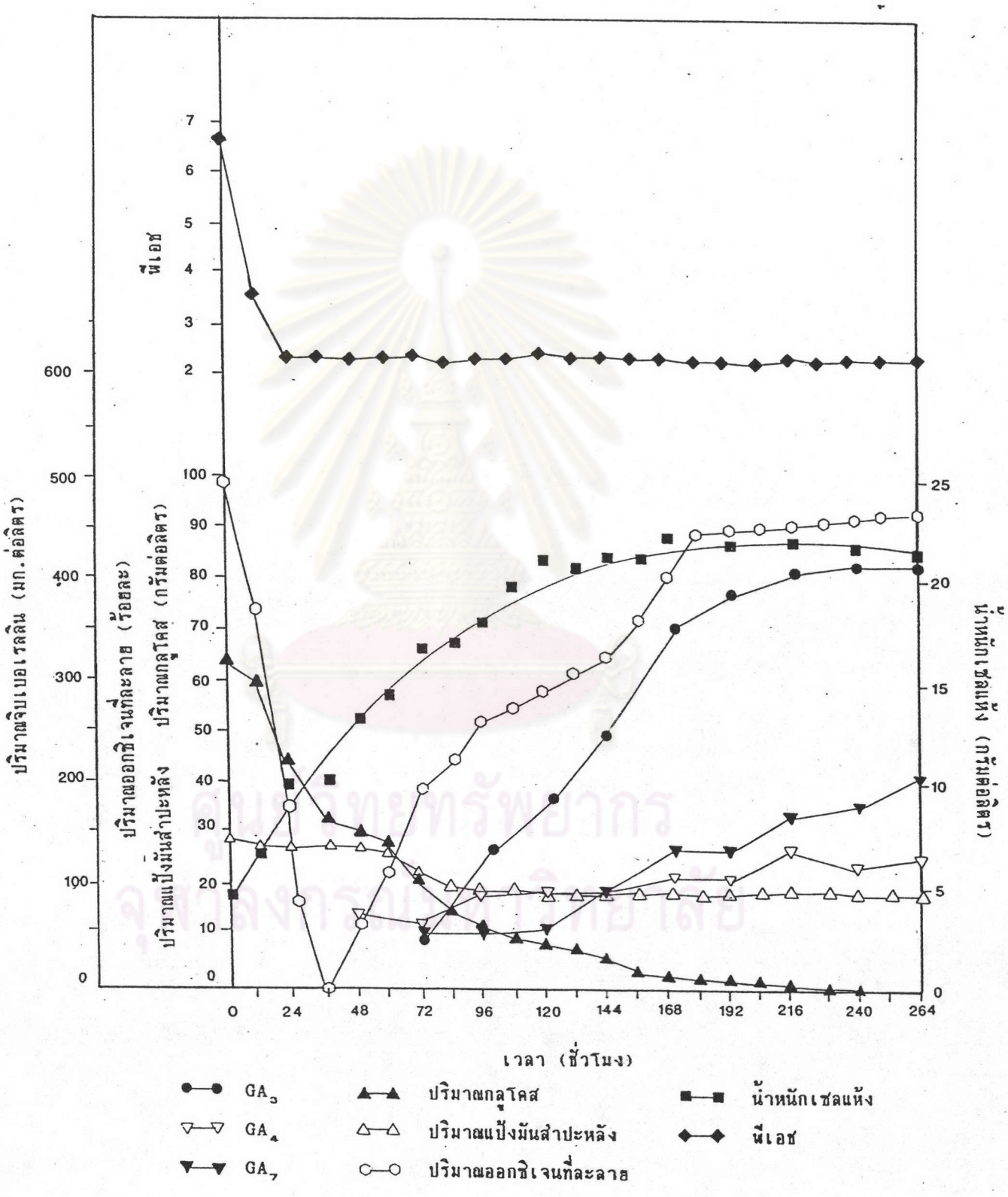
นอกจากนี้การเพิ่มอัตราการกวนยังเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อ และปริมาณน้ำหนักเซลดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณออกซิเจนที่เหลืออยู่ในถังหมัก เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซึ่งปรับให้มีค่าเป็น 100 เปอร์เซนต์ ในสภาวะเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง) กับการเจริญ จะพบว่าในขณะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด จะเป็นช่วงที่เชื้อมีอัตราการใช้ออกซิเจนสูงสุดด้วย หลังจากนั้นอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงเป็น 0 เมื่อใช้อัตราการกวน 300 ถึง 500 รอบต่อนาที ส่วนสภาวะที่มีอัตราการกวน 600 และ 700 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงเป็น 4 และ 10 ตามลำดับ ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้อาจมีปริมาณออกซิเจนที่ไม่เพียงพอกับความต้องการของเชื้อ ดังนั้นจึงได้เลือกอัตราการกวนที่ 600 และ 700 รอบต่อนาที มาศึกษาผลของการเพิ่มอัตราการให้อากาศในการศึกษาขั้นต่อไป เพราะเป็นสภาวะที่เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงกว่าสภาวะอื่นๆ

I18750060

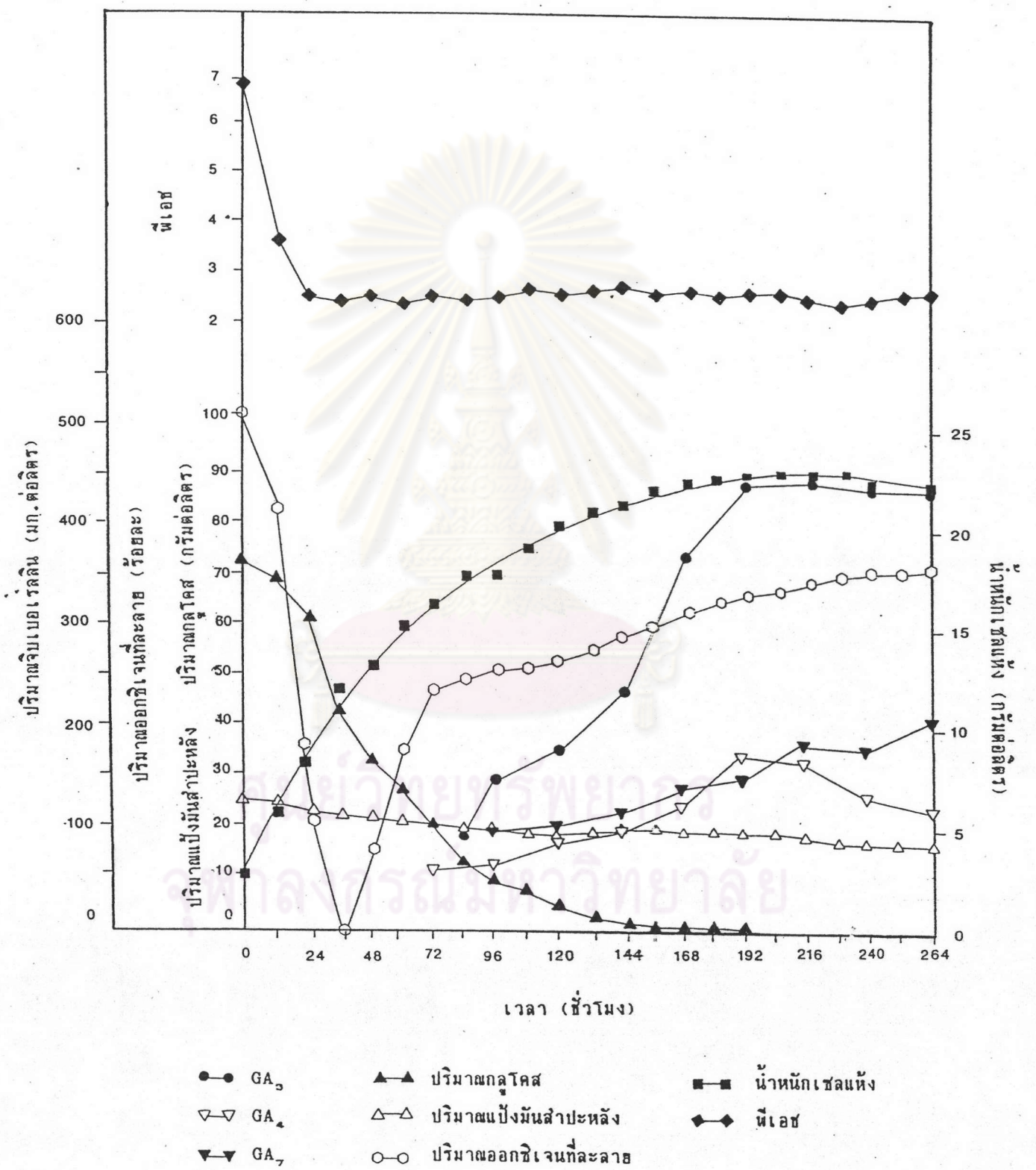
รูปที่ 12 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



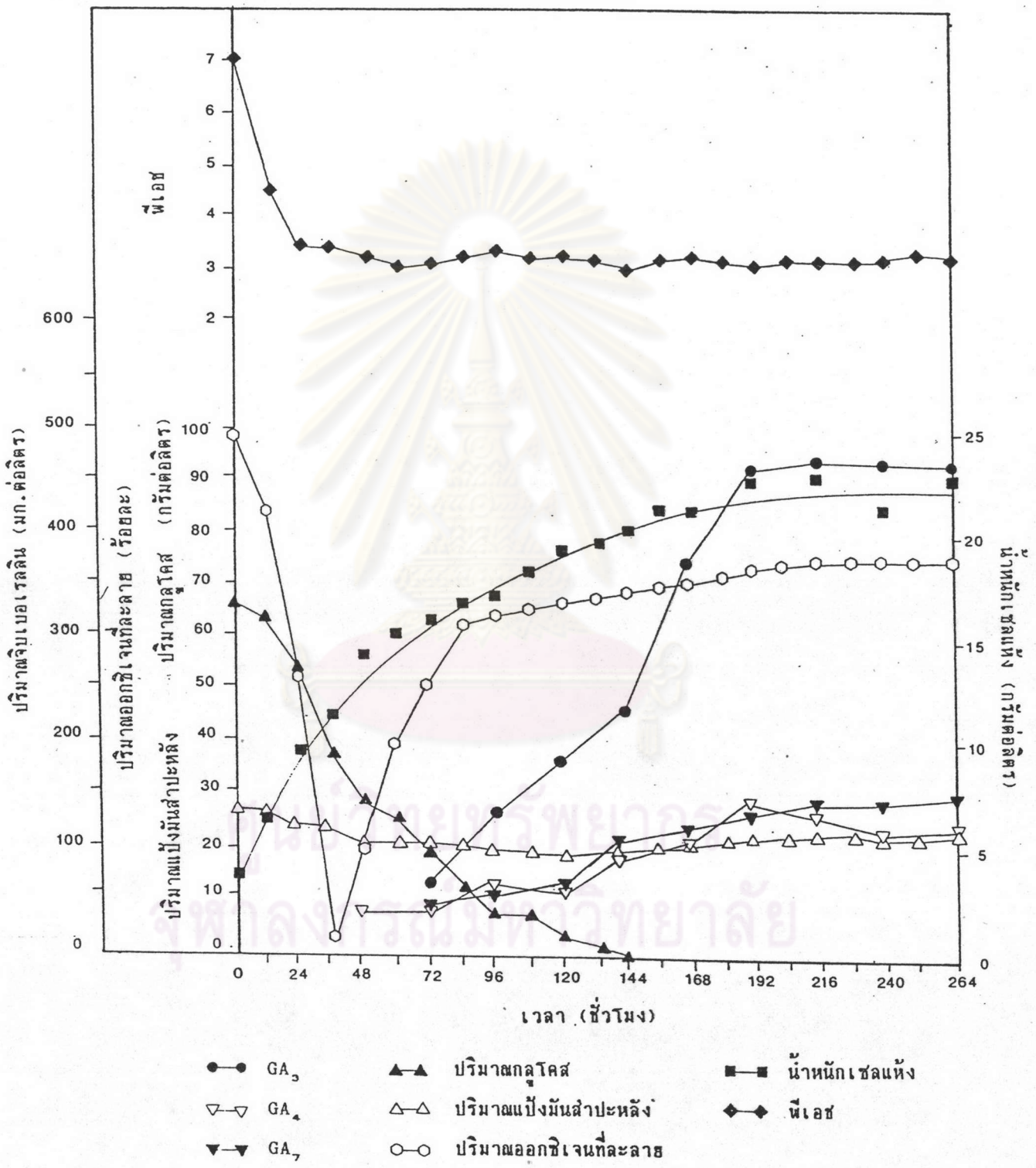
รูปที่ 13 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



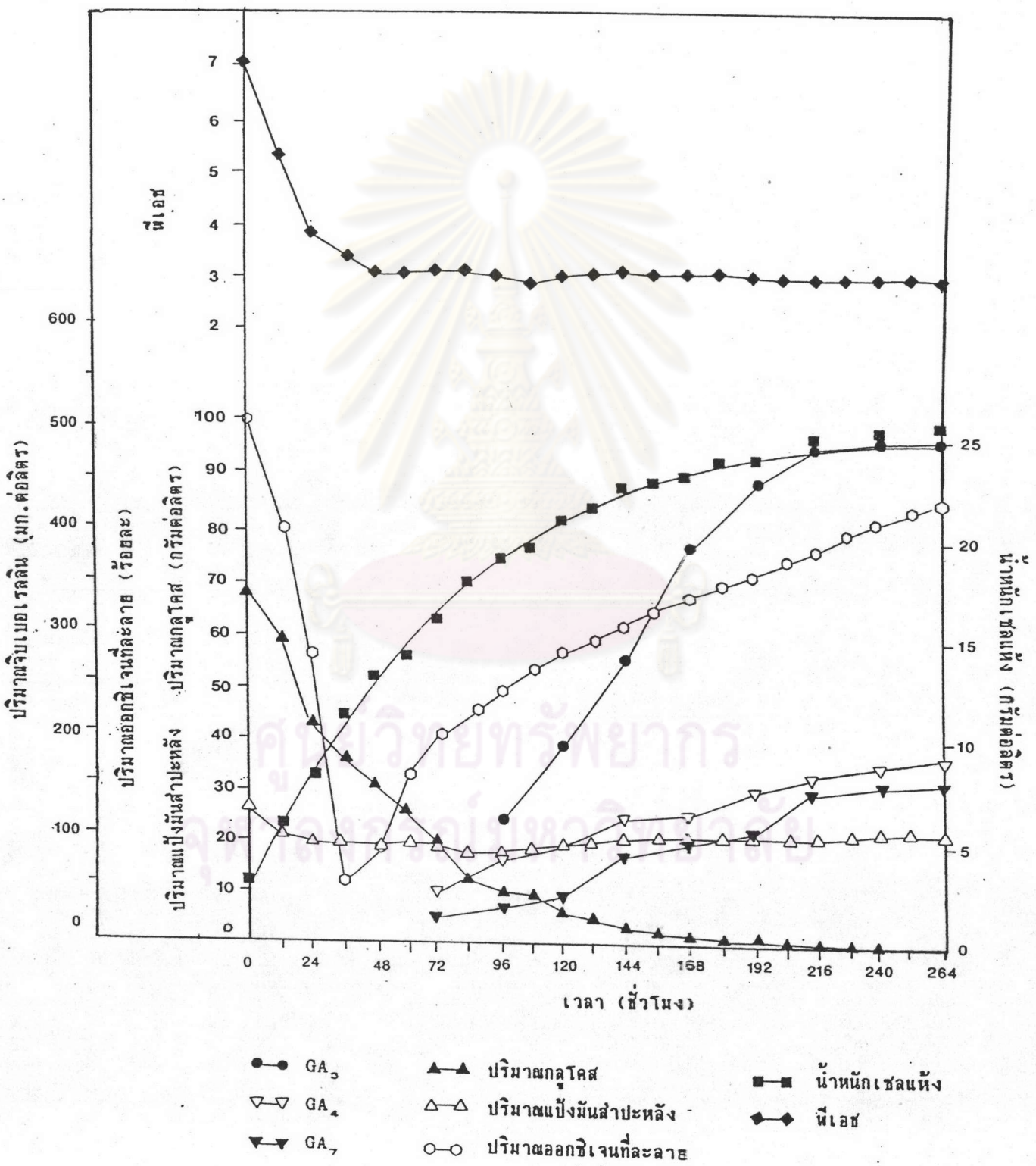
รูปที่ 14 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



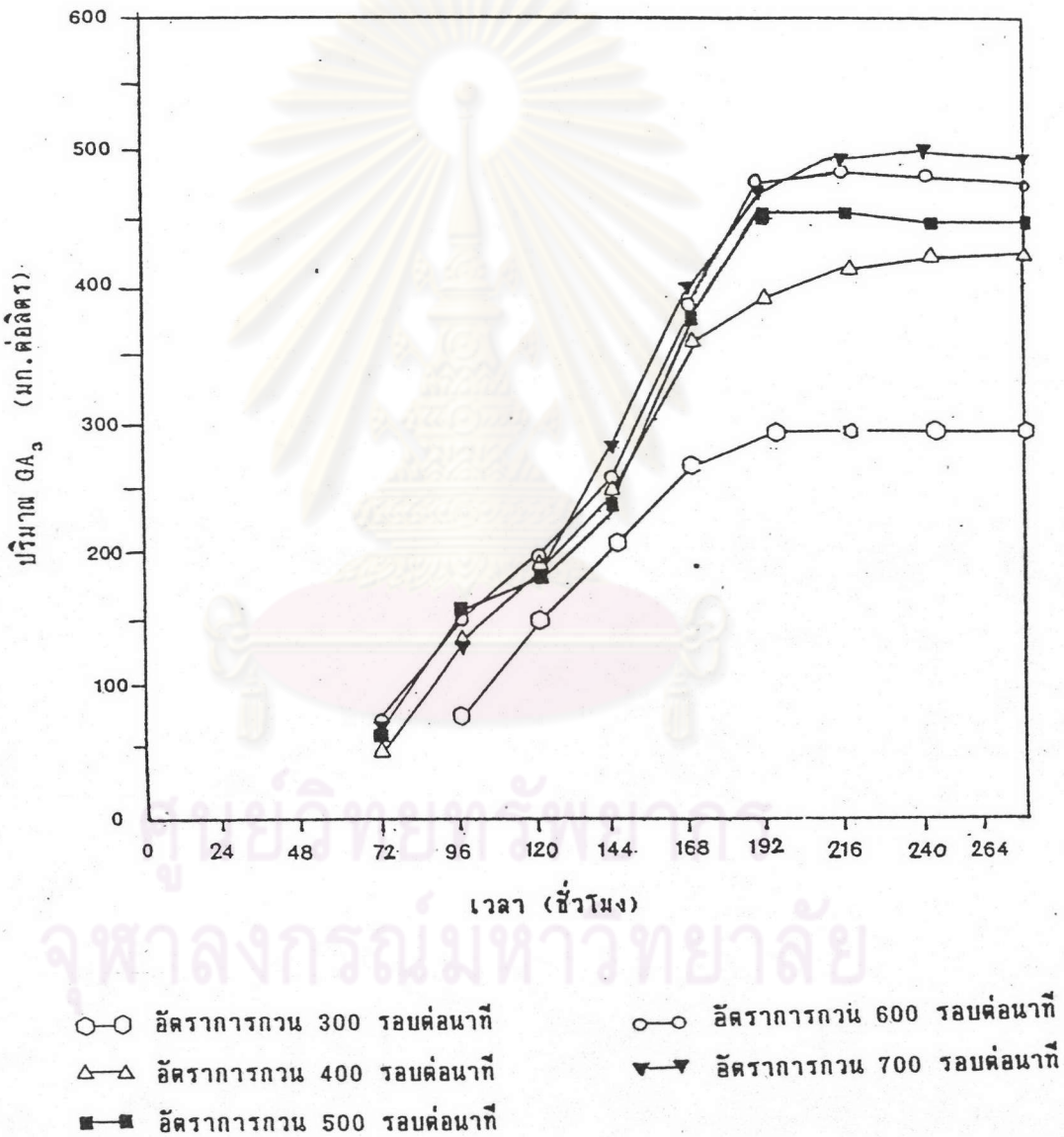
รูปที่ 15 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 16 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 700 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 ที่ผลิตในระยะเวลาต่างๆกันของการเพาะเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผันแปรอัตราการกวนตั้งแต่ 300 ถึง 700 รอบต่อนาที (สรุปจากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 12 ถึง 16)



ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) ที่ผลิตได้ ปริมาณเซล ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหลือ และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรอัตราการกวนต่างๆกันตั้งแต่ 300 ถึง 700 รอบต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	ปริมาณออกซิเจนต่ำสุดที่มีในถังหมัก (ร้อยละ)	*เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
							GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
300	0	192	2.5	21.5	22.3	1.0	285	142	147	574
400	0	216	2.6	21.6	18.9	1.3	428	134	150	712
500	0	216	2.6	22.1	18.8	-	459	160	146	765
600	4	216	3.2	23.4	19.1	-	471	156	146	773
700	10	240	3.3	24.8	17.3	-	491	152	132	775

หมายเหตุ * เวลา (ชม.) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

\- หมายถึง ตรวจไม่พบปริมาณกลูโคส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

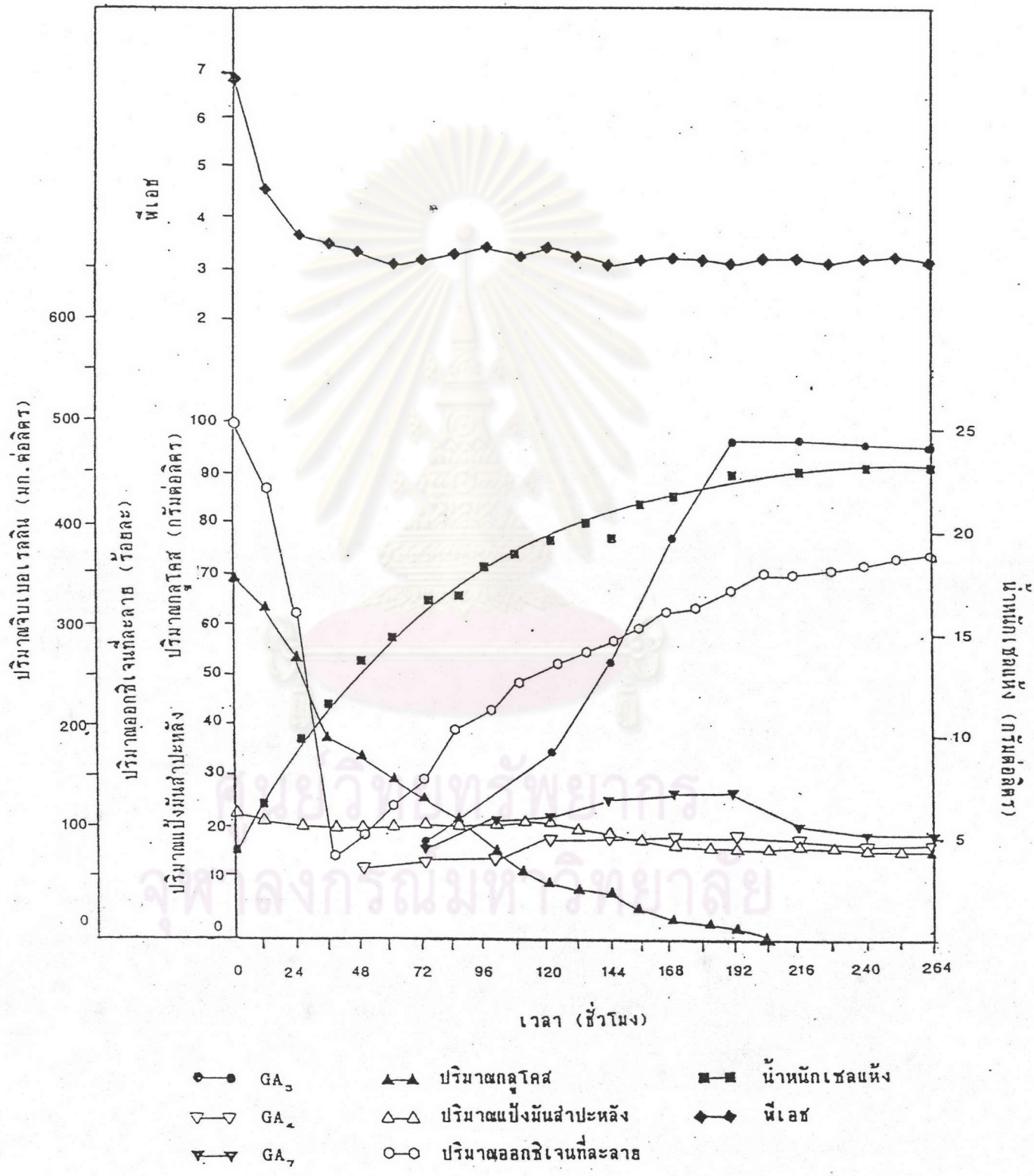
3.6 ศึกษาผลการเพิ่มอัตราการให้อากาศที่มีต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากผลการผันแปรอัตราการกวนที่มีต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 ตามข้อ 3.5 พบว่าสภาวะที่มีอัตราการกวน 600 และ 700 รอบต่อนาที เชื้อผลิต GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้สูงกว่าสภาวะอื่น จึงใช้สภาวะดังกล่าวมาศึกษาผลการเพิ่มอัตราการให้อากาศที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน จาก 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ตามการทดลองที่ 3.5 เป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

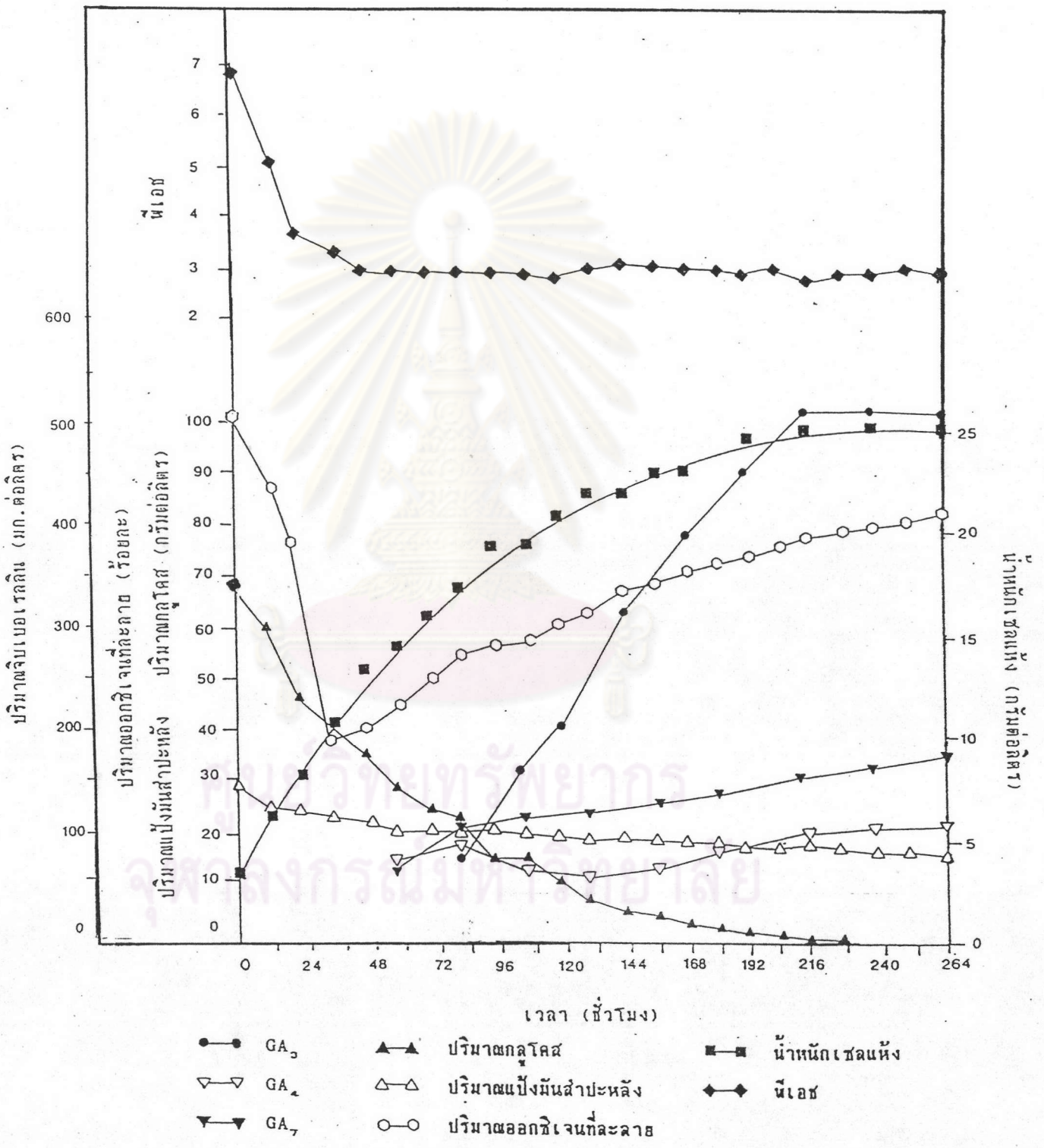
เลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามภาคผนวกที่ 1.5.1 โดยใช้อัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที และอัตราการกวน 600 และ 700 รอบต่อนาที

ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 18 และ 19 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในรูปที่ 15 และ 16 ในการทดลองที่ 3.5 พบว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศจะทำให้เชื้อผลิต GA_4 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่ใช้อัตราการกวน 600 และ 700 รอบต่อนาที โดยสภาวะที่มีอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที เชื้อสามารถผลิต GA_4 ได้สูงสุด 154 มก.ต่อลิตร และแตกต่างจากสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการผลิต GA_7 พบว่าอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนให้ปริมาณ GA_7 ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และได้ปริมาณ GA_7 ประมาณ 150 มก.ต่อลิตร ส่วนปริมาณ GA_3 พบว่า การเพิ่มอัตราการกวน การเพิ่มอัตราการให้อากาศ และผลร่วมของปัจจัยทั้งสองต่างมีผลในทิศทางของการเพิ่มปริมาณ GA_3 ทั้งสิ้น โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อในการผลิต GA_3 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน คือ สภาวะที่ใช้อัตรากวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาทีซึ่งสภาวะดังกล่าว เชื้อผลิต GA_3 ได้ประมาณ 521 มก.ต่อลิตร และสูงกว่าสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 20 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่รุนแรงต้องใช้พลังงานในการกวนสูง เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความหนืด เนื่องจากปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ยังคงเหลืออยู่ในถังหมักซึ่งมีปริมาณค่อนข้างสูงนั้นสามารถมีการถ่ายเทออกซิเจนและสารอาหารได้ดีขึ้น จากสาเหตุดังกล่าวจึงได้ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมอื่นมาแทนที่ เพื่อลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และแก้ปัญหาที่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรงเช่นนี้สำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินต่อไป

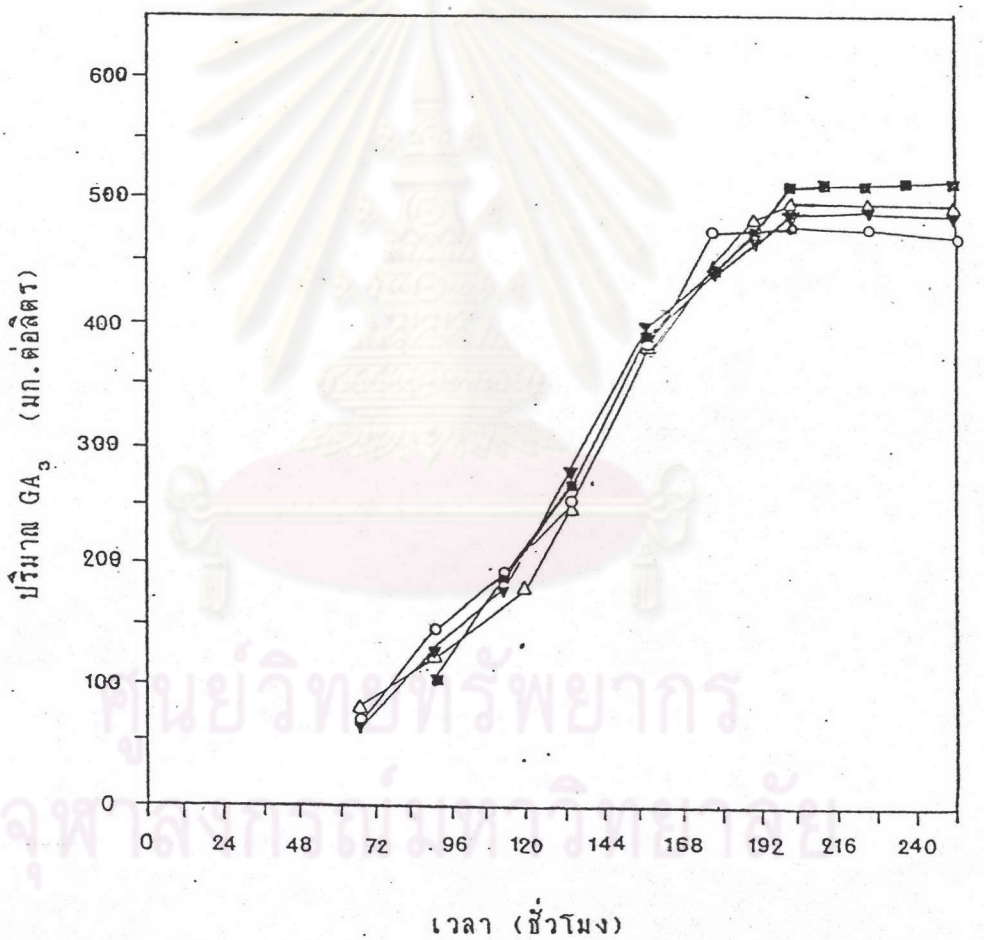
รูปที่ 18 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 19 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 ที่ผลิตในระยะเวลาต่างๆกันของการเพาะเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผันแปรอัตราการกวนกับอัตราการให้อากาศ (สรุปจากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 15 ถึง 19)



o—o อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

▼—▼ อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

△—△ อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

■—■ อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

3.7 เปรียบเทียบการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในระดับขวดเขย่า เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร กับแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองตามข้อ 3.5 และ 3.6 พบว่าการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C นั้นเป็นกระบวนการที่ต้องการปริมาณออกซิเจนอย่างมาก และสภาวะที่เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุด เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ต้องใช้สภาวะที่มีอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ซึ่งเป็นสภาวะที่รุนแรงในทางปฏิบัติ เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังอยู่ร้อยละ 3 และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ยังคงพบว่ามีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 2 ซึ่งปริมาณดังกล่าวจะเป็นปริมาณสารอาหารที่เหลือทิ้งที่ทำให้เกิดปัญหาต่อไปในกระบวนการเก็บเกี่ยว (recovery) และอาจทำให้เกิดมลภาวะต่างๆที่ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสำหรับการบำบัด ดังนั้นจึงได้ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนอื่นที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินทดแทน เพื่อแก้ไขปัญหาเหล่านี้ต่อไป

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในระบบขวดเขย่า ที่รายงานไว้โดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21) พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อรา Gibberella fujikuroi C ผลิต GA_3 สูงรองลงมาจากแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร คือ แหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 60 ต่อ 40 กรัมต่อลิตร และสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จึงได้เลือกแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตร มาเปรียบเทียบการผลิตจิบเบอเรลลิน กับแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรในระดับขวดเขย่า เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร เพื่อลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้การถ่ายเทออกซิเจนเป็นไปได้ดี สามารถลดพลังงานที่ใช้ในการกวนได้

เลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภาคผนวกที่ 1.4.3 ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.3.3.3 ยกเว้นผันแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร และแหล่งคาร์บอนที่สัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในระบบขวดเขย่า

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิต GA_3 และ GA_7 ได้ไม่แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิต GA_3 และ GA_7 ได้ 390 และ 76 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรนั้น เชื้อผลิต GA_3 และ GA_7 ได้ 411 และ 71 มก.ต่อลิตรตามลำดับ แต่ปริมาณ GA_4 พบว่าเชื้อสามารถผลิต GA_4 ในแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังได้สูงกว่าประมาณร้อยละ 57

ดังนั้นจึงเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครส เป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C แทนแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลัง 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร แม้ว่าเชื้อจะสามารถผลิต GA_4 ได้น้อยกว่าก็ตาม แต่แหล่งคาร์บอนดังกล่าว สามารถลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้การถ่ายเทออกซิเจนเป็นไปได้ดี และสามารถลดพลังงานที่ใช้ในการกวน

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร กับแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	* เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
				GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
กลูโคสต่อแป้งมันสำปะหลัง (70 ต่อ 30)	168	3.4	23.6	411	22	71	504
กลูโคสต่อซูโครส (50 ต่อ 50)	168	3.5	21.5	390	14	76	481

หมายเหตุ * เวลา(ชม.) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

3.8 การศึกษาสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในระบบขวดเขย่า

จากผลการทดลองในข้อ 3.7 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 50 ต่อ 50 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิต GA_3 และ GA_7 ได้ไม่แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร แม้ว่าเชื้อจะผลิต GA_4 ได้น้อยกว่า แต่แหล่งคาร์บอนนี้สามารถลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งเป็นปัญหาที่พบเมื่อนำมาศึกษาในถังหมักขนาด 5 ลิตร(ดังแสดงในการทดลองข้อ 3.6) จึงได้นำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาผันแปรสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครส ทั้งนี้เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C

เลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อที่ 2.2.3.3 และทำการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยผันแปรสัดส่วนระหว่างกลูโคสกับซูโครสเป็น 20 ต่อ 80 40 ต่อ 60 50 ต่อ 50 60 ต่อ 40 และซูโครส 100 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และมีแอมโมเนียมซัลเฟตและกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้ว ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร และซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถเจริญและผลิต GA_3 และ GA_4 ได้สูงใกล้เคียงกันและแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร จะได้ GA_3 และ GA_4 เป็น 420 และ 19 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 7 ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครสอย่างเดียว จะได้ GA_3 และ GA_4 เป็น 423 และ 18 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 7 เช่นกัน ส่วนการผลิต GA_4 นั้น พบว่าแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครส เป็น 20 ต่อ 80 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิต GA_4 สูงสุดและแตกต่างจากแหล่งคาร์บอนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ที่จะนำไปศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อไป เพราะเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถผลิต GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบการผันแปรสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

สัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครส	*เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน(มก.ต่อลิตร)			
				GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
0 ต่อ 100	7	3.4	21.3	423	18	61	502
20 ต่อ 80	7	3.5	22.4	377	31	51	459
40 ต่อ 60	7	3.4	23.4	420	19	56	495
50 ต่อ 50	7	3.4	22.5	399	22	45	466
60 ต่อ 40	7	3.5	21.3	367	21	33	421

หมายเหตุ * เวลา(วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.9 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในระบบขวดเขย่า

จากรายงานของ Borrow และคณะ(23) พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อเชื้อสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินมากกว่าปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ ซึ่งสอดคล้องกับที่ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ รายงาน(21) นอกจากนี้ Balan (39) พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ยังมีผลต่อเชื้อสำหรับการผลิตไบคาเวอริน และการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกแหล่งไนโตรเจนบางชนิดที่เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงจากรายงานที่ศึกษาโดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(21) เพื่อหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน เมื่อใช้ซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

เลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในขวดรูปชมพู่ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 1.5.3 โดยมีซูโครส 100 กรัมต่อลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน และทำการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยผันแปรชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนและใช้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเป็น 0.54 กรัมต่อลิตร ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษามี แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ กากถั่วเหลือง แอมโมเนียมคลอไรด์กับกากถั่วเหลือง แอมโมเนียมไนเตรทกับกากถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลือง โดยกรณีที่แหล่งไนโตรเจนมีทั้งอินทรีย์ไนโตรเจนกับอนินทรีย์ไนโตรเจนนั้น ให้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีอินทรีย์ไนโตรเจนเป็น 0.14 กรัมต่อลิตร ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็น 0.4 กรัมต่อลิตร (21)

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์กับกากถั่วเหลือง และแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เชื้อผลิต GA_3 ได้สูงสุด และแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยให้ปริมาณ GA_3 เป็น 402 และ 417 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นกากถั่วเหลือง เชื้อจะผลิต GA_4 ได้สูงสุดและแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยให้ปริมาณ GA_4 เป็น 30 มก.ต่อลิตร ส่วนการผลิต GA_7 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลือง เชื้อจะผลิต GA_7 สูงสุด และแตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยให้ปริมาณ GA_7 เป็น 57 มก.ต่อลิตร

ส่วนความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก พบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างในน้ำหมัก ในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่ง

ไนโตรเจนเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน เมื่อเชื้อใช้อิออนที่เป็นไนโตรเจนแล้วจะทำให้เหลืออิออนที่เป็นประจุลบอยู่ในน้ำหมักซึ่งมีผลต่อความเป็นกรดด่างในน้ำหมัก ดังแสดงในตารางที่ 10

เมื่อพิจารณาสารสีแดงและปริมาณไบคาเวอริน ซึ่งวิเคราะห์ตามภาคผนวกที่ 7 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น เชื้อสามารถผลิตสารสีแดง และสารไบคาเวอรินได้ปริมาณน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์กับกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมไนเตรต พบว่าเชื้อไม่ผลิตสารสีแดงและตรวจไม่พบการผลิตสารไบคาเวอริน

เมื่อคำนึงถึงปริมาณ GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ตลอดจนปริมาณไบคาเวอรินที่ผลิต จึงเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและกากถั่วเหลืองที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ที่จะนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการผันแปรชนิดของสารแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.54 กรัมต่อลิตร ต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 กับปริมาณไบคาเวอริน โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ในระบบขวดเขย่า

แหล่งไนโตรเจน	*เวลา (วัน)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)				**ปริมาณไบคาเวอริน
				GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม	
แอมโมเนียมไนเตรต	7	6.5	26.16	360	18	14	392	0
แอมโมเนียมซัลเฟต	7	2.5	19.85	349	19	22	390	+3
แอมโมเนียมคลอไรด์	7	2.4	22.40	366	-	16	382	+3
แอมโมเนียมคลอไรด์ กับกากถั่วเหลือง แอมโมเนียมไนเตรต	7	2.6	21.93	402	17	21	440	+4
กับกากถั่วเหลือง แอมโมเนียมซัลเฟต	7	6.5	27.80	380	-	40	420	+2
กับกากถั่วเหลือง	7	3.4	20.69	417	20	57	494	+2
กากถั่วเหลือง	7	6.4	22.80	343	30	31	404	+4

หมายเหตุ * เวลา(ชั่วโมง) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

\- หมายถึง ปริมาณ GA_4 มีน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้

** ปริมาณไบคาเวอริน หมายถึง กำหนดความเข้มของสีสูงสุด เท่ากับ +4

3.10 ศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เมื่อใช้กลูโคสกับซูโครส หรือซูโครสเพียงชนิดเดียวเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองในข้อ 3.6 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตร คือ สภาวะที่ใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ซึ่งเป็นสภาวะที่รุนแรงและต้องใช้พลังงานสำหรับการกวนสูง เพื่อทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืดเนื่องจากมีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบ มีการถ่ายเทออกซิเจนและมวลสารต่างๆได้อย่างทั่วถึง ดังนั้นจึงได้ศึกษาเพื่อหาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ที่ไม่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูงมาทดแทนการใช้แป้งมันสำปะหลัง และจากผลการทดลองในข้อ 3.7 และ 3.8 พบว่าแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยสัดส่วนของกลูโคสกับซูโคสเป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร หรือซูโครส 100 กรัมต่อลิตรนั้น เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุด คือ 420 และ 423 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งผลผลิตที่ได้นี้ให้ค่าที่ไม่แตกต่างจากแหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อแป้งมันสำปะหลังเป็น 70 ต่อ 30 กรัมต่อลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งให้ปริมาณ GA_3 เป็น 411 มก.ต่อลิตร แม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เชื้อจะผลิต GA_4 ได้น้อยกว่าเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นองค์ประกอบ ประมาณร้อยละ 57 แต่แหล่งคาร์บอนดังกล่าวสามารถลดความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะทำให้การถ่ายเทมวลสารและออกซิเจนเป็นไปได้ดีกว่า และสามารถลดพลังงานที่ใช้ในการกวนได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวนี้ สำหรับการศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

เลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อภาคผนวกที่ 1.5.2 โดยผันแปรแหล่งคาร์บอนเป็น 2 แบบ แบบที่ 1 ประกอบด้วยสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครสเป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร แบบที่ 2 ประกอบด้วยซูโครส 100 กรัมต่อลิตร และผันแปรอัตราการกวนเป็น 2 แบบ คือ 400 และ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศคงที่ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

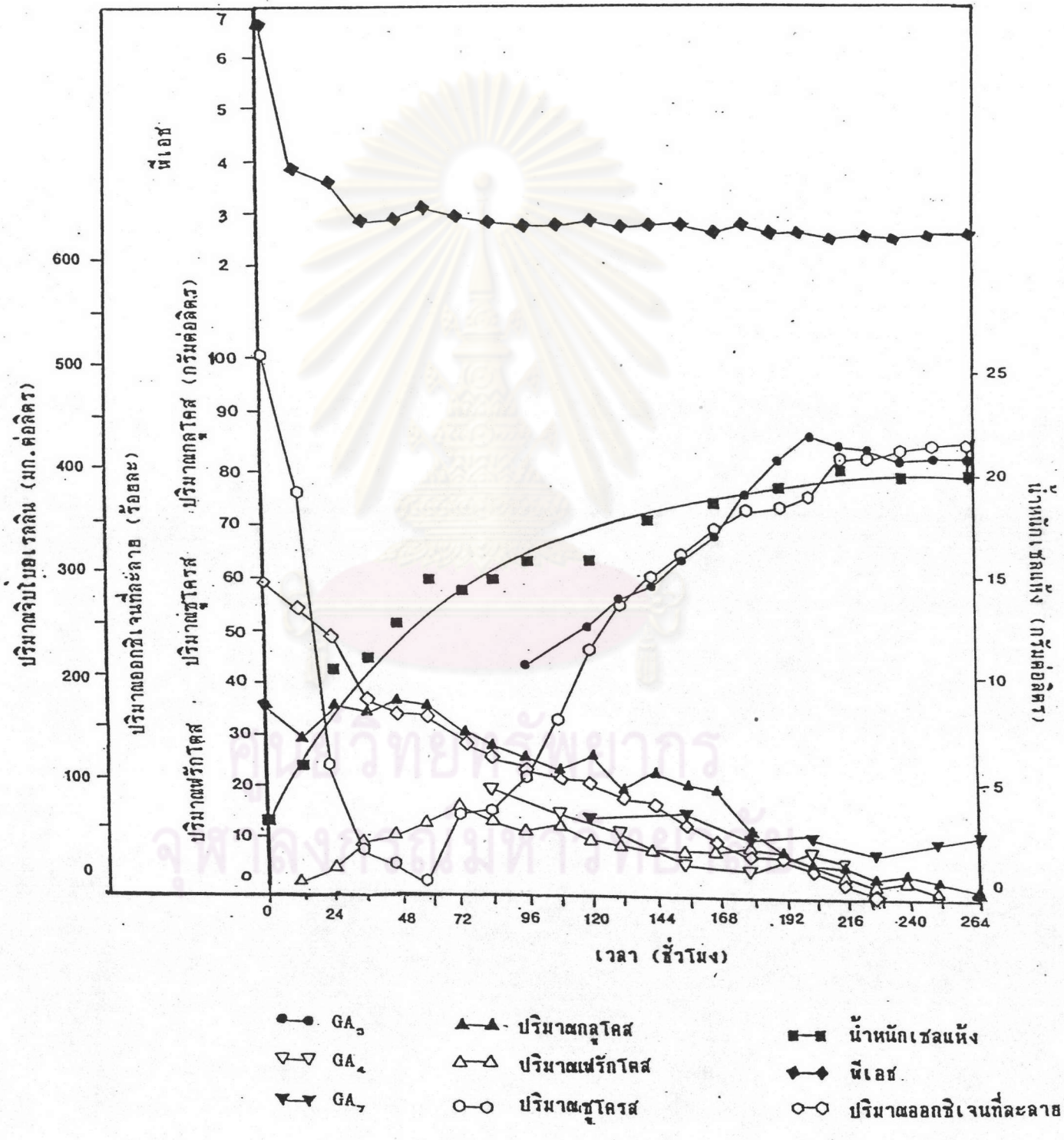
จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 21 ถึง 24 พบว่าสภาวะที่มีอัตราการกวนเท่ากันคือที่ 400 หรือ 500 รอบต่อนาที ถึงแม้จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่อัตราการกวนมีผลต่อปริมาณ GA_3 ที่ได้ กล่าวคือ ที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที จะให้ผล

ผลิต GA_3 สูงกว่าที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาทีประมาณ 100 มก.ต่อลิตร (ค่าเฉลี่ย GA_3 ที่ได้เมื่อใช้อัตราการกวน 400 และ 500 รอบต่อนาที ประมาณ 435 และ 526 มก.ต่อลิตร ตามลำดับ) ส่วนการผลิต GA_4 และ GA_7 พบว่าเชื้อที่เจริญในแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครสอย่างเดียว ในสภาวะที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิต GA_4 และ GA_7 ได้ 78 และ 169 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่า GA_4 และ GA_7 ที่ผลิตได้ในสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

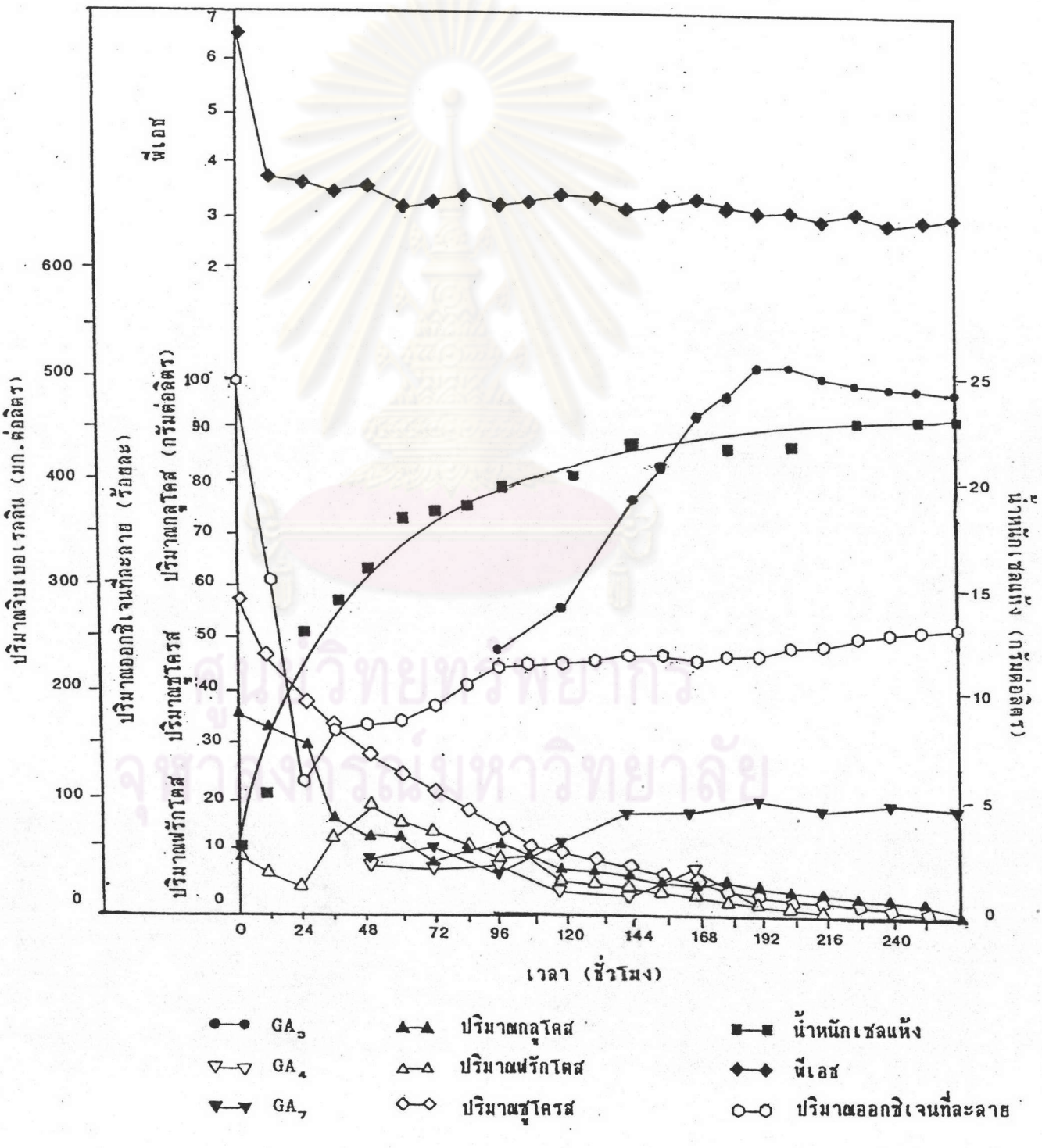
เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (ซึ่งปรับให้มีค่าเป็น 100 เปอร์เซนต์ในสภาวะเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง) กับการเจริญ จะพบว่าขณะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงมากโดยเฉพาะที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที มีปริมาณออกซิเจนเหลือประมาณร้อยละ 1 ส่วนที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที มีปริมาณออกซิเจนเหลือประมาณร้อยละ 25 โดยสภาวะที่มีอัตราการกวนดังกล่าว เชื้อสามารถเจริญและให้ปริมาณเซลสูงสุดประมาณ 20 และ 23 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แสดงว่าที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารอาจเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับการเจริญและการผลิตจิบเบอเรลลิน และเมื่อพิจารณาถึงการผลิต GA_3 ในสภาวะที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครสเป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาต่างๆของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้เชื้อยังสามารถผลิต GA_4 และ GA_7 ได้สูงกว่าสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย ดังนั้นจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส 100 กรัมต่อลิตร และอัตราการกวน 400 และ 500 รอบต่อนาที มาศึกษาสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมในถังหมัก 5 ลิตรต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

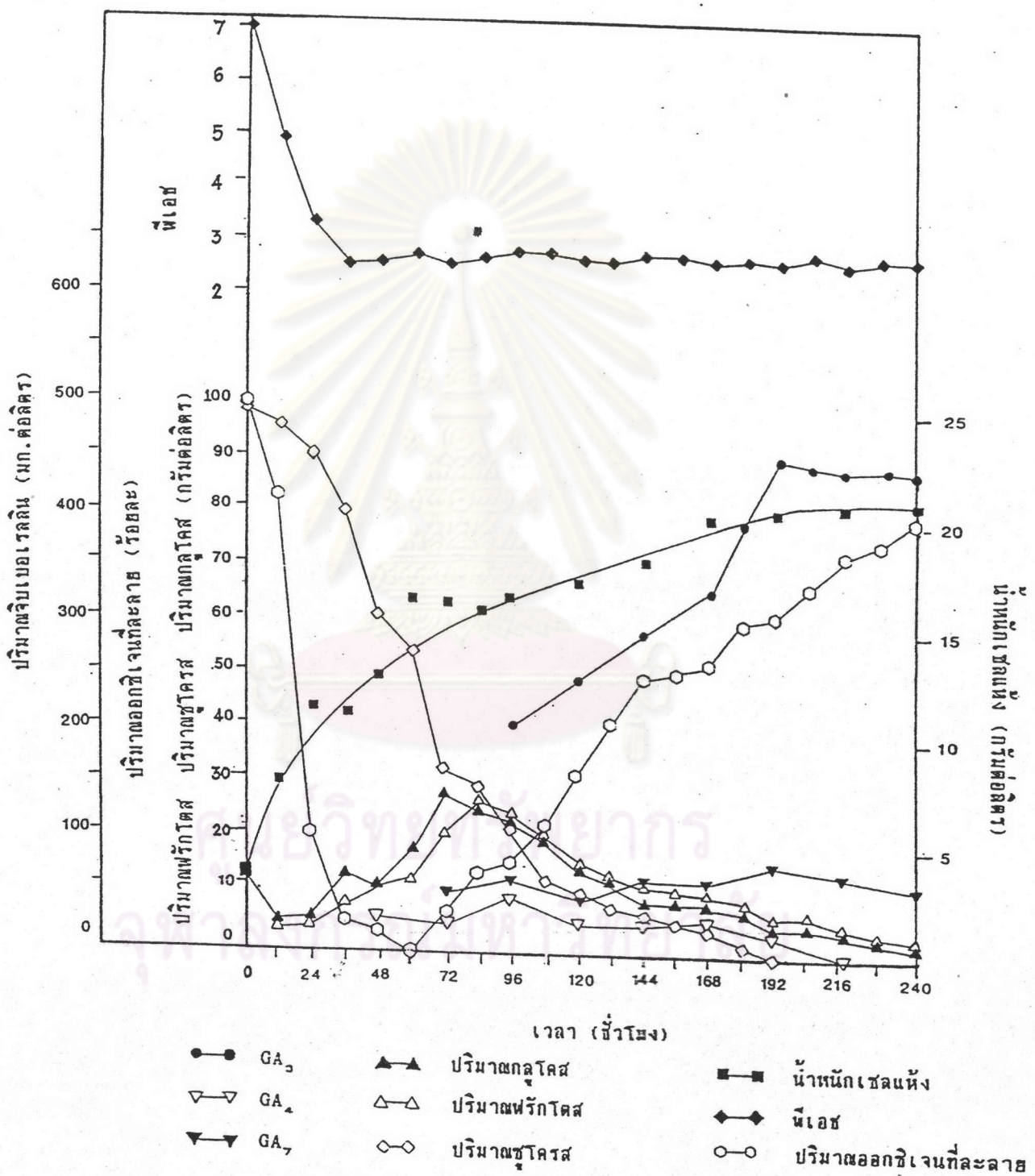
รูปที่ 21 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครส 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



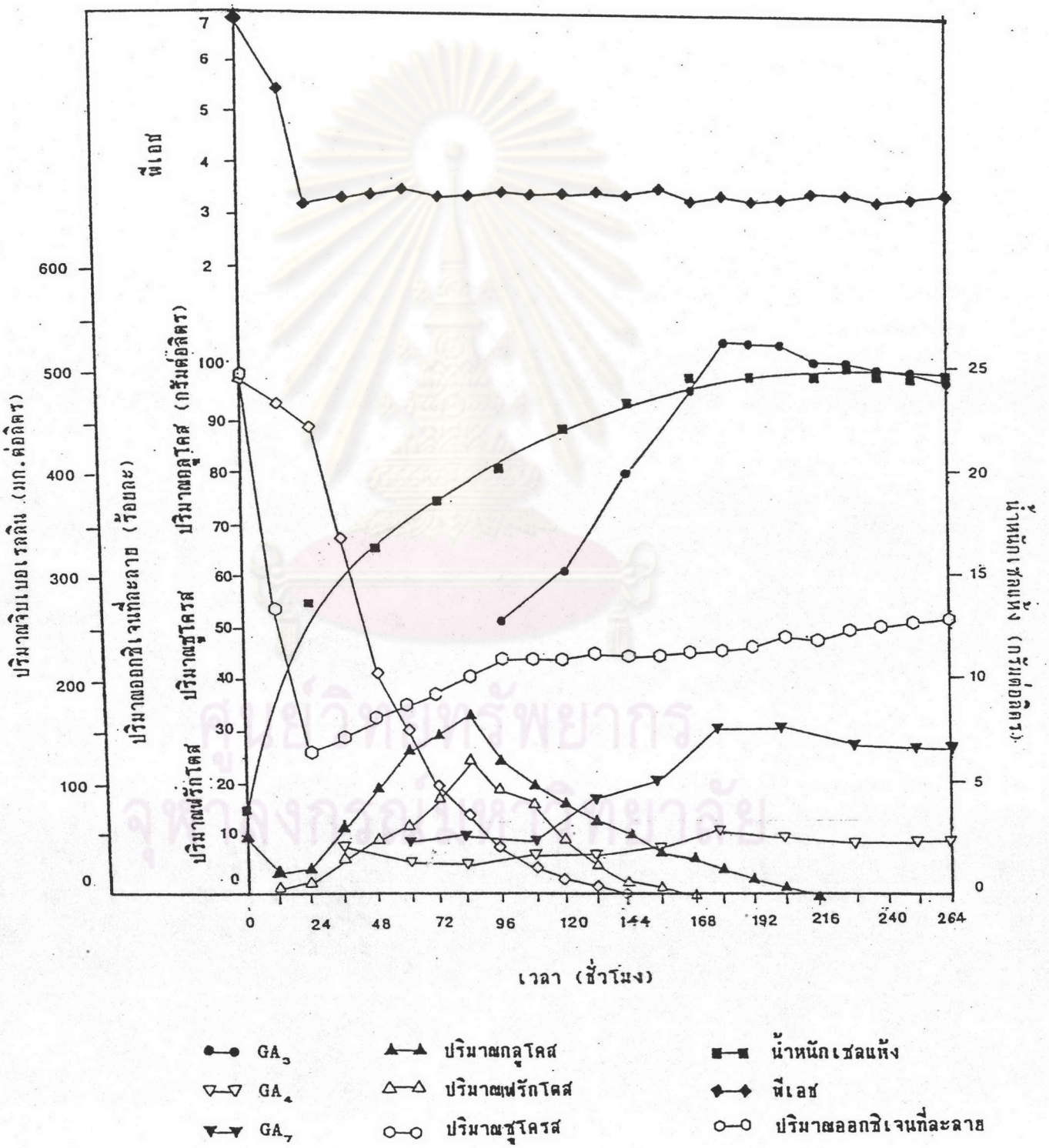
รูปที่ 22 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครส 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



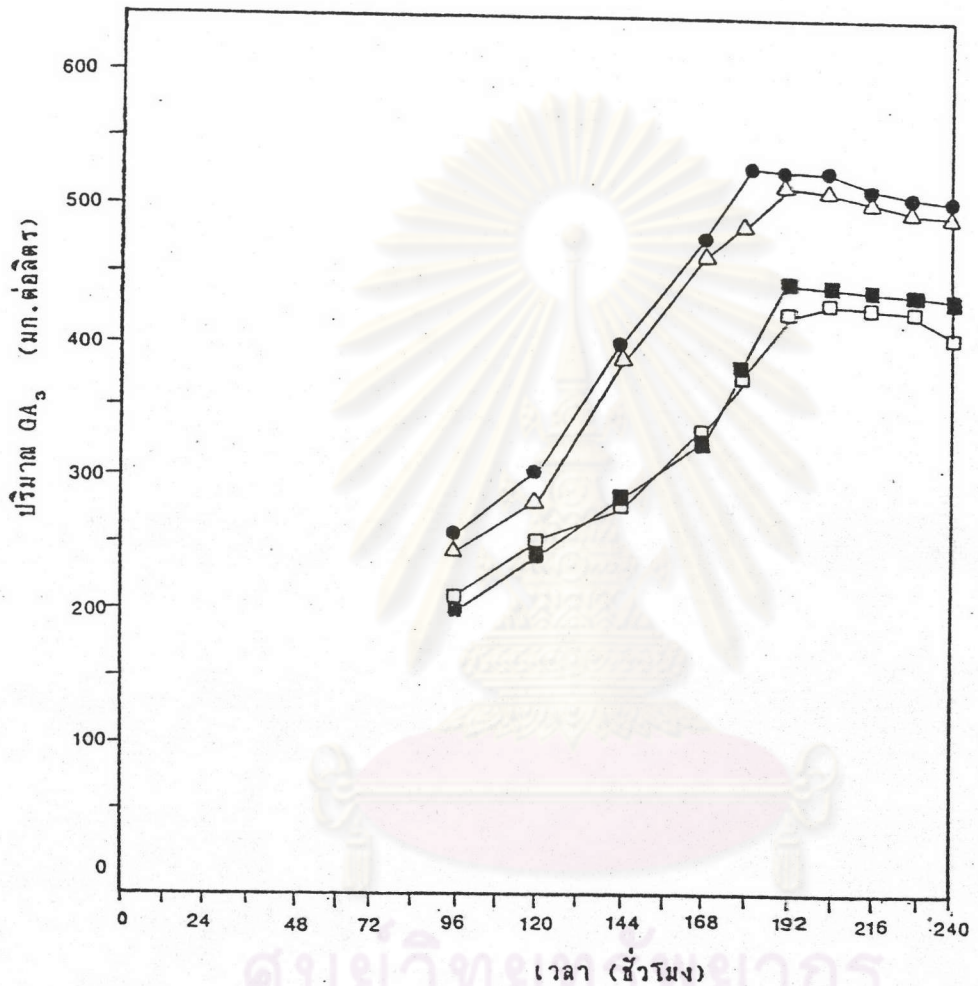
รูปที่ 23 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 24 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 25 เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 ที่ผลิตในระยะเวลาต่างๆกันของการเพาะเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผันแปรอัตราการกวนและชนิดของแหล่งคาร์บอน (สรุปจากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 21 ถึง 24)



□—□ แหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครส เป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร กับอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

■—■ แหล่งคาร์บอนที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตร กับอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

△—△ แหล่งคาร์บอนที่มีสัดส่วนของกลูโคสต่อซูโครส เป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร กับอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที

●—● แหล่งคาร์บอนที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตร กับอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆในถังหมัก เมื่อมีการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 ที่อัตราการกวน 400 และ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันแล้ว ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน และผันแปรแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสต่อซูโครส 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร กับแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเพียงชนิดเดียว

แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	* เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน(มก.ต่อลิตร)			
					GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
กลูโคสต่อซูโครส	400	204	3.1	19.3	436	30	132	598
40 ต่อ 60	500	192	3.2	22.5	523	41	125	690
ซูโครส	400	192	2.9	21.0	434	46	122	612
100	500	180	3.3	24.3	530	78	169	677

หมายเหตุ * เวลา (ชม.) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.11 ศึกษาผลของการเพิ่มอัตราการให้อากาศที่มีต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้ซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

จากผลการทดลองข้อ 3.6 พบว่าการผลิต GA_3 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C นั้น เป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจนสูง และปริมาณออกซิเจนที่มีในน้ำหมักนั้นขึ้นกับอัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส 100 กรัมต่อลิตร กับอัตราการกวนที่ 400 และ 500 รอบต่อนาที มาศึกษาผลของการเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ตามการทดลองที่ 3.10 เป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

เลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.4 โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส 100 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที กับอัตราการกวน 400 และ 500 รอบต่อนาที

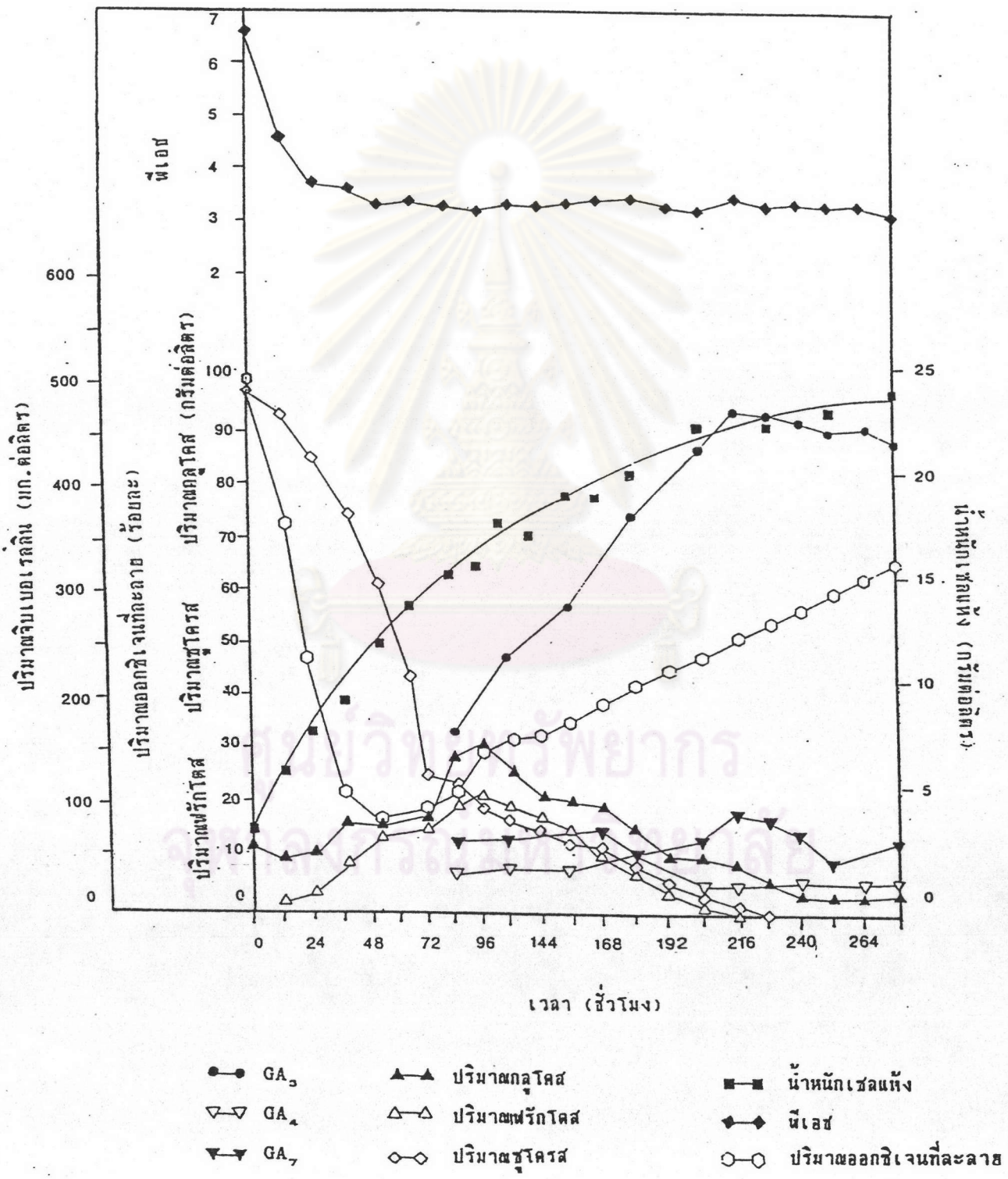
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 26 และ 27 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในรูปที่ 23 และ 24 พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และเปลี่ยนอัตราการให้อากาศจาก 1 เป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที จะทำให้ปริมาณ GA_3 ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น กล่าวคือ เชื้อผลิต GA_3 เพิ่มจากเดิมคือ 434 เป็น 450 มก.ต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อใช้สภาวะที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที เชื้อผลิต GA_3 ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ ผลิต GA_3 สูงสุดเป็น 530 และ 537 มก.ต่อลิตรตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 24 และ 27 ส่วนการผลิต GA_7 พบว่าสภาวะที่ใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที เชื้อสามารถผลิต GA_7 ได้สูงกว่าสภาวะที่มีอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที คือผลิตได้ 150 และ 85 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ส่วนการผลิต GA_4 นั้น การเพิ่มอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศไม่มีผลต่อการผลิต GA_4 ปริมาณ GA_4 ที่ได้ประมาณ 50 มก.ต่อลิตร ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (ซึ่งปรับให้มีค่าเป็น 100 เปอร์เซนต์ในสภาวะเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยง)กับการเจริญ พบว่าเมื่อใช้สภาวะที่มีอัตราการให้อากาศเป็น 1 หรือ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที และอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที ปริมาณออกซิเจนที่มีเหลืออยู่ต่ำสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นร้อยละ 25 และ 30 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อพิจารณาควบคู่กับปริมาณเซลแห้งสูงสุดและปริมาณ GA_3 ที่เชื้อผลิต

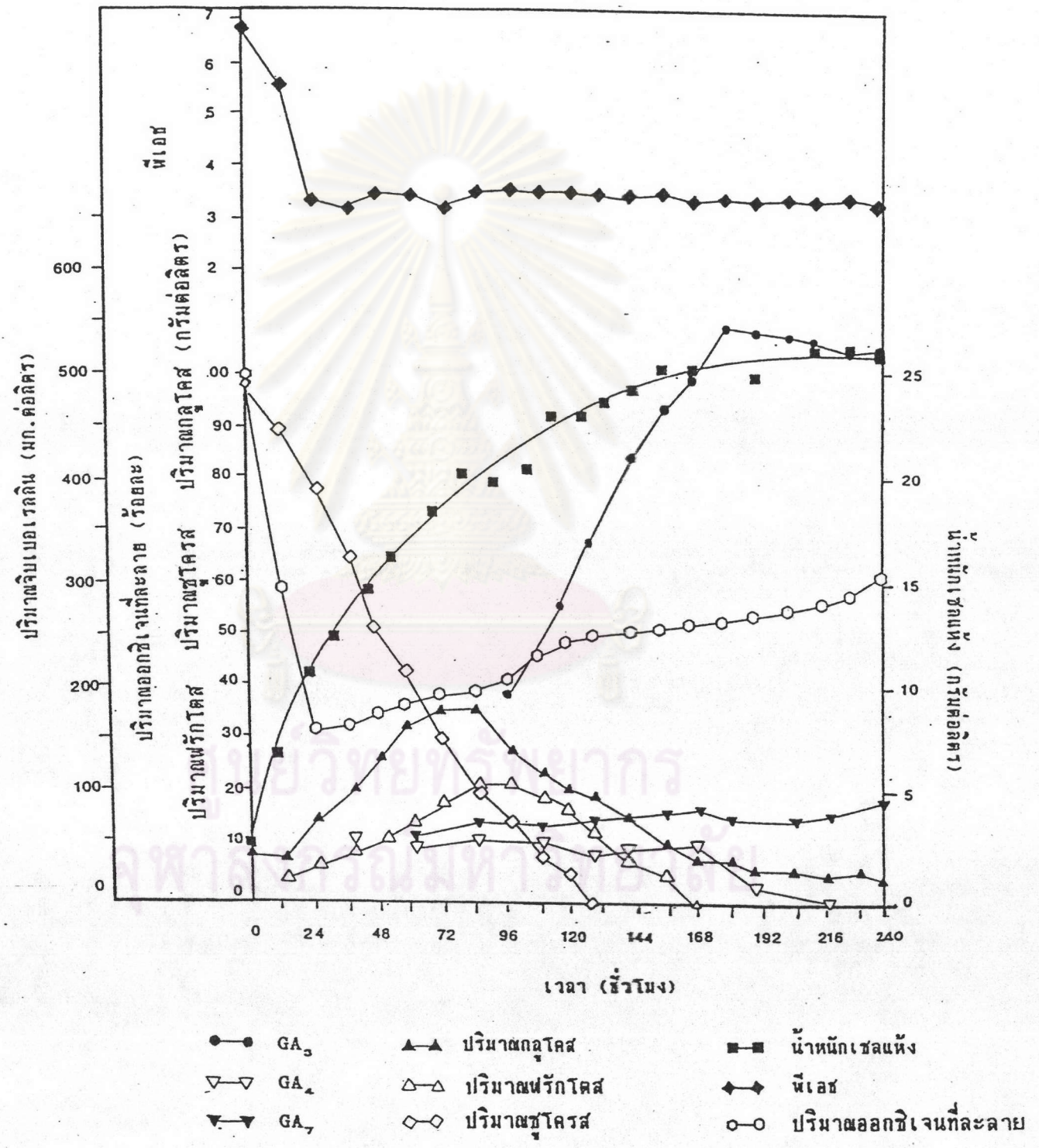
แล้ว (เมื่อใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1 และ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ได้ปริมาณเซลสูงสุดเป็น 24.3 และ 25.2 กรัมน้ำหนักเซลแห้งต่อลิตร ปริมาณ GA_3 ที่ได้สูงสุดเป็น 530 และ 537 มก.ต่อลิตรตามลำดับ) พบว่าปริมาณอากาศที่ให้และอัตราการกวนที่ใช้ดังกล่าวเป็นสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนเพียงพอ และไม่เป็นปัจจัยจำกัดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิต GA_3 และเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 28 ซึ่งสรุปจากรูปที่ 23 ถึง 27 จะพบว่าการเพิ่มอัตราการกวนจาก 400 เป็น 500 รอบต่อนาที จะเป็นสภาวะที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิต GA_3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1 เป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาทีที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ก็มีผลต่อการเพิ่มการผลิต GA_3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน แต่การเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1 เป็น 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที เชื้อผลิต GA_3 ได้ใกล้เคียงกัน คือ 530 และ 537 มก.ต่อลิตรตามลำดับ และสภาวะดังกล่าวเชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุด และแตกต่างจากสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สภาวะที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ยังเป็นสภาวะที่เชื้อสามารถผลิต GA_7 ได้สูงกว่าสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่ใช้อัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในการศึกษาขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

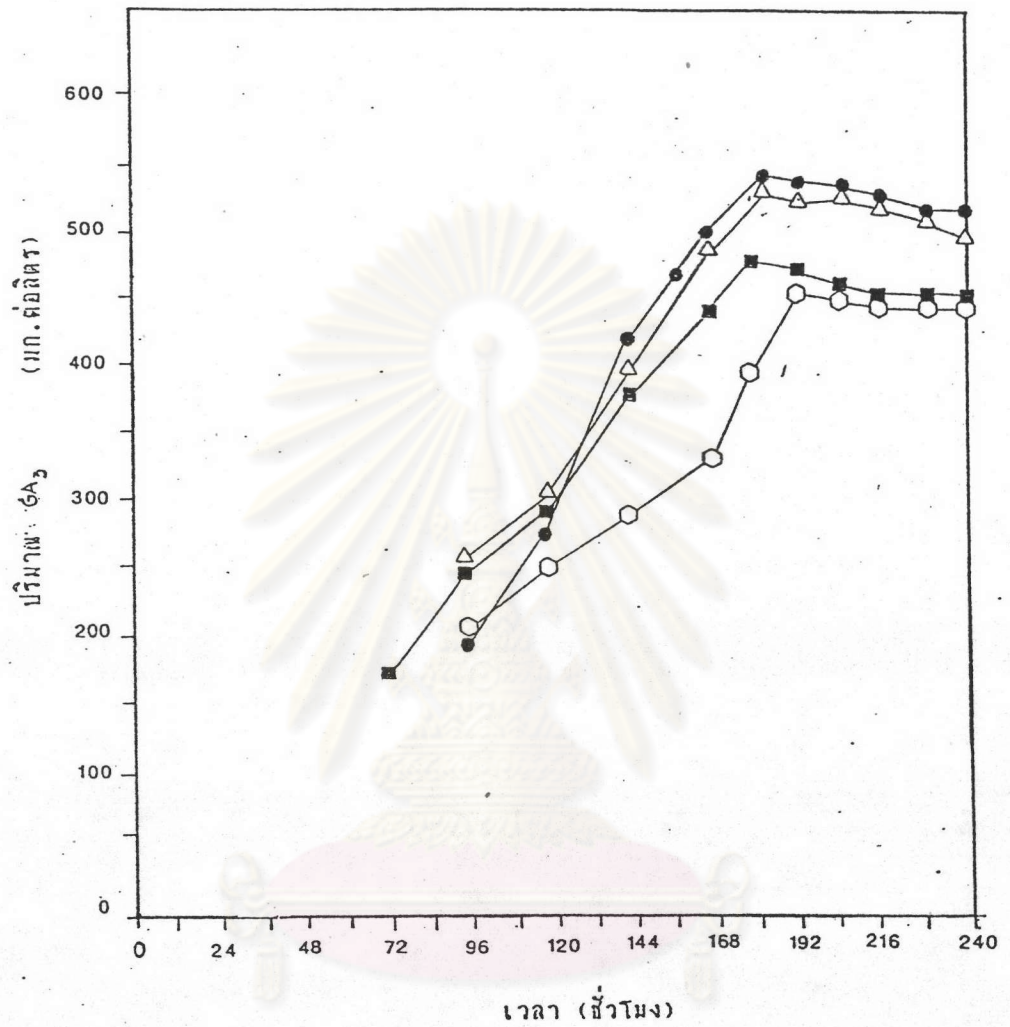
รูปที่ 26 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 27 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 28 เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 ที่ผลิตในระยะเวลาต่างๆกันของการเพาะเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อผันแปรอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ (สรุปจากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่25 ถึง 27)



○—○ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

■—■ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

△—△ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

●—● อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที กับอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที

ตารางที่ 12 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆในถังหมัก เมื่อมีการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 เพื่อผันแปรอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส 100 กรัมต่อลิตร

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการให้อากาศ (ลิตรต่อลิตรต่อนาที)	*เวลา (ชม.)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน(มก.ต่อลิตร)			
					GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
400	1	192	2.9	21.0	434	46	122	612
500	1	180	3.3	24.3	530	78	169	778
400	1.5	216	3.5	24.1	450	62	85	597
500	1.5	192	3.4	25.2	537	51	85	673

หมายเหตุ * เวลา (ชม.) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

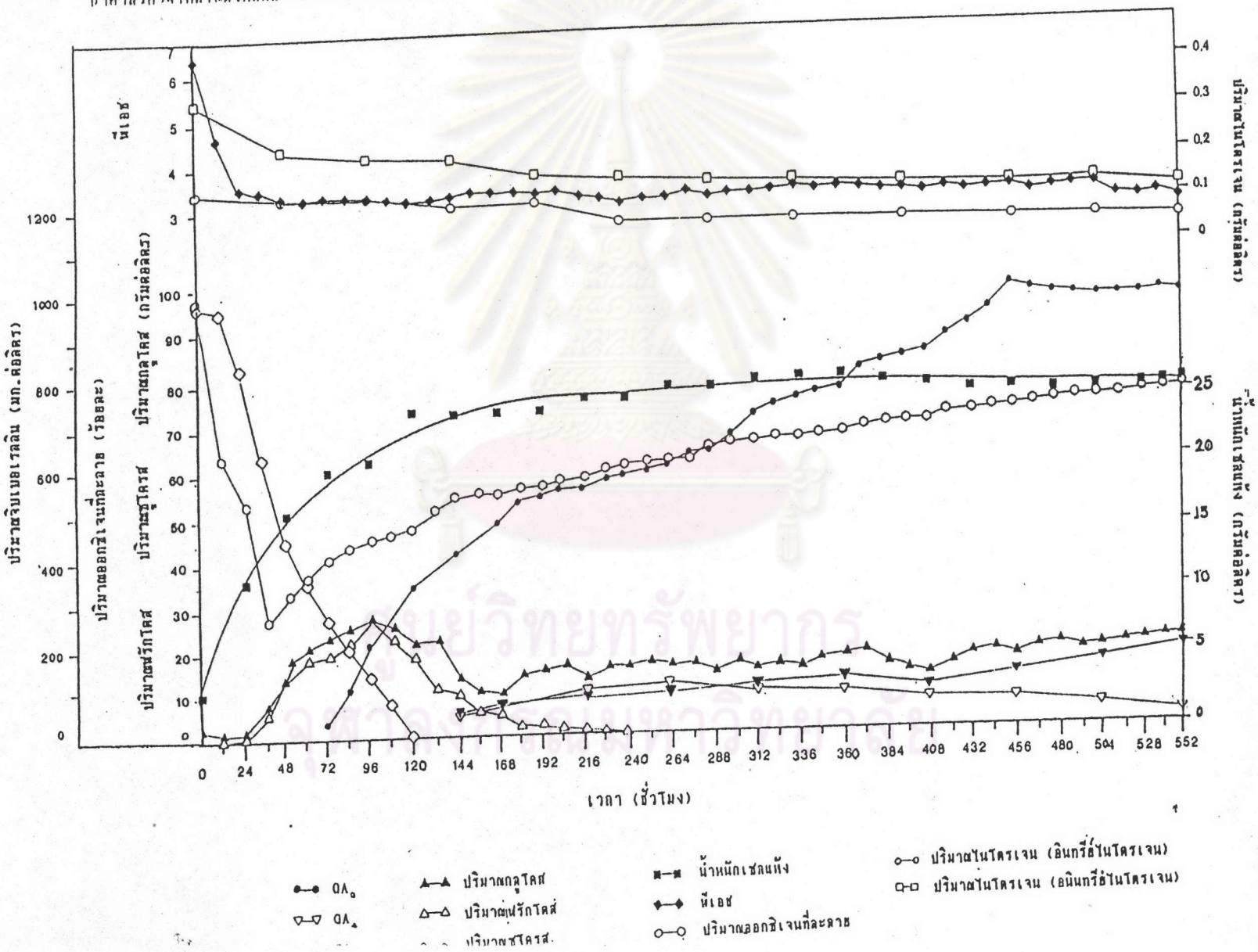
3.12 อิทธิพลของระดับน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อ Gibberella fujiuroi C

จากการทดลองในข้อ 3.10 รูปที่ 24 พบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วซึ่งมีปริมาณไนโตรเจน 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนในสภาวะที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที และมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °ซ คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง เชื้อผลิต GA_3 ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 530 มก.ต่อลิตรในชั่วโมงที่ 180 และมีแนวโน้มลดลงในเวลาต่อมา ในขณะที่ปริมาณ GA_3 ในถังหมักขึ้นสูงสุดนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักมีเหลือต่ำกว่า 6 กรัมต่อลิตร การที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์มีระดับต่ำเช่นนี้อาจเป็นข้อจำกัดของเชื้อในการผลิต GA_3 ให้เพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของระดับน้ำตาลรีดิวส์โดยการเติมสารละลายกลูโคสอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักเพิ่มขึ้นและคงไว้ในระดับต่างๆกัน ซึ่งสภาวะดังกล่าวอาจทำให้เชื้อสามารถผลิต GA_3 ต่อไปได้อีก

เลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมัก 5 ลิตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ ข้อ 2.2.3.4 โดยใช้ซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที และวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยการผันแปรปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เติมลงในถังหมักอย่างต่อเนื่อง เพื่อรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักเป็น 15 20 25 30 35 และ 45 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

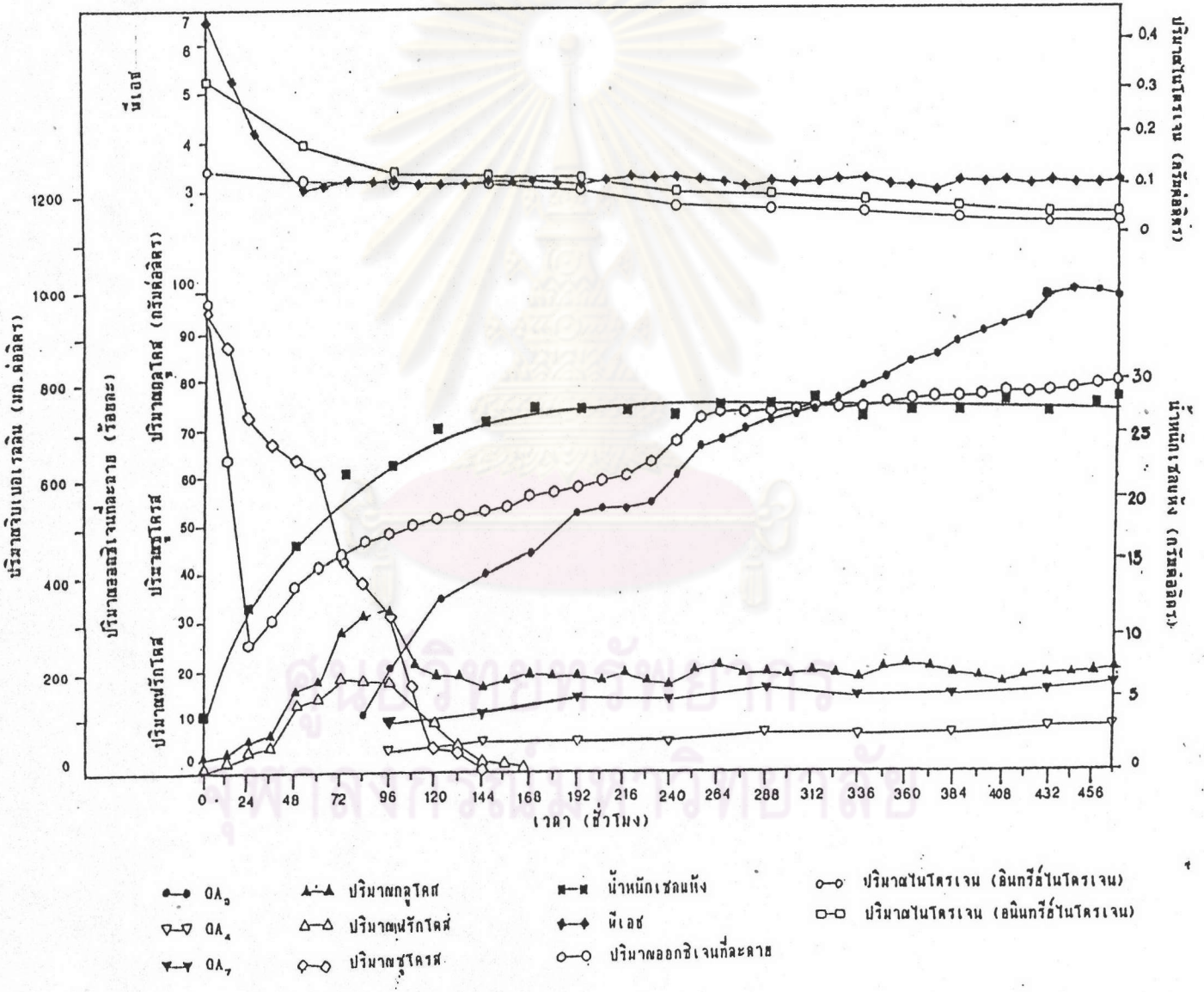
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 29 ถึง 34 พบว่าการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีอยู่ในถังหมักในปริมาณ 15 ถึง 45 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้เพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณ GA_3 อัตราการผลิต GA_3 และระยะเวลาที่เชื้อผลิต GA_3 ได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 13 (สรุปจากรูปที่ 29 ถึง 34) พบว่าสภาวะที่มีระดับน้ำตาลรีดิวส์ที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 คือสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ให้มีอยู่ในถังหมักประมาณ 25 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อผลิต GA_3 ได้สูงสุดประมาณ 1023 มก.ต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 348 และในสภาวะดังกล่าวนี้ยังพบว่าเชื้อผลิต GA_7 ได้สูงสุด คือได้ 210 มก.ต่อลิตร ซึ่งแตกต่างจากสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนปริมาณ GA_4 นั้น เชื้อผลิตได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักเป็น 20 มก.ต่อลิตร คือเชื้อสามารถผลิต GA_4 ได้สูงสุด 80 มก.ต่อลิตร และแตกต่างจากสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 25 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 162 จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ในการศึกษาขั้นต่อไป

รูปที่ 29 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการกวนคุนระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 15 กรัมต่อลิตร

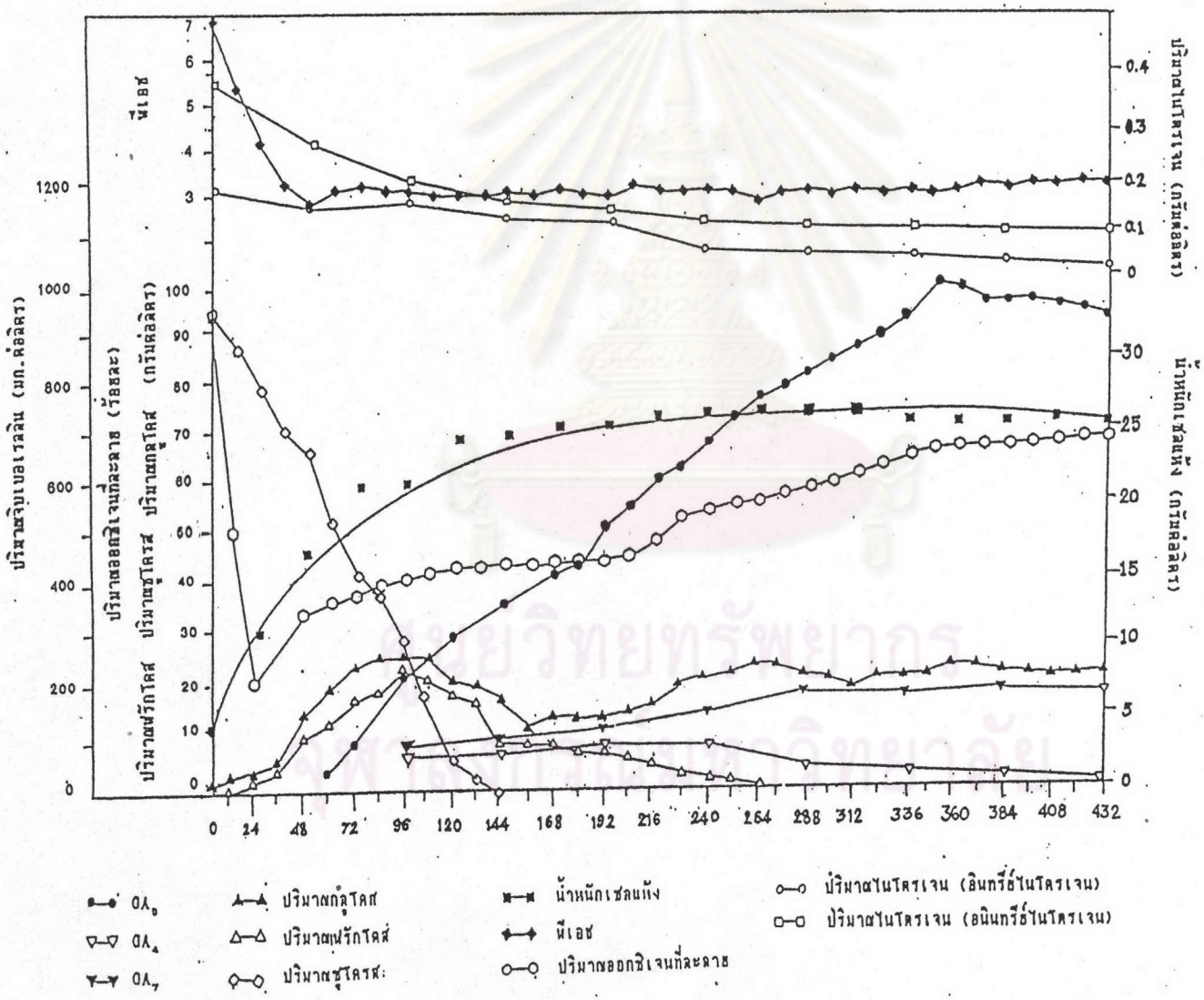


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

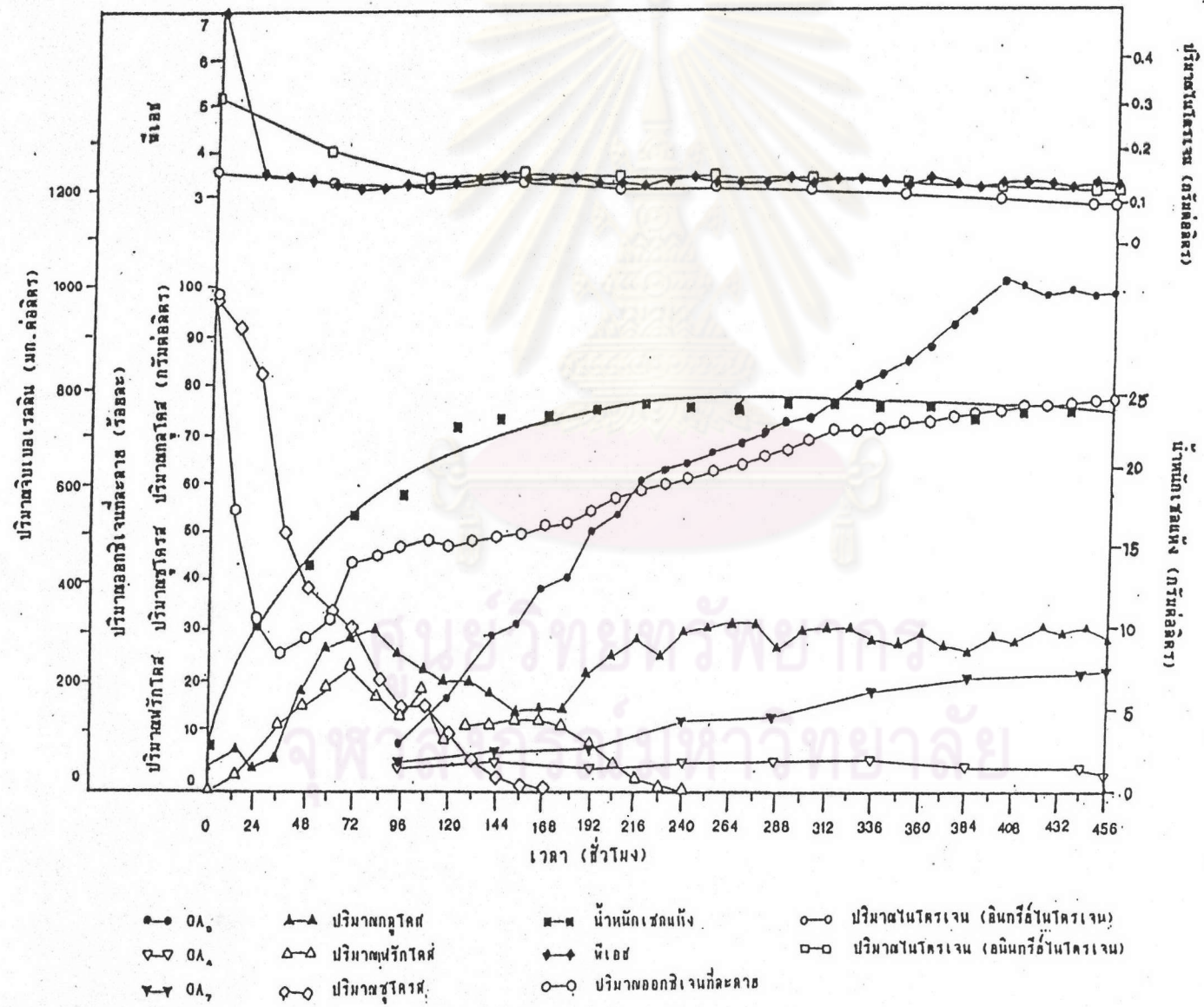
รูปที่ 30 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 20 กรัมต่อลิตร



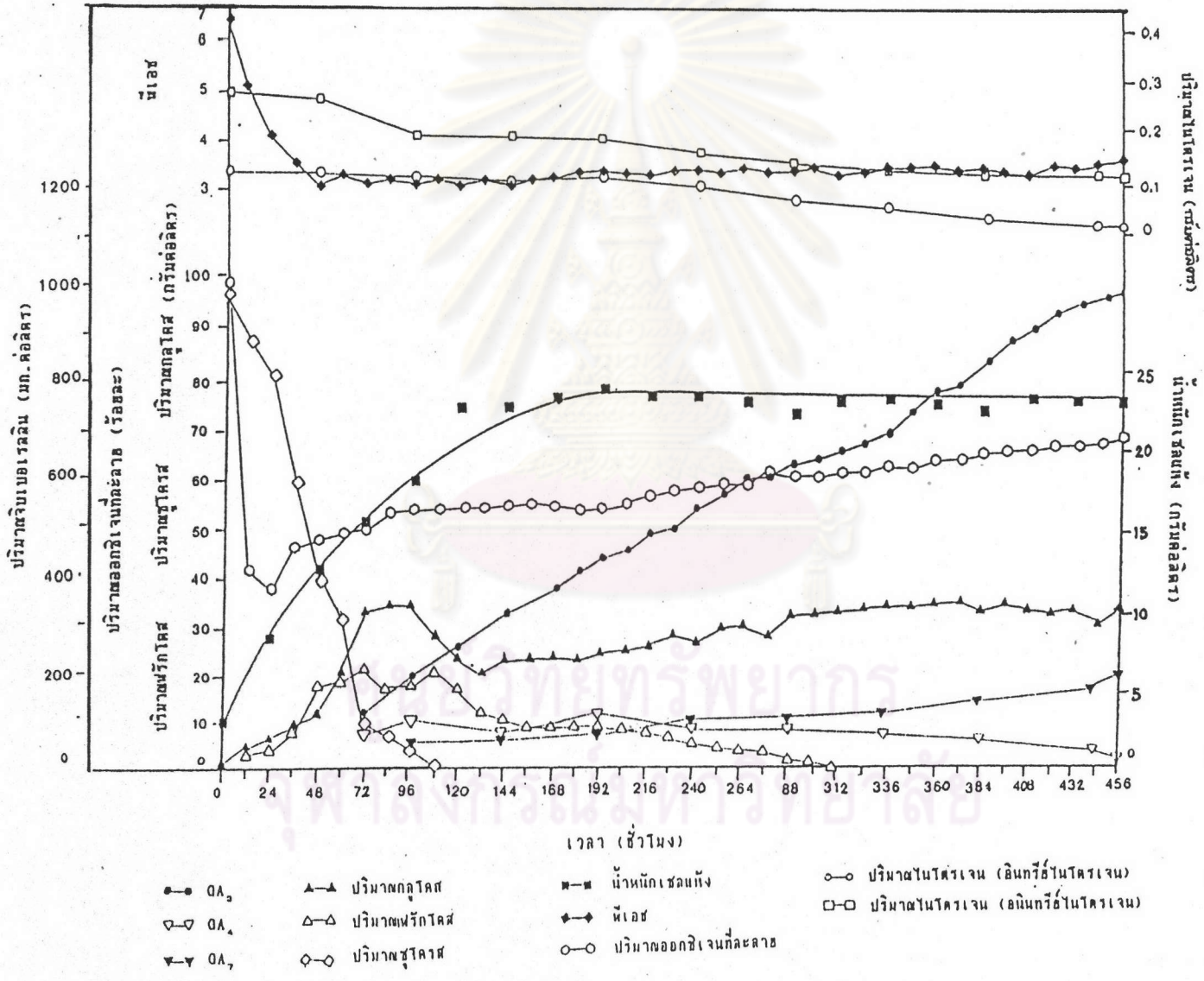
รูปที่ 31 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 25 กรัมต่อลิตร



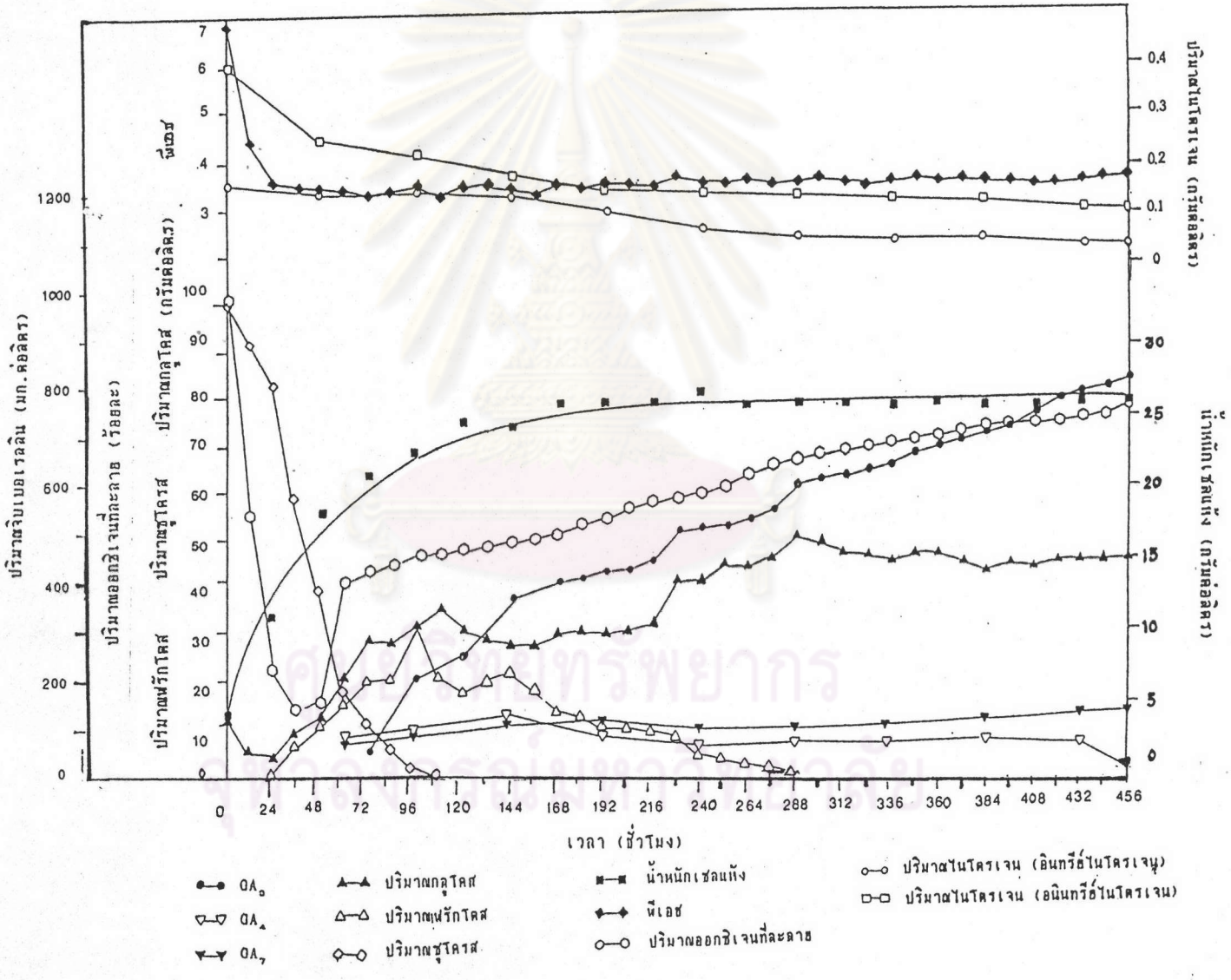
รูปที่ 32 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 30 กรัมต่อลิตร



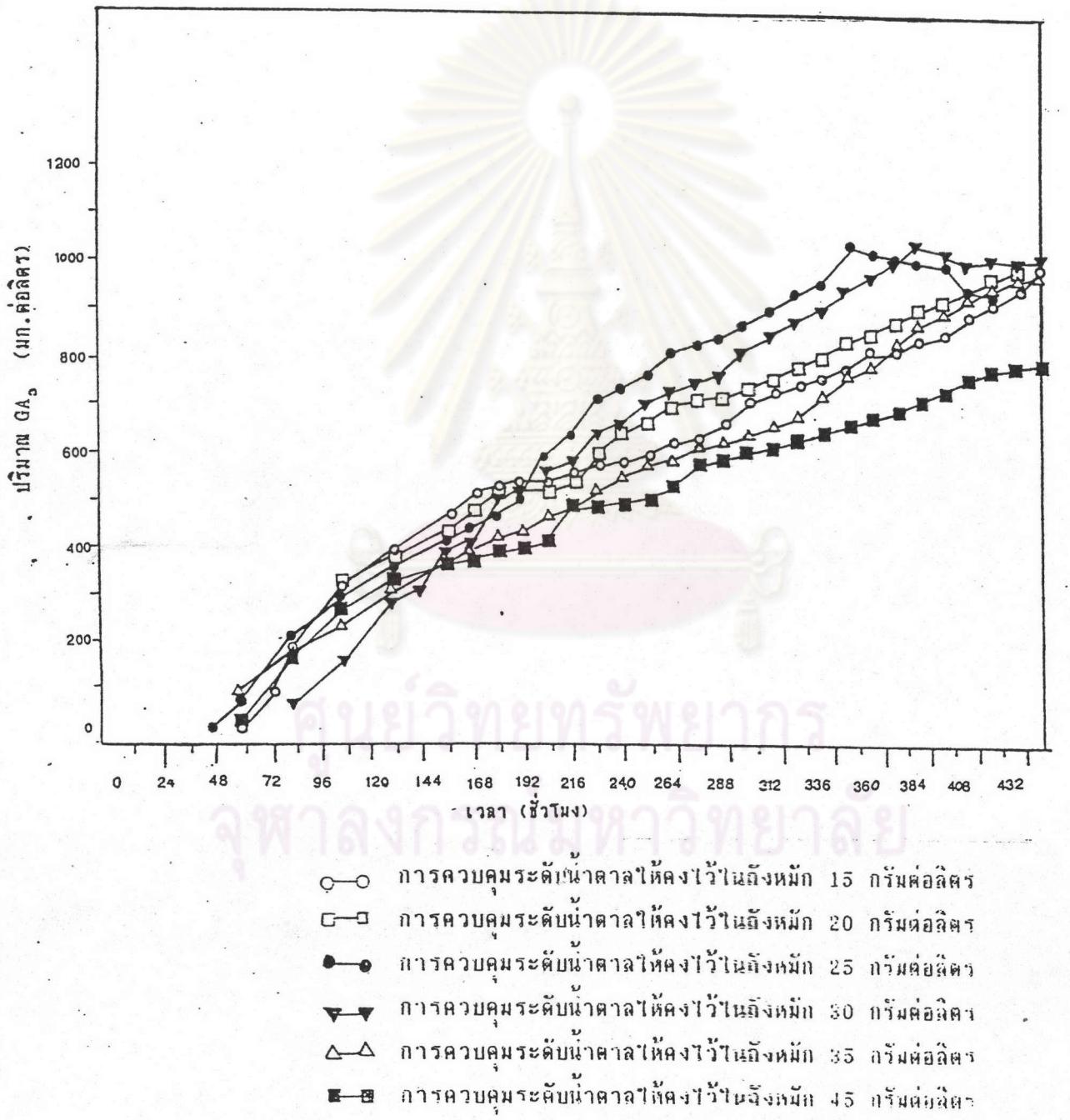
รูปที่ 33 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 35 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 34 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 45 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 35 เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 ที่ผลิตในระยะเวลาต่างๆกันของการเพาะเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อควบคุมปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักให้อยู่ในระดับต่างๆกัน ตั้งแต่ 15 ถึง 45 กรัมต่อลิตร (สรุปจากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 29 ถึง 34)



ตารางที่ 13 แสดงการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆในถังหมัก เมื่อมีการเจริญของ Gibberella fujikuroi C เมื่อผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักต่างๆกัน เมื่อใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน

ระดับน้ำตาลรีดิวส์ที่ควบคุมให้มีในถังหมัก(กรัมต่อลิตร)	*เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต GA_3 (มก.ต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
					GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
15	456	3.4	26.5	1.66	1009	52	120	1181
20	432	3.5	25.5	1.85	1009	80	180	1269
25	348	3.4	25.5	3.10	1023	48	210	1281
30	396	3.4	26.0	3.01	1044	51	180	1275
35	456	3.5	26.0	2.13	983	22	111	1116
45	456	3.4	25.5	1.50	820	21	122	963

หมายเหตุ * เวลา (ชม.) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.13 ศึกษาผลของการควบคุมความเป็นกรดด่างตลอดการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากรายงานของ Borrow และคณะ (23) พบว่าการควบคุมความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าอยู่ในช่วง 3 ถึง 5 นั้น เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับเชื้อในการผลิต GA_3 งานวิจัยนี้ จึงได้เลือกศึกษาผลการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 4 และ 5 ตลอดการเพาะเลี้ยง ต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C

เลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.4 โดยใช้ซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที เติมสารละลายกลูโคส เพื่อรักษาระดับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงไว้ประมาณ 25 กรัมต่อลิตร และวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยการผันแปรการควบคุมความเป็นกรดด่างตลอดการเพาะเลี้ยงเป็น 3 4 และ 5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 10 หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 ตามลำดับ

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5 คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง จะมีการเปลี่ยนแปลงสีของน้ำหมักเป็นสีแดงภายใน 2 วัน และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีม่วงในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และจะเป็นสีม่วงเข้มขึ้นในเวลาต่อมา ส่วนกรณีของการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 นั้น สีของน้ำหมักจะมีการเปลี่ยนคล้ายกับกรณีที่ควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5 แต่การเปลี่ยนเป็นสีม่วงจะช้ากว่า คือเปลี่ยนในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในถังหมักที่มีการเพาะเลี้ยงโดยการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 นั้น สีของน้ำหมักจะเป็นสีชมพูอ่อน และไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง

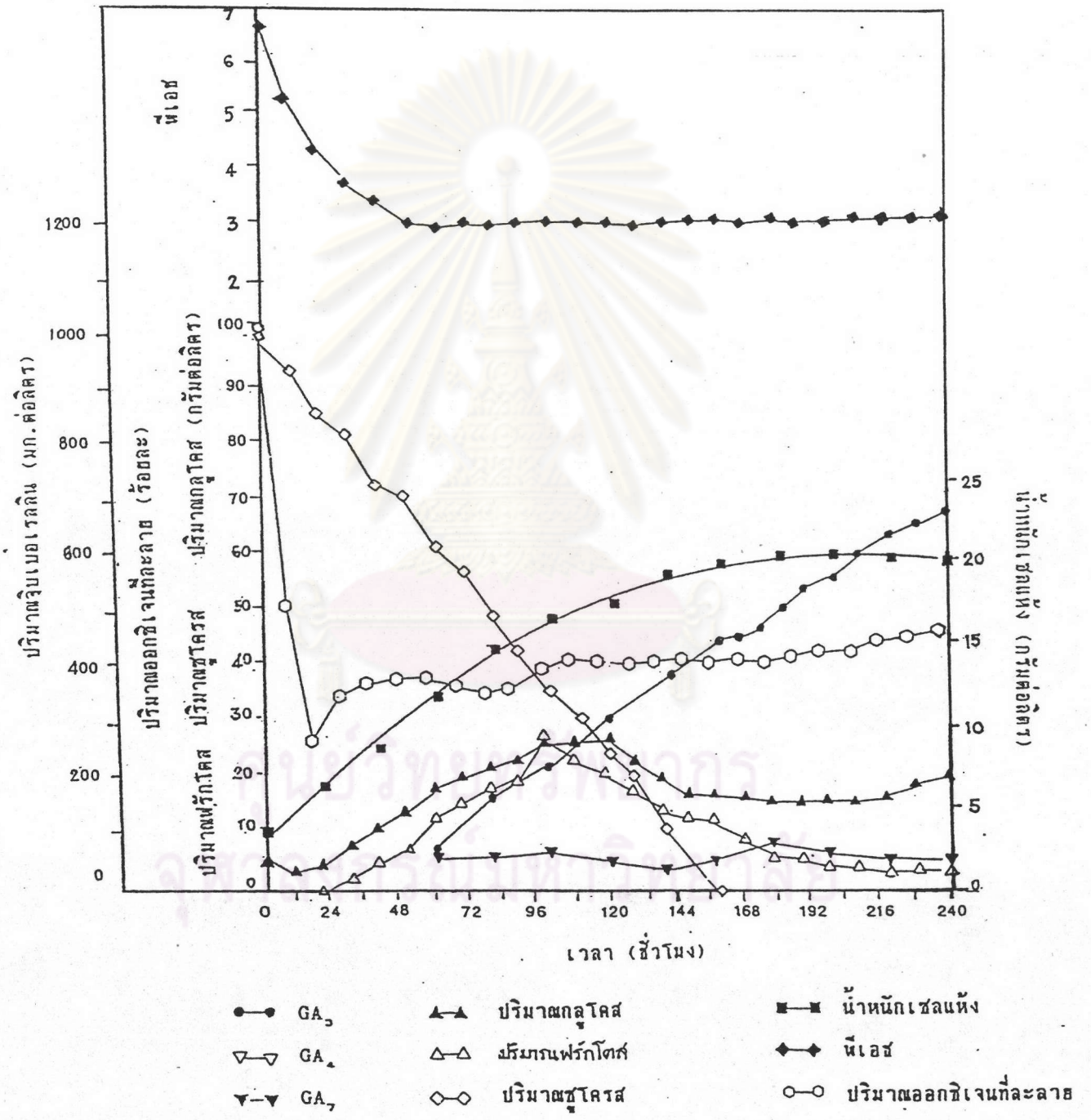
เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ที่เชื้อผลิต ดังแสดงในรูปที่ 37 และ 38 พบว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงนั้น เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้น้อยกว่า ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณร้อยละ 48 และ 71 ตามลำดับ ในขณะที่การผลิต GA_4 และ GA_7 นั้น จะพบว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 นั้น เชื้อสามารถผลิต GA_4 และ GA_7 ได้มากกว่า และให้ค่าที่แตกต่างจากสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อพิจารณาถึงผลของการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 คงที่ตลอดของการเพาะเลี้ยง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ต่อการผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C พบว่าเชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้ไม่แตกต่างจากสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ แต่สภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 นั้น ตรวจไม่พบการผลิต GA_4 ส่วนการผลิต GA_7 นั้น พบว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 เชื้อผลิต GA_7 ได้น้อยกว่าสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง และสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 ประมาณร้อยละ 70 69 และ 79 ตามลำดับ

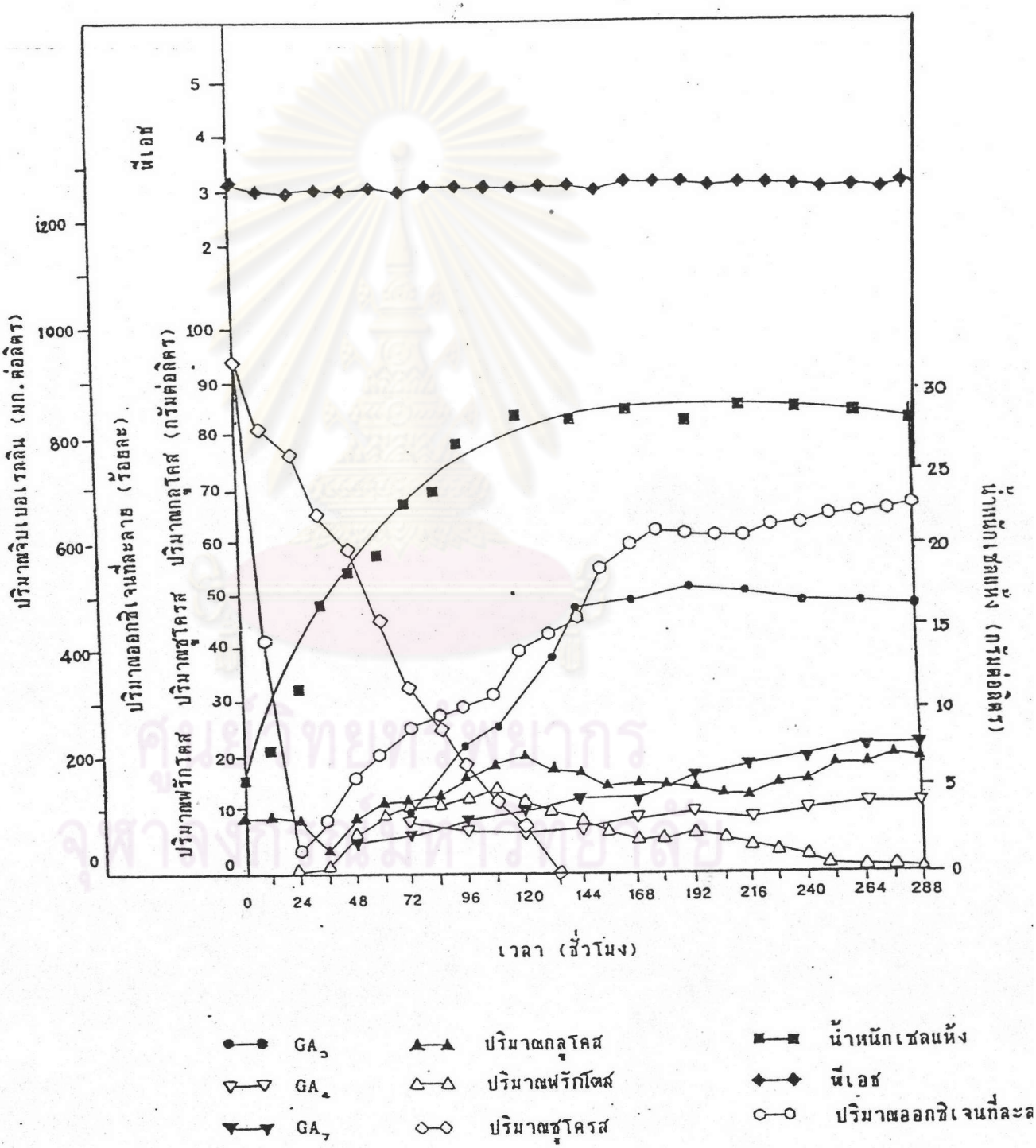
จากผลสรุปในตารางที่ 14 พบว่าสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้ไม่แตกต่างจากสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 และสามารถผลิต GA_3 สูงกว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 ประมาณร้อยละ 93 และ 246 ตามลำดับ แม้ว่าปริมาณ GA_4 ที่ได้จะมีปริมาณน้อยกว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 ประมาณร้อยละ 60 และ 69 ตามลำดับก็ตาม ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างตลอดการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน ในการศึกษาขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

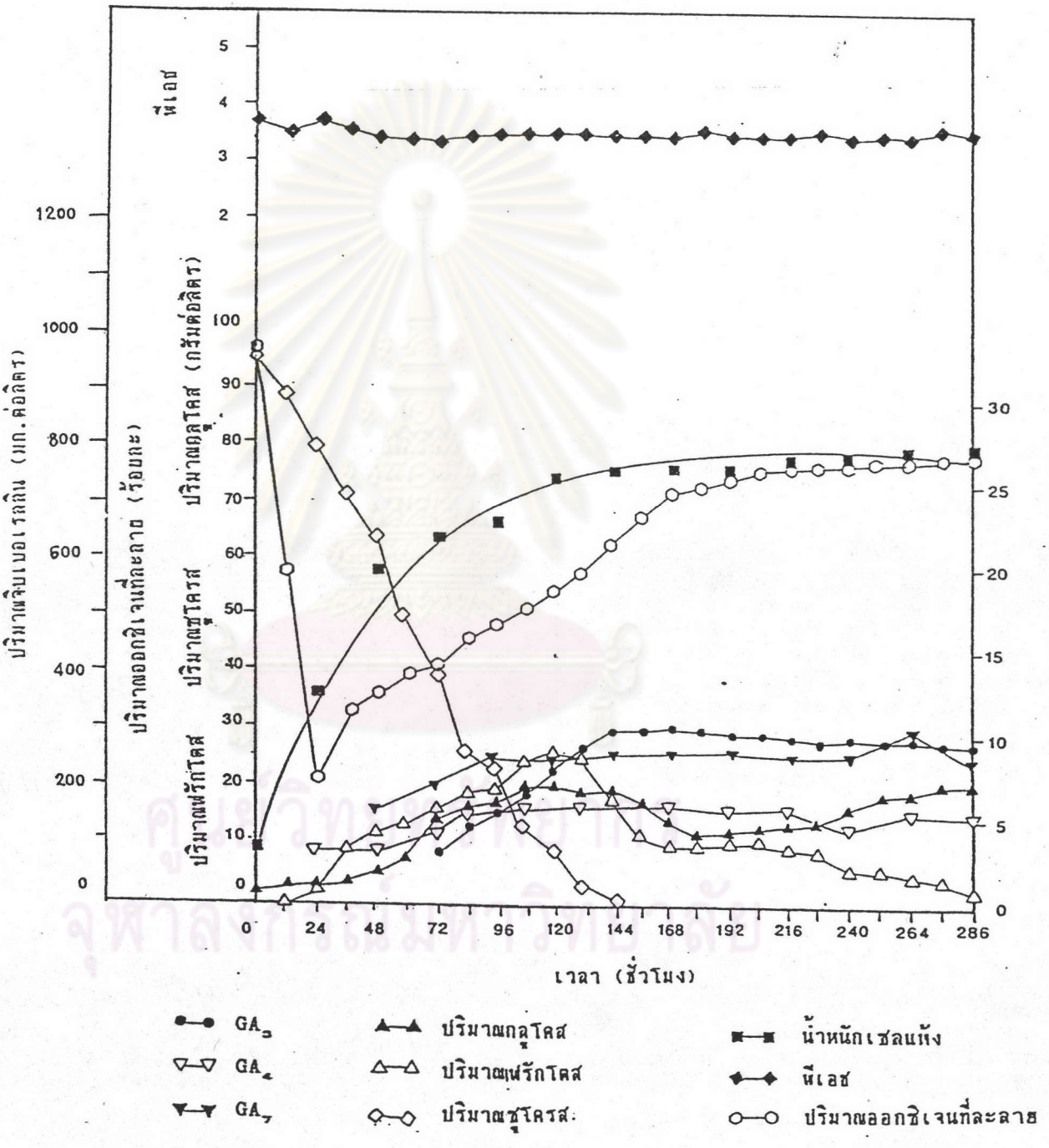
รูปที่ 36 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 37 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 ตลอดการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 38. แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักเซลแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ในระยะเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 5 ตลอดการเพาะเลี้ยง



ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) ที่ผลิตได้ ปริมาณเซล (น้ำหนักเซลแห้ง) เมื่อมีการควบคุมความเป็นกรดด่างตลอดการเพาะเลี้ยงที่ 3 4 และ 5 กับสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยง (ซึ่งได้ข้อมูลจากการทดลองข้อ 3.12)

ความเป็นกรดที่ควบคุม	*เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง	348	25.5	1023	48	210	1281
3	240	20.1	680	-	62	742
4	192	28.5	529	119	198	846
5	144	27.1	295	156	289	740

หมายเหตุ * เวลา(ชั่วโมง) หมายถึงระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

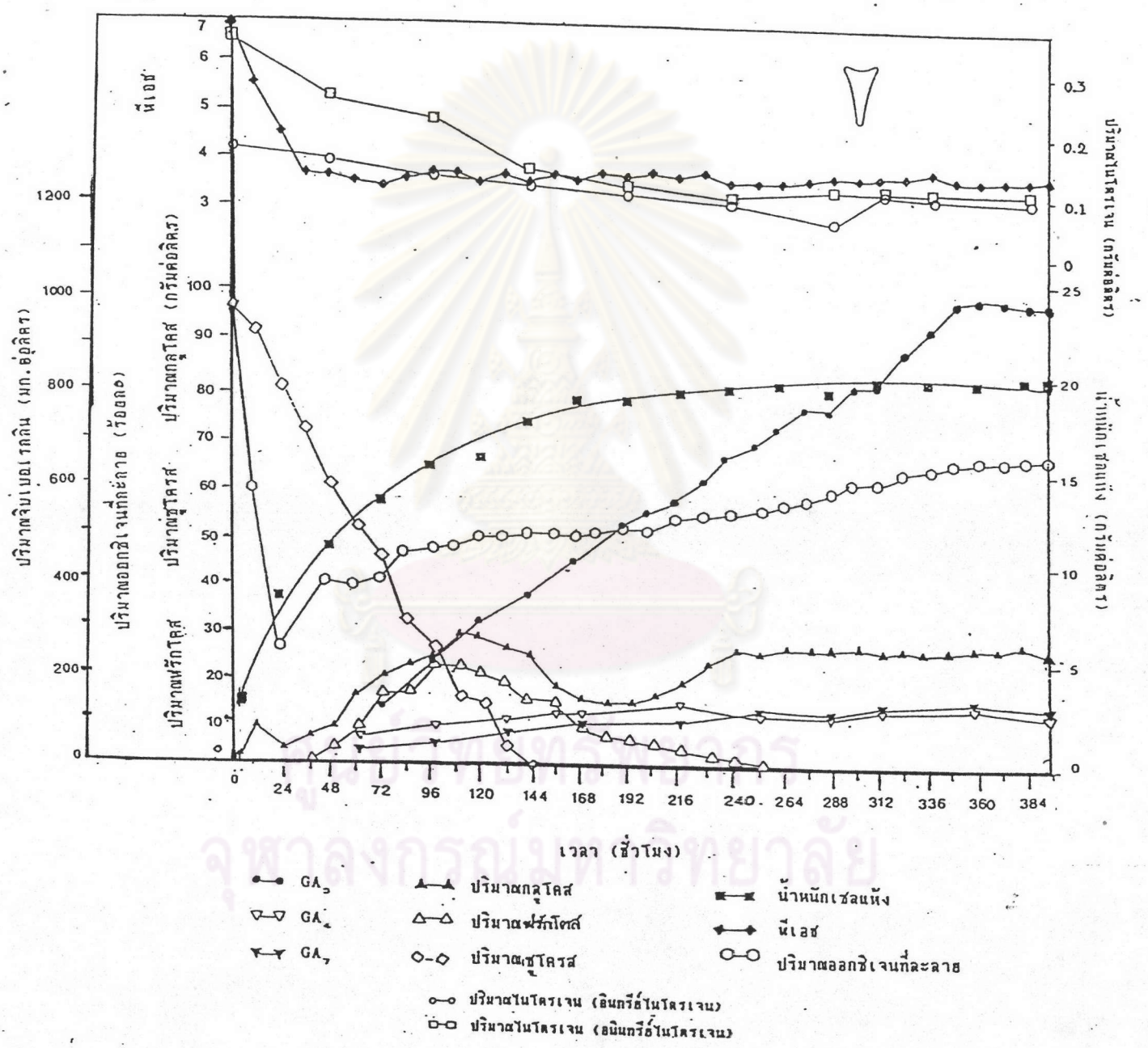
3.14 ศึกษาผลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน(GA_3 GA_4 และ GA_7) โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 31 พบว่าปริมาณ GA_3 สูงสุดที่เชื้อรา Gibberella fujikuroi C ผลิตได้เป็น 1023 มก.ต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 348 หลังจากนั้น จะพบว่าปริมาณ GA_3 ที่ได้เริ่มลดลง ทั้งที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักประมาณ 25 กรัมต่อลิตร และในช่วงที่เชื้อผลิต GA_3 สูงสุด มีปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่ในถังหมักประมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเป็นปัจจัยจำกัดในการผลิต GA_3 ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงผลการผลิต GA_3 ของเชื้อ Gibberella fujikuroi C เมื่อเติมสารละลายสกัดจากยีสต์ ซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว ยังเป็นแหล่งอาหารเสริมอื่นๆ

เลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตรตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.4 โดยใช้ซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที กับมีการเติมสารละลายกลูโคสเพื่อให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 25 กรัมต่อลิตรตั้งแต่ชั่วโมงที่ 162 จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และมีการเติมสารละลายของสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 มล. (ซึ่งจะทำให้ปริมาณไนโตรเจนในถังหมักเพิ่มขึ้น ประมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร) ในชั่วโมงที่ 300

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 39 และตารางที่ 15 พบว่าการเติมสารละลายของสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 10 มล. ในชั่วโมงที่ 300 ซึ่งเป็นช่วงก่อนที่เชื้อจะผลิต GA_3 ได้สูงสุดนั้น ไม่มีผลทำให้เชื้อผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากสภาวะที่ไม่มีการเติมสารละลายของสารสกัดจากยีสต์ เมื่อพิจารณาการผลิต GA_4 พบว่าเชื้อสามารถผลิต GA_4 เพิ่มขึ้นจากสภาวะที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ทุกช่วงเวลาของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ปริมาณ GA_7 เชื้อมีการผลิต GA_7 ลดลงจากสภาวะที่ไม่ได้เติมสารละลายสกัดจากยีสต์ และจากตารางที่ 15 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจนได้ปริมาณ GA_3 สูงสุดแล้ว สภาวะที่ไม่มีการเติมสารละลายสกัดจากยีสต์ เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้ไม่แตกต่างจากสภาวะที่มีการเติมสารละลายสกัดจากยีสต์ประมาณร้อยละ 50 ในขณะที่สภาวะที่มีการเติมสารละลายสกัดจากยีสต์ เชื้อสามารถผลิต GA_4 ได้ 120 มก.ต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสภาวะที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ประมาณร้อยละ 125 แต่เมื่อพิจารณาปริมาณ GA_3 พบว่าสารละลายสกัดจากยีสต์ที่เติมไม่สามารถทำให้เชื้อสามารถผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นได้ ดังนั้นปริมาณไนโตรเจนที่มีเหลือในถังหมัก จึงไม่ได้เป็นข้อจำกัดของการเพิ่มปริมาณ GA_3 ที่ผลิต โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

รูปที่ 39 แสดงการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C (น้ำหนักแห้ง) ผลผลิตของจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) และการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในสภาวะที่มีการเติมสารละลายของสารสกัดจากยีสต์ ในชั่วโมงที่ 300



ตารางที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) ที่ผลิตได้ ปริมาณเซล (น้ำหนักเซลแห้ง) เมื่อมีการเติมสารละลายสกัดจากยีสต์ในชั่วโมงที่ 300 กับสภาวะที่ไม่มีการเติมสารละลายสกัดจากยีสต์ (ข้อมูลจากการทดลองข้อ 3.12 รูปที่ 31)

ปริมาตรสารละลายสกัดจากยีสต์ที่เติม (มล.)	* เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
0	348	25.5	1023	48	200	1271
10	360	26.5	1001	120	140	1261

หมายเหตุ *เวลา(ชั่วโมง) หมายถึง ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.15 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในวันที่ 3 8 13 16 และ 19

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 3.11 3.12 และ 3.13 พบว่าปริมาณออกซิเจน ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ และความเป็นกรดด่างในน้ำหมักระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น ต่างเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญและมีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลินทั้งสิ้นและจากผลการทดลองที่ได้รายงานไว้แล้ว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน GA_3 คือสภาวะที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที กับมีการเติมสารละลายกลูโคสเพื่อรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักให้มีความเข้มข้นประมาณ 25 กรัมต่อลิตร และไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง ซึ่งสภาวะดังกล่าว เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุด 1023 มก.ต่อลิตรในชั่วโมงที่ 348 หลังจากนั้นจะพบว่าปริมาณ GA_3 ที่ได้มีแนวโน้มลดลงถึงแม้จะมีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวอยู่ นอกจากนี้การเติมสารสกัดจากยีสต์ในชั่วโมงที่ 300 ก็มิได้ทำให้เชื้อผลิต GA_3 เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะยีดจำกัดของเชื้อ หรืออาจเกิดจากสารต่างๆในน้ำหมักที่เชื้อผลิตขึ้นมีผลทำให้เชื้อไม่สามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้มากกว่านี้อีก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ตรวจสอบประสิทธิภาพของเซลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 3 8 13 16 และ 19 วันตามลำดับ

เลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3.4 โดยใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที เติมสารละลายกลูโคส เพื่อรักษาระดับน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักให้มีความเข้มข้นประมาณ 25 กรัมต่อลิตร และเก็บตัวอย่างในวันที่ 3 8 13 16 และ 19 ของการเพาะเลี้ยง มาเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่โดยแยกเซลและน้ำหมัก โดยแยกเฉพาะเซลมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ (fresh medium) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเซลในอาหารเดิม หรือย้ายจากการเลี้ยงในถังหมักมาเลี้ยงในขวดเขย่า เพื่อเป็นตัวควบคุม (control) แล้วเก็บตัวอย่างเชื้อที่เพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ในวันที่ 5 และ วันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 16 พบว่าเมื่อนำเซลพร้อมน้ำหมักจากถังหมักมาเลี้ยงต่อในขวดเขย่า เซลสามารถผลิตจิบเบอเรลลิน GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้มากกว่าเมื่อนำเซลมาเลี้ยงในขวดเขย่าโดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ทั้งนี้ได้หักลบปริมาณจิบเบอเรลลินที่มีอยู่ในน้ำหมักเดิมออกแล้ว สาเหตุอาจเป็นเพราะในน้ำหมักยังมีสารตัวกลาง (intermediate) ที่เซลสามารถเปลี่ยนเป็นจิบเบอเรลลินได้ในระยะเวลาสั้น นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่มิได้มีผลช่วยให้เซลผลิตจิบเบอเรลลินได้เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการบ่งชี้ชัดว่าการที่เซลในถังหมักไม่สามารถผลิตจิบเบอเรลลินเพิ่มขึ้นนั้น มีข้อจำกัดอยู่ที่ประสิทธิภาพของเซล มิได้เป็นเพราะสารที่มีอยู่ในน้ำหมักเป็นตัวยับยั้งการสร้างจิบเบอเรลลิน

ตารางที่ 16 ปริมาณจิบเบอเรลลิน (GA_3 GA_4 และ GA_7) ที่ผลิตในขวดเขย่า โดยใช้เซลจากถังหมักเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเซลในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ (fresh media)

อายุเซลในถังหมักที่นำมาเลี้ยงต่อในขวดเขย่า (วัน)	ระยะเวลาที่เลี้ยงในขวดเขย่า (วัน)	เลี้ยงในขวดเขย่า								
		อาหารเลี้ยงเชื้อเดิม					อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนใหม่			
		น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน(มก.ต่อลิตร)				น้ำหนักเซลแห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณจิบเบอเรลลิน(มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
3	5	10.8	295	12	15	322	15.2	272	-	11	283
	10	9.9	341	11	20	372	10.2	322	15	-	337
8	5	6.6	310	11	20	341	6.6	294	-	-	294
	10	6.1	293	10	22	325	5.8	201	23	11	235
13	5	5.4	293	15	22	325	5.0	276	17	-	293
	10	5.9	241	19	14	322	5.9	266	23	17	306
16	5	5.6	102	22	13	137	5.4	74	12	-	85
	10	5.4	198	14	-	112	5.5	63	14	-	77
19	5	5.1	73	18	-	91	4.8	42	22	-	64
	10	5.0	83	20	-	103	4.3	39	12	-	51

หมายเหตุ - หมายถึง ปริมาณ GA_4 และ GA_7 มีน้อยมากจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้