บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการต่อเนื่องจากงานวิจัยของ จันทร์ธิรา ล้ภยพร (2536) ซึ่งเป็นงานปรับปรุงสายพันธุ์ของ *G. fujikuroi* โดยมีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จากสายพันธุ์กลายพันธุ์ และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร จากผลงานวิจัยของ จันทร์ธิรา ล้ภยพร (2536) ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *G. fujikuroi* C จำนวน 3 สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุดใกล้เคียงกัน คือสายพันธุ์ N6-3 N7-54 และ N9-34 และเมื่อนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาคัดเลือกซ้ำ พบว่าสายพันธุ์ N9-34 ให้ผลผลิต GA_3 สูงสุดเท่ากับ 913 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการหมัก จึงเลือกสายพันธุ์ N9-34 สำหรับศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร ต่อไป

สารอาหารไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่ง ที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน เนื่องจากการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน ถูกควบคุมด้วยขบวนการเมตาโบลิสมของไนโตรเจน กล่าวคือการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินจะเริ่มขึ้น เมื่อไนโตรเจนในอาหารถูกใช้หมด (Borrow et al., 1964) จากรายงานของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(2532) ได้หาแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่าโดย *G. fujikuroi* C พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วในปริมาณ 1.89 และ 2.39 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอนินทรีย์และอินทรีย์ไนโตรเจน ตามลำดับ ให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดเดี่ยว หรือแหล่งไนโตรเจนอื่น ต่อมา อรไท สุขเจริญ (2533) ได้ใช้แหล่งไนโตรเจนดังกล่าวในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยสายพันธุ์เดิม เนื่องจากอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยจะมีลักษณะไม่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ทำให้ยากต่อการควบคุมเวลาบรรจุอาหารลงขวดเขย่า เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงใช้สารละลายของกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันแทน จากผลการทดลอง พบว่าในสูตรอาหารที่มีสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าและการเจริญได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นอื่น และยังให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าและเร็วกว่าการเลี้ยงในสูตร

อาหารของ อรไท สุขเจริญ(2533) ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยกรดกำมะถัน จะมีอินทรีย์ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารโมเลกุลเล็ก เช่น กรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้นๆ ซึ่งง่ายต่อการนำไปใช้ในขบวนการเมตาโบลิสมของไนโตรเจน ส่งผลให้เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงขึ้นและเร็วกว่าการใช้กากถั่วเหลือง ที่เชื้อต้องใช้เวลาย่อยสลายอินทรีย์ไนโตรเจนออกมาอย่างช้าๆ ทำให้เชื้อต้องใช้เวลาการสร้างผลิตภัณฑ์นานกว่า

ชนิดของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการผลิต GA_3 จากรายงานของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532) พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 1.89 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* C ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (2532)และ อรไท สุขเจริญ (2533) ที่ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตดังกล่าวเหมาะสมต่อการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* C ทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร จากผลการทดลองที่รายงานนี้พบว่า เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2.39 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่ต่ำหรือสูงกว่านี้ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารต่ำ จะไม่เพียงพอในการเจริญ ในขณะที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารที่มากเกิน ทำให้การสังเคราะห์จิบเบอเรลลินเริ่มช้า เพราะกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินจะเริ่มเมื่อไนโตรเจนในอาหารหมด (Borrow et al.,1964) นอกจากนี้พบว่าลักษณะของน้ำหมักมีสีแดงมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงาน Bu Lock et al. (1974) ที่กล่าวว่า ถ้ามีปริมาณไนโตรเจนที่สูงมากจะทำให้เกิดสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์อีกชนิดหนึ่งคือ ไบคาเวอริน (bicaverin) ซึ่งเป็นรงควัตถุที่มีสีแดง และเป็นสารพวกโพลีคีไทด์ ที่ใช้สารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ร่วมกับจิบเบอเรลลิน จึงทำให้การผลิตจิบเบอเรลลินลดลง

สารอาหารคาร์บอนมีความสำคัญมากต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน กระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินจะดำเนินต่อเนื่องได้จะต้องมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นอย่างเพียงพอ (Borrow et al., 1959) จากรายงานของ อรไท สุขเจริญ(2533) พบว่า ซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย *G. fujikuroi* C ขณะที่รายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) พบว่าการใช้ซูโครส ร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง ในอัตราส่วน 100 และ 60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดยสายพันธุ์ F4W-6(9) ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *G. fujikuroi*

C แต่เมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมของแหล่งคาร์บอนที่จะใช้เพื่อผลิต GA_3 ในระดับขยายส่วนแล้ว น่าจะใช้ซูโครสมากกว่าการใช้ซูโครสร่วมกับน้ำมันถั่วเหลือง โดยที่ซูโครสมีราคาถูกและมีแหล่งวัตถุดิบที่มากกว่า ขณะที่น้ำมันถั่วเหลืองมีราคาแพงกว่าและการละลายของออกซิเจนในอาหารที่มีน้ำมันเป็นส่วนประกอบจะต่ำกว่าอาหารที่ละลายในน้ำ อีกทั้งยังพบว่า เชื้อราไม่สามารถย่อยสลายคาร์บอนในน้ำมันถั่วเหลืองมาใช้หมด เพราะภายหลังสิ้นสุดการหมักจะเหลือสารที่มาจากการย่อยน้ำมันถั่วเหลืองอยู่อีกมาก ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาในการกำจัดและกระทบต่อสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถติดตามปริมาณน้ำมันและสารที่เกิดจากการย่อยน้ำมันที่มีอยู่ในน้ำหมัก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนอย่างเดียว และจากการทดลอง พบว่าเมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่มีปริมาณซูโครส 120 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าสูตรอาหารที่มีซูโครส 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ขณะที่ในอาหารที่มีปริมาณซูโครสสูงมากเกินคือ 140 กรัมต่อลิตร จะใช้เวลาสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่าปกติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) ที่กล่าวว่า เมื่อมีซูโครสในอาหารต่ำ เชื้อสามารถใช้ซูโครสที่มีอยู่เป็นสารตั้งต้นสำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ GA_3 ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้คาร์บอนในอาหารหมด ไม่เพียงพอที่จะนำไปสร้างผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังเกิดการสลายตัวของเชื้อด้วย ขณะเดียวกันในอาหารที่มีซูโครสสูง ทำให้เชื้อเจริญช้าและการผลิต GA_3 จะต่ำ

ธาตุอาหารฟอสเฟต มีความจำเป็นยิ่งในขบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน เนื่องจากช่วยในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ (Vass and Jefferys,1979) จากผลการทดลองพบว่าในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่มีปริมาณโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Borrow et al.(1961) พบว่า เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi*(Saw)Wr. ACC 917 ขณะที่การใช้โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในปริมาณต่ำที่ 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อจะเจริญได้น้อยกว่าการใช้ในปริมาณสูงที่ 5 กรัมต่อลิตร แม้ว่าจะสร้างผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่า แต่ก็ให้ผลผลิตต่ำกว่าในที่สุด เนื่องจากมีปริมาณฟอสเฟตในอาหารที่จำกัด จึงทำให้ไม่เพียงพอในการนำไปใช้ในการเจริญ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตสูงคือ 7 และ 9 กรัมต่อลิตร จะเกิดภาวะการเจริญมากเกิน ทำให้ผลผลิต GA_3 ต่ำ

ธาตุอาหารแมกนีเซียม มีส่วนสำคัญในการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์เช่นกัน(Vass and Jefferys, 1979) จากการหาปริมาณแมกนีเซียมในสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิต

GA_3 พบว่า ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kyowa Hakko Kogyo Co.Ltd.,(1983) ที่พบว่าการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* NRRL 2633 และยังพบว่า การเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้น ตามการเพิ่มปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต แต่ผลผลิต GA_3 จะลดลง

ส่วนธาตุอาหารเสริมมีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน โดยธาตุอาหารเสริมจะทำหน้าที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและเป็นโคแฟคเตอร์(co-factor) ในกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Hanson,1967) จากผลการทดลองนี้ พบว่าการเติมอะลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ในอาหารเหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อรไท สุขเจริญ (2533) ที่ศึกษาผลของธาตุอาหารเสริมที่มีผลต่อการผลิต GA_3 โดยผันแปรชนิดของธาตุอาหารเสริมเป็น 2 แบบ คือแบบที่ 1 ประกอบด้วยอะลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวและแบบที่ 2 ประกอบด้วยอะลูมิเนียมออกไซด์ ซิงค์คลอไรด์ และคอปเปอร์ซัลเฟต ในอัตราส่วน 0.5 0.5 และ 0.1 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ธาตุอาหารทั้ง 2 แบบ ให้ผลผลิตจิบเบอเรลลินไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาปริมาณที่ใช้และราคาของธาตุอาหารเสริมแล้ว เห็นว่าการใช้อะลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน

ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร มีความสำคัญต่อการผลิต GA_3 จากผลการทดลองนี้ พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเท่ากับ 7 จะให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(2532); อรไท สุขเจริญ(2533) ที่ได้ศึกษากับเชื้อ *G. fujikuroi* C และ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) ซึ่งศึกษากับเชื้อสายพันธุ์F4W-6(9) นอกจากนี้นี้ยังพบว่าในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นสูงกว่า 7.0 น้ำหมักจะมีสีแดงมากขึ้น และมีผลผลิต GA_3 ลดลง ซึ่ง Borrow et al. (1964) กล่าวว่าผลผลิตของจิบเบอเรลลินจะลดลง ถ้าหากค่าความเป็นกรดด่างสุดท้ายของน้ำหมักไม่อยู่ในช่วง 3.5 ถึง 6.5 และพบว่าในเชื้อสายพันธุ์เดิมของ *G. fujikuroi* ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของขบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินคือ GA_3 ขณะที่เมื่อค่าความเป็นกรดด่างสูงมากกว่า 7 ผลผลิต GA_3 จะต่ำ แต่เชื้อสามารถสร้างสารตัวกลางเช่น GA_4 GA_7 GA_9 GA_{12} GA_{14} และ GA_{16} ได้เพิ่มขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำสารตัวกลางมาผลิตเป็น GA_3 ได้

การศึกษาหาอุณหภูมิในระหว่างการหมัก เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* N9-34 พบว่า

อุณหภูมิระหว่างการหมักที่ 25 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 สามารถให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าอุณหภูมิระหว่างการหมักที่ 28 และ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(2532) ที่พบว่าอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* C นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิสูงที่ 28 และ 30 องศาเซลเซียส การสร้างผลิตภัณฑ์จะเร็วขึ้น แต่ให้ผลผลิตต่ำ และสังเกตเห็นว่า เมื่ออุณหภูมิในระหว่างการหมักสูง เชื้อจะสลายตัวได้เร็วกว่า และอาจปลดปล่อยสารภายในเซลล์ออกมา เป็นผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักสูงขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองนี้จะแตกต่างจาก รายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ที่พบว่าอุณหภูมิระหว่างการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย สายพันธุ์ F4W-6(9) ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ของสายพันธุ์ *G. fujikuroi* C คือ 28 องศาเซลเซียส จึงอาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิในระหว่างการหมักมีความสำคัญต่อการผลิต และขึ้นกับสายพันธุ์ที่ใช้

โดยทั่วไปการใช้หัวเชื้อที่เหมาะสมในการหมัก จะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้นในระยะเวลาที่สั้นกว่า เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยจะทำให้เชื้อเจริญได้ดีกว่า ดังนั้นในการทดลองนี้จึงลองใช้สูตรอาหารดังกล่าวมาเตรียมหัวเชื้อ และพบว่าอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 อยู่ระหว่างชั่วโมงที่ 36-60 จะให้ผลผลิต GA_3 สูงสุดใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากเชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะกึ่งกลางของช่วงการเจริญทวีคูณในชั่วโมงที่ 48 ดังนั้นจึงเลือกหัวเชื้อที่มีอายุ 48 ชั่วโมงเพื่อผลิต GA_3 ผลการทดลองนี้ต่างจาก การเตรียมหัวเชื้อในสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (2533) ที่พบว่าหัวเชื้อที่มีอายุ 72 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ขณะที่รายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ (2536) พบว่า สายพันธุ์F4W-6(9) จะเจริญเข้าสู่ช่วงกลางของการเจริญในชั่วโมงที่ 60 และใช้หัวเชื้อที่อายุดังกล่าวเพื่อผลิต GA_3 และพบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าการใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 72 ชั่วโมง สำหรับงานวิจัยนี้พบว่า หัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดยสายพันธุ์ N9-34 คือ หัวเชื้อที่มีอายุ 48 ชั่วโมง ซึ่งทำให้สามารถลดระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อลงไปอีก

ผลการศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* N9-34 ในระดับขวดเขย่า สรุปได้ว่าในสูตรอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย ซูโครส 120 กรัม เป็นแหล่งคาร์บอน สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัม ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2.39 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดร

เจนฟอสเฟต 5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัม อะลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัม และน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมคือ การเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าให้ผลผลิต GA_3 สูงสุดเท่ากับ 1208 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(2533) คิดเป็นร้อยละ 41 ที่ให้ผลผลิตเท่ากับ 854 ในวันที่ 13 ของการหมัก แต่เมื่อนำสูตรอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าให้ผลิต GA_3 เพียง 347 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก ซึ่งน้อยกว่าการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า เมื่อเทียบผลผลิตในวันเดียวกันซึ่งให้ผลผลิต 838 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาในระดับขวดเขย่า ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้หมักในถังหมัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากสภาวะการหมักในถังหมักมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักสูงกว่าในระดับขวดเขย่า จึงทำให้เชื้อมีรูปแบบการเจริญ การใช้สารอาหาร และการสร้างผลิตภัณฑ์แตกต่างกับการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า ดังนั้น จึงได้ปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการลดปริมาณสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันลง และพบว่าในสูตรอาหารที่มีสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.57 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิต GA_3 สูงขึ้น โดยให้ผลผลิตเท่ากับ 717 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก และเมื่อใช้ระยะเวลาหมักเพิ่มขึ้น จะให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 1077 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการหมัก และเมื่อใช้สูตรอาหารนี้ศึกษาผลของอัตราการให้อากาศที่มีต่อการผลิต GA_3 พบว่าอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm จะให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าการให้อากาศที่ 0.5 vvm โดยที่สภาวะการให้อากาศ 1 vvm ให้ผลผลิตเท่ากับ 717 และ 1077 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 12 ของการหมัก ขณะที่การให้อากาศ 0.5 vvm ให้ผลผลิตเท่ากับ 603 และ 882 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 12 ของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อรไท สุขเจริญ (2533) เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ F4W-6(9) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าอัตราการให้อากาศ 1 vvm เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งต้องการออกซิเจนอย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามผลผลิต GA_3 ในถังหมักยังต่ำกว่าการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า จึงเห็นว่าการใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในสูตรอาหาร ไม่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ในระดับถังหมัก ดังนั้นงานวิจัยขั้นต่อ

ไป จึงปรับสารอาหารใหม่ โดยใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแทนสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ผ่านการย่อยด้วยกรดกำมะถัน

จากการหาปริมาณที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่า พบว่า ในสูตรอาหารที่มีกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.9 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 1.89 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดยให้ผลผลิต 1085 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก และเมื่อใช้ระยะเวลาหมักเพิ่มขึ้นพบว่าให้ผลผลิตเท่ากับ 1237 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(2533) และพบว่าต้องใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองมากกว่าสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (2533) ซึ่งใช้เพียง 1.9 กรัมต่อลิตร จึงอาจเป็นได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ N9-34 เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการไนโตรเจนสูง และจากการหาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบของสูตรอาหาร พบว่าในสูตรอาหารที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตร เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากับ 1026 และ 1262 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 13 ของหมักตามลำดับ

ดังนั้น สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วแทน สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ในอาหาร 1 ลิตร จะประกอบด้วย กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว 5.9 กรัม ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 1.89 กรัม ซูโครส 100 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัม อะลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัม และน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 เมื่อนำสูตรอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้สภาวะของการหมักที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm พบว่า สามารถให้ผลผลิต GA_3 เท่ากับ 931 และ 1394 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 11 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า และเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที จะให้ผลผลิตสูงเท่ากับ 1091 และ 1534 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 11 ของการหมัก ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงด้วยอัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที และผลการทดลองนี้ต่างจากรายงานของ อรไท สุขเจริญ(2533) และ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ที่พบว่าอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 ทั้งนี้เพราะว่า จากสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากงานวิจัยนี้

เชื้อจะเจริญได้สูงขึ้น โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารของ อรไท สุขเจริญ (2533) ทำให้เกิดความหนืดสูง ประกอบกับการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินต้องการออกซิเจนมาก ซึ่งการกวนที่แรงขึ้นจะช่วยให้เซลล์ได้สัมผัสกับอากาศมากขึ้น อย่างไรก็ตามอัตราการกวนไม่ควรสูงเกินไป เนื่องจากแรงจากการกวนจะทำให้ไมซีเลียมของเชื้อราแตกสลายได้

จากการศึกษาการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมัก เมื่อเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวข้างต้น พบว่าการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักที่ 25 กรัมต่อลิตร ทำให้ผลผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นสูงสุด คือ 1760 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่การควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 15 และ 5 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตเท่ากับ 1586 และ 1569 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 12 ของการหมัก ขณะที่การเลี้ยงที่ไม่ได้ควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมัก ให้ผลผลิต GA_3 เท่ากับ 1534 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อรไท สุขเจริญ (2533) ที่พบว่า เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และควบคุมระดับน้ำตาลในถังหมักที่ 25 กรัมต่อลิตร ทำให้ผลผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นเป็น 1023 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมักจำนวน 14.5 วัน และแตกต่างจาก อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ F4W-6(9) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า การควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ 15 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มผลผลิต GA_3 ให้สูงขึ้นเป็น 1362 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการหมัก จากการทดลองนี้ยังพบว่า ภายหลังการเริ่มเติมกลูโคสลงในถังหมัก เซลล์ของเชื้อรามีลักษณะเหลวกว่าปกติ และน้ำหมักจะมีสีชมพูเข้มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การเติมกลูโคสเพื่อรักษาระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักนั้น เชื้อไม่ได้นำกลูโคสไปใช้เพื่อผลิต GA_3 เพียงอย่างเดียว แต่อาจจะนำไปผลิตสารตัวกลาง หรือสารทุติยภูมิเมตาโบไลท์ชนิดอื่น ซึ่งจากรายงานของ Bu Lock et al. (1976) กล่าวว่า ในอาหารที่มีปริมาณคาร์บอนสูง เชื้อจะสร้างรงควัตถุชนิดหนึ่ง คือ ไบคาเวอริน ขึ้นมาก่อน โดยผ่านการสังเคราะห์มาจากพวกโพลีคีไทด์ ซึ่งต้องใช้อะซิทิลโคเอนไซม์เอ เป็นสารตั้งต้น

แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่จุลินทรีย์ที่ใช้ไป ตลอดกระบวนการหมัก พบว่า ปริมาณน้ำตาลถูกใช้ไปเพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงที่ไม่ได้เติมน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 0.68 เท่า ของน้ำตาลเริ่มต้น หรือประมาณ 168 กรัมต่อลิตร โดยที่ให้ผลผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นสูงกว่าการเลี้ยงที่ไม่ได้เติมน้ำตาลระหว่างการหมักประมาณ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และยังใช้เวลาผลิตเพิ่มขึ้นอีก 1 วัน ซึ่งถือว่าเป็นการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต อีกทั้งยังประสบปัญหาการรักษาระดับน้ำตาลรีดิวซ์ให้คงที่

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* N9-34 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ ในสูตรอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ซูโครส	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว	5.9	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1.0	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์	0.1	กรัม
น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ	0.2	(ปริมาตรต่อปริมาตร)
ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของ อาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ	7.0	

เมื่อทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยไม่ต้องควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมัก