สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน

โดย *Gibberella fujikuroi* N9-34

นายศุภชัย สัมปปิโต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-284-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18840840X

OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF GIBBERELLINS BY *Gibberella fujikuroi* N9-34

Mr. Supachai Samappito

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1994

ISBN 974-584-284-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน โดย *Gibberella fujikuroi* N9-34
โดย	นายศุภชัย สัมปิโต
ภาควิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

_____ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล)

_____ กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ศุภชัย สมัปปิโต : สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน โดย Gibberella fujikuroi N9-34 (OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF GIBBERELLINS BY Gibberella fujikuroi N9-34) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, 138 หน้า, ISBN 974-584-284-2

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดย G. fujikuroi N9-34 หนึ่งลิตร ประกอบด้วย ซูโครส 120 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 2.39 กรัม สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัม อลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัม และน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เมื่อใช้สูตรอาหารดังกล่าวเพื่อผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่า โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 300 รอบต่อนาที จะได้ผลผลิต GA_3 เท่ากับ 838 และ 1162 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 11 ของการหมัก ตามลำดับ แต่พบว่าสูตรอาหารนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เนื่องจากให้ผลผลิต GA_3 เพียง 347 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก อย่างไรก็ตามเมื่อปรับปรุงสูตรอาหารข้างต้นโดยการเปลี่ยนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจากสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน เป็นกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.90 กรัม ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 1.89 กรัม และซูโครส 100 กรัม แล้วนำสูตรอาหารนี้มาใช้ผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm พบว่าเชื้อจะผลิต GA_3 ได้ 1091 และ 1534 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 และ 11 ของการหมัก ซึ่งผลผลิตที่ได้นี้สูงกว่าการเลี้ยงในขวดเขย่าคิดเป็นร้อยละ 30 และ 32 ตามลำดับ

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C426550 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: GIBBERELLIN, OPTIMIZATION, Gibberella fujikuroi
SUPACHAI SAMAPPITO : OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF GIBBERELLINS BY Gibberella fujikuroi N9-34. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. AND THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. 138 pp. ISBN 974-584-284-2

The suitable medium composition for production of GA_3 by Gibberella fujikuroi N9-34 contained per liter : 120 g of sucrose, 2.39 g of $(NH_4)_2SO_4$, acid hydrolyzed cotton seed hull with nitrogen content of 1.14 g, 5.0 g of KH_2PO_4, 1.0 g of $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g of Al_2O_3 and 0.2% (v/v) soybean oil with the initial pH of 7.0. By using this medium, cultivation of G. fujikuroi N9-34 in shaken flask at 25°C and 300 rpm. yielded 838 and 1162 mg of GA_3 per liter on day 7 and 11 of cultivation, respectively. However, it was found that this medium was not suitable for GA_3 production in a 5 l-fermentor as only 347 mg of GA_3 per liter was obtained on day 7 of fermentation. Nitrogen and carbon sources of the medium were then modified by using 5.90 g of defatted soybean meal instead of hydrolyzed cotton seed hull and in the presence of 1.89 g of $(NH_4)_2SO_4$ and 100 g of sucrose. With this mudium, production of GA_3 in a 5 l-fermentor under controlled temperature at 25°C, 600 rpm agitation and 1 vvm aeration yielded 1091 and 1534 mg of GA_3 per liter on day 7 and 11, respectively. These values were 30% and 32%, respectively, higher than those obtained by shaken flask cultivation.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ซึ่งกระผมขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้อย่างสูงยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะผู้บริหารสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี ตลอดจนสิ่งอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณนักวิจัย เจ้าหน้าที่ของสถาบันทุกท่าน ที่ช่วยอำนวยความสะดวกระหว่างการทำงานวิจัย จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้อง ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณคณะกรรมการโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ของทบวงมหาวิทยาลัย(UDC) ที่กรุณาพิจารณาให้ทุนในการศึกษานี้

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ที่ให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจ และกำลังใจ ในการศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ฆ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญรูป ..... ฒ
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ ..... ท

บทที่

1 บทนำ

1. ประวัติความเป็นมา 1
2. ชนิดและโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน 2
3. การสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน 3
4. การผลิตจิบเบอเรลลิน 10
5. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน 11
6. เหตุจูงใจในการวิจัย 15
7. ขั้นตอนการวิจัย 16

2 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 17
2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 18
3. วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 18
4. การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 19
5. วิธีการวิเคราะห์ 20

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	ผลการทดลอง	
	3.1 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3)	24
	3.2 การหาองค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดย *G. fujikuroi* N9-34 ในระดับขวดเขย่า	
	3.2.1 การหาชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3	29
	3.2.2 การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3	34
	3.2.3 การหาปริมาณซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3	40
	3.2.4 การหาปริมาณโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3	43
	3.2.5 การหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3	46
	3.2.6 การหาปริมาณอะลูมิเนียมออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3	49
	3.2.7 การหาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3	52
	3.2.8 การหาอุณหภูมิระหว่างการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 .	55
	3.2.9 การศึกษารูปแบบการเจริญของ *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ	
	3.2.10 การหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3	61
	3.2.11 การเปรียบเทียบการผลิต GA_3 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของอรไทสุขเจริญ(2533) และสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษานี้	64

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

3 ผลการทดลอง (ต่อ)

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.3.1 การศึกษาการเจริญและการผลิต GA_3 68

3.3.2 ผลของปริมาณสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันที่มีต่อการผลิต GA_3 71

3.3.3 ผลของอัตราการให้อากาศที่มีต่อการผลิต GA_3 81

3.4 การปรับปริมาณสารอาหารในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 โดยทดสอบในระดับขวดเขย่า

3.4.1 การหาปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 85

3.4.2 การหาปริมาณซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 91

3.5 การศึกษาการเจริญและการผลิต GA_3 โดยใช้สูตรอาหารที่ปรับปริมาณสารอาหารแล้ว ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

3.5.1 การเจริญและการผลิต GA_3 94

3.5.2 ผลของอัตราการกวนที่มีต่อการผลิต GA_3 98

3.5.3 ระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักที่เหมาะสมต่อการผลิต GA_3 101

4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 111

เอกสารอ้างอิง 120

ภาคผนวก

ก สูตรอาหารที่ใช้ในงานวิจัย 126

ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 130

ค กราฟมาตรฐาน 133

ประวัติผู้เขียน 138

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สภาวะการหมัก การใช้สารแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ระยะเวลาหมัก และปริมาณ GA_3 ที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ..	12
2	เปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และประสิทธิภาพการผลิต GA_3 จากสายพันธุ์ตั้งต้น (C) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *G. fujikuroi* เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ของ อรไท สุขเจริญ (2533)	26
3	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันปริมาณสารละลายของกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.14 0.64 1.14 และ 1.64 กรัมต่อลิตร	30
4	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันปริมาณสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.14 0.64 1.14 และ 1.64 กรัมต่อลิตร	32
5	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.39 1.89 2.39 และ 2.89 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายของกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัมต่อลิตร	36
6	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.39 1.89 2.39 และ 2.89 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัมต่อลิตร	38

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
7	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันปริมาณปริมาณซูโครสเป็น 80 100 120 และ 140 กรัมต่อลิตร	41
8	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันปริมาณโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 3 5 7 และ 9 กรัมต่อลิตร ...	44
9	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันปริมาณปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 1.0 1.5 และ 2 กรัมต่อลิตร	47
10	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 เมื่อไม่มีการเติมอะลูมิเนียมออกไซด์ และมีการเติมอะลูมิเนียมออกไซด์เป็น 0.1 0.2 และ 0.3 กรัมต่อลิตร	50
11	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0,6.5,7.0,7.5 และ 8.0	53
12	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ที่แปรผันอุณหภูมิระหว่างการหมักเป็น 25 28 และ 30 องศาเซลเซียส	56
13	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลที่เหลือที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ.....	59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

14 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3 เมื่อแปรผันอายุของหัวเชื้อเป็น 36 42 48 54 และ 60 ชั่วโมง 62

15 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ที่ได้จากการศึกษาในระดับขวดเขย่า 64

16 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดยเชื้อ *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ของ อรไท สุขเจริญ(2533) และสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษานี้ ทำการหมักบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที 66

17 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยงเชื้อ *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vmm 69

18 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.39 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm 72

19 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.57 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm 74

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

20 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.66 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm 76

21 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.95 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm 78

22 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 และ 1 vmm 83

23 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.89 และ 2.39 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการแปรผันปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็น 0.9,1.9,2.9,3.9,4.9,5.9,6.9 และ 7.9 กรัมต่อลิตร 87

24 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับผลิต GA_3 เมื่อแปรผันปริมาณซูโครสเป็น 80 100 120 และ 140 กรัมต่อลิตร 92

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

25 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว แทนสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน 94

26 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vmm 96

27 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการให้อากาศ 1 vmm แต่เพิ่มอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที 99

28 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเริ่มเติมน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7 ของการหมัก และควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร 102

29 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเริ่มเติมน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7 ของการหมัก และควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร 104

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

30 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเริ่มเติมน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7 ของการหมัก และควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร 106

31 การเปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะของการหมัก 109

32 เปรียบเทียบปริมาณผลผลิต GA_3 ที่ได้จาก *G. fujikuroi* สายพันธุ์ C เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(2533) , สายพันธุ์ F4W-6(9) ในสูตรอาหาร ของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) และสายพันธุ์ N9-34 ในสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษานี้ 110

33 การเตรียมสารละลาย GA_3 มาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 132

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างของ ent-gibberellane	2
2	โครงสร้างของ GA_3	3
3	ขั้นตอนการสร้างไอโซเพนทีนิลไพโรฟอสเฟต จากอะซิทิลโคเอนไซม์เอ	4
4	ขั้นตอนการสังเคราะห์เทอร์พีนและเทอร์พีนอยด์	5
5	ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงจาก ent-kaurene ไปเป็น GA_{12}-aldehyde	7
6	ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลง GA_{12}-aldehyde เพื่อการสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน	9
7	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ตั้งต้น(C) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ของ *G. fujikuroi*	28
8	ผลของการแปรผันปริมาณสารละลายของกากถั่วเหลือง ที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	31
9	ผลของการแปรผันปริมาณสารละลายของกากเมล็ดฝ้าย ที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	33
10	ผลของการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารละลายของกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	37
11	ผลของการแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ที่มีปริมาณไนโตรเจน 1.14 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	39
12	ผลของการแปรผันปริมาณซูโครส ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	42
13	ผลของการแปรผันปริมาณโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	45
14	ผลของการแปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	48

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	ผลของการแปรผันปริมาณอะลูมิเนียมออกไซด์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	51
16	ผลของการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3	54
17	ผลของการแปรผันอุณหภูมิระหว่างการหมัก ที่เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3.....	57
18	รูปแบบการเจริญของ *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ	60
19	ผลของการแปรผันอายุหัวเชื้อที่มีต่อการผลิต GA_3	
20	เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดยเชื้อ *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ของ อรไท สุขเจริญ (2533) และสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษานี้ ทำการหมักบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที	67
21	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมัก 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vmm	70
22	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมัก 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.39 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm	73
23	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมัก 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.57 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุม	

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
	อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm	75
24	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมัก 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.66 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm	77
25	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมัก 5 ลิตร เมื่อใช้สารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันให้มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.95 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm	79
26	เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันปริมาณสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.39 0.57 0.66 และ 0.95 กรัมต่อลิตร	80
27	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที	84
28	ผลของการแปรผันปริมาณที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 1.89 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	89

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
29	ผลของการแปรผันปริมาณที่เหมาะสมของกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 2.39 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3	90
30	ผลของการแปรผันปริมาณซูโครส เพื่อปรับปริมาณให้เหมาะสมสำหรับผลิต GA_3 ร่วมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.90 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 1.89 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3	93
31	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว แทนสารละลายของกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vmm	97
32	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเป็น 1 vmm	100
33	ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเริ่มเติมน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7 ของการหมัก และควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร	103

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

34 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเริ่มเติมน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7 ของการหมัก และควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร 105

35 ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่มีอัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm โดยเริ่มเติมน้ำตาลกลูโคส ในวันที่ 7 ของการหมัก และควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร 107

36 เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมัก และในสภาวะควบคุมระดับที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวซ์ในถังหมักเป็น 5 15 และ 25 กรัมต่อลิตร 108

37 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธีของ Huglet และ Nixon 133

38 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลซูโครส 134

39 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการของ Bernfeld 135

40 ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 และพาราเซตามอล ที่วิเคราะห์ด้วย HPLC.. 136

41 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPLC 137

คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ

มก. = มิลลิกรัมต่อลิตร

ล. = ลิตร

มล. = มิลลิลิตร

GA_3 = กรดจิบเบอเรลลิก

HPLC = เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มาซน์ลิควิดโครมาโตกราฟี

vvm = ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

% = เปอร์เซนต์