การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลิน

ของ *Gibberella fujikuroi* N9-34 โดยการกลายพันธุ์

นางสาวอุษามาส วังชัยสุนทร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-228-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20502977

IMPROVEMENT OF GIBBERELLIN PRODUCTION BY *Gibberella fujikuroi* N9-34 THROUGH MUTATION

Miss. Usamas Wangchaisoonthorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Programme of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-228-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินของ *Gibberella fujikuroi* N9-34 โดยการกลายพันธุ์
โดย	นางสาวอุษามาส วังชัยสุนทร
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

_____คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

_____อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

_____อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

_____กรรมการ

(ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อุษามาส วังชัยสุนทร : การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินของ Gibberella fujikuroi N9-34 โดยการกลายพันธุ์ อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ, 131 หน้า , ISBN 974-632-228-1

งานวิจัยนี้เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ของ Gibberella fujikuroi (ซึ่งผลิต GA_3 ได้ 577 มิลลิกรัมต่อลิตร) โดยการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV 1 รอบ และตามด้วย NTG 2 รอบ และเพิ่มอุณหภูมิสำหรับการเพาะเลี้ยง จากเดิม 25 องศาเซลเซียส เป็น 28 องศาเซลเซียส

การคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ได้ตรวจสอบปริมาณ GA_3 ที่สายพันธุ์ต่างๆ ผลิตได้อย่างคร่าวๆ โดยใช้วิธี TLC ตามด้วยวิธี HPTLC ด้วยวิธีดังกล่าวสามารถคัดสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นออกเป็นจำนวนมาก สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในขั้นปฐมภูมิได้นำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยการวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วย HPLC ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่แม่นยำ จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงสุดในแต่ละขั้นตอน ได้สายพันธุ์ UV-28, UN-84 และ UNN-653 ซึ่งผลิต GA_3 ได้ 701, 909 และ 1257 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน เป็นกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ได้ปริมาณ GA_3 1095, 1051 และ 1396 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จากการทดสอบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ของสายพันธุ์ UNN-653 พบว่าผลิต GA_3 ได้ 1310 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ในงานวิจัยยังพบว่า การกลายพันธุ์ด้วย NTG จะได้สายพันธุ์ที่เสถียรกว่าการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อภายในกรอบสีเขียวแต่เพียงแผ่นเดียว

##C526629 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: GIBBERELLIN, MUTATION, Gibberella fujikuroi
USAMAS WANGCHAISOONTHORN : IMPROVEMENT OF GIBBERELLIN PRODUCTION BY Gibberlla fujikuroi N9-34 THROUGH MUTATION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. AND THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D. 131 pp. ISBN 974-632-228-1

GA_3 producing ability of Gibberella fujikuroi N9-34, a strain capable to produce GA_3 of 577 mg/l, was increased by mutating this organism with UV in the first step and following by 2 consecutive steps with NTG. The cultivation temperature for GA_3 production was also increased from 25°C to 28°C.

Primary screening for ability to produce GA_3 of the mutants was by TLC following by HPTLC. Using these techniques, several strains with low GA_3 producing ability were eliminated. The selected strains were further secondary screened for GA_3 production by HPLC, an accurate method for GA_3 determination. Mutant strains namely UV-28, UN-84 and UNN-653 capable to produce GA_3 of 701, 909 and 1257 mg/l, respectively, on day 7 were selected from each mutation step. When cottoned hull hydrolysate was replaced by defatted soybean meal as a N-source in a culture medium, GA_3 production by these strains on day 7 were 1095, 1051 and 1396 mg/l, respectively. Cultivation of UNN-653 in a 5-1 fermenter yielded 1310 mg of GA_3/l on day 7. The present work also observed that mutants from NTG treatment were more stable than that from UV treatment.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยความกรุณาจากรองศาตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล รองศาตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆในการทำวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นประธานสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ตลอดจนคณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณณรงค์ หอมจันทร์ ช่างเทคนิค นักวิจัย และเจ้าหน้าที่สถาบันฯทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณจันทร์ธิรา ลัภยพร คุณศุภชัย สมัปปิโต พี่ๆน้องๆและเพื่อนทุกคนที่ได้ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ ที่เคารพรัก และญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือกำลังกาย กำลังใจ และกำลังทรัพย์ ในระหว่างการศึกษาด้วยดีตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป ..... ณ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ท

1 บทนำ 1

1. ประวัติความเป็นมา 1

2. ชนิดและโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน 4

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน 5

4. การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรม 8

5. สิ่งก่อการกลายพันธุ์ 10

6. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi* 15

7. การวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน 16

8. มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย 21

9. ขั้นตอนในการทำวิจัย 23

2 วิธีการทดลอง 24

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 24

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย 27

สารบัญ (ต่อ)

สารบัญ		หน้า
	3. วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	27
	4. การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	27
	5. การกลายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi* ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	29
	6. การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงขึ้น	31
	7. วิธีการวิเคราะห์	32
3	ผลการทดลอง	39
	1. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ของสายพันธุ์ N9-34 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(2533) และสูตรอาหารของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537)	39
	2. การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์	45
	2.1 การชักนำสายพันธุ์ N9-34 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	45
	2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงขึ้น	47
	2.3 ความเสถียรในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 กับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	49
	3. เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 5 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์ N9-34 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและ 28 องศาเซลเซียส	51

สารบัญ (ต่อ)

สารบัญ หน้า

4. การปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณ GA_3ขั้นปฐมภูมิด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี(High Performance thin-layer Chromatography) ... 53

4.1 การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก (λmax)..... 53

4.2 ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูงโดยวิธี HPTLC เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC 55

5. การกลายพันธุ์ด้วย NTG และคัดเลือกสายพันธุ์ 60

5.1 การชักนำให้สายพันธุ์ UV-28 เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG 60

5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงขึ้น 63

5.3 ความเสถียรในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UV-28 กับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG 64

6. การกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์ 66

6.1 การชักนำให้สายพันธุ์ UN-84 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG 66

6.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 สูงขึ้น 69

6.3 ความเสถียรในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UN-84 กับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG 70

7. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของสายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน

สารบัญ (ต่อ)

สารบัญ หน้า

และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหาร
ของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) 72

8. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ของสายพันธุ์ UNN-653 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอิทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) 74

9. เปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ การใช้น้ำตาล น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกและสีน้ำหมัก ของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น กับสายพันธุ์ UNN-653 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินระดับขวดเขย่า 80

10. การหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 89

11. ประสิทธิภาพการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 91

12. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) ระหว่าง สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น กับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสง UV และ NTG 2 ครั้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อย

สารบัญ (ต่อ)

สารบัญ หน้า

ด้วยกรดกำมะถัน และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดย

ปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(ศุภชัย สมัปปิโต,2537) 95

4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 98

เอกสารอ้างอิง 105

ภาคผนวก

ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 115

ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย 118

ค สูตรการคำนวณ..... 123

ง กราฟมาตรฐาน..... 125

ประวัติผู้เขียน 131

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างและ ปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ อรไท สุขเจริญ(2533) ในระดับขวดเขย่า 41

2 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างและ ปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) ในระดับขวดเขย่า 43

3 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์สายพันธุ์ N9-34 ภายหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตด้วยระยะเวลาต่างๆ 46

4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของ *G. fujikuroi* N9-34 และสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ได้จากการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 48

5 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้โดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 กับ 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 50

6 เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตกับสายพันธุ์ N9-34 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 28 องศาเซลเซียส 52

7 เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตโดย *G.fujikuroi* 50 สายพันธุ์ วิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC และ HPLC 57

8 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซ็นต์รอดตายของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UV-28หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยNTGที่ความเข้มข้นต่างๆ 61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
9	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของ*G. fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกกับสายพันธุ์ UV-28 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น	64
10	เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกของ*G. fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และ 4	65
11	จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์สายพันธุ์ UN-84 ภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ	67
12	เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ 17 สายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วยวิธี HPTLC และ HPLC	70
13	เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกของ*G. fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และ 4	71
14	เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยNTGเมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)	73

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

15 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน ตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) 76

16 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) 78

17 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ในระดับขวดเขย่า 82

18 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ(ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ในระดับขวดเขย่า 84

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

19 น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงต่างๆ 90

20 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร 92

21 เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ของ *G.fujikuroi* ระหว่างสายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในแต่ละขั้นตอนการกลายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของอรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต, 2537)..... 96

22 การเตรียมสารละลาย GA_3 มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC..... 121

23 การเตรียมสารละลาย GA_3 มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC..... 122

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	วิถีการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	3
2	โครงสร้าง ent-gibberellane	4
3	สูตรโครงสร้างทางเคมีของ NTG	14
4	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ อรไท สุขเจริญ(2533) ในระดับขวดเขย่า	42
5	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) ในระดับขวดเขย่า	44
6	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์สายพันธุ์ N9-34 กับระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลต เพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์	46
7	พีคการสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกด้วยวิธี TLC-densitometric	54
8	ความสัมพันธ์ของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC และ HPLC	58
9	เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC และ HPLC	59

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
10	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์รอดตายของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UV-28 กับความเข้มข้นของ NTG	61
11	ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์รอดตายของ*G. fujikuroi* สายพันธุ์ UN-84 กับความเข้มข้นของ NTG	67
12	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G.fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน ตามสูตรของศุภชัย สมัปปิโต(2537)	77
13	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G.fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของอรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)	79
14	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของอรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ในระดับขวดเขย่า	83

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
15	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ในระดับขวดเขย่า	85
16	ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ N9-34 และ UNN-653 ในระดับขวดเขย่า	86
17	เปรียบเทียบสีน้ำหมักอายุ 7 วันของสายพันธุ์ N9-34 และ UNN-653	86
18	ลักษณะของเชื้อ *G. fujikuroi* ที่เจริญบนอาหารโพเทโตเด็กซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน	87
19	ลักษณะของสปอร์ที่เจริญบนอาหารแข็งเอียงอะซิเตต บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยระบบ Nomarski DIR กำลังขยาย 200 เท่า	88
20	รูปแบบการเจริญของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ	90
21	ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร	93
22	แสดงสีน้ำหมักการผลิตจิบเบอเรลลิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	94
23	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลซูโครส	124

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
24	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการของ Bernfeld	125
25	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีการของ Huglet และ Nixon	126
26	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPTLC	127
27	ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 ที่สแกนด้วยเครื่อง TLC-densitometric ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร	128
28	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPLC	129
29	ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 เมื่อใช้พาราเซตามอล เป็นสารเปรียบเทียบภายใน วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC	130

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

GA_3	=	กรดจิบเบอเรลลิก
TLC	=	ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
HPTLC	=	ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
HPLC	=	ไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี
nm	=	นาโนเมตร
λmax	=	ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด
UV	=	แสงอัลตราไวโอเลต
NTG	=	N-methyl-N´-nitro-N-nitrosoguanidine
ก.	=	กรัม
ล.	=	ลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มก.ต่อ ล.	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
°C	=	องศาเซลเซียส