บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก(GA_3) ของสายพันธุ์ N9-34 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารของอรไท สุขเจริญ(2533) และสูตรอาหารของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537)

นำเชื้อ *Gibberella fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการวิจัยนี้มาเลี้ยงในสูตรอาหารเพื่อผลิต GA_3 2 สูตรคือสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (2533)ที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับสายพันธุ์ N9-34 และสูตรอาหารของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) ซึ่งเป็นสูตรที่เหมาะสมสำหรับสายพันธุ์ N9-34 เพื่อเปรียบเทียบหาสูตรอาหารที่จะใช้ในการวิจัยนี้

ดังนั้นในการทดลองนี้จะนำเชื้อ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับงานวิจัยนี้มาเลี้ยงในสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 2 สูตรดังที่กล่าวมาข้างต้นทำการหมักบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวันเป็นเวลา 13 วัน นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก และปริมาณ GA_3 ได้ผลตามตารางที่ 1 และ 2 และรูปที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

จากตารางที่ 1 และ 2 และรูปที่ 4 และ 5 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต GA_3 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหาร 2 สูตรพบว่า ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เชื้อจะใช้น้ำตาลได้เร็วกว่าโดยดูได้จากน้ำตาลรีดิวซ์ถูก

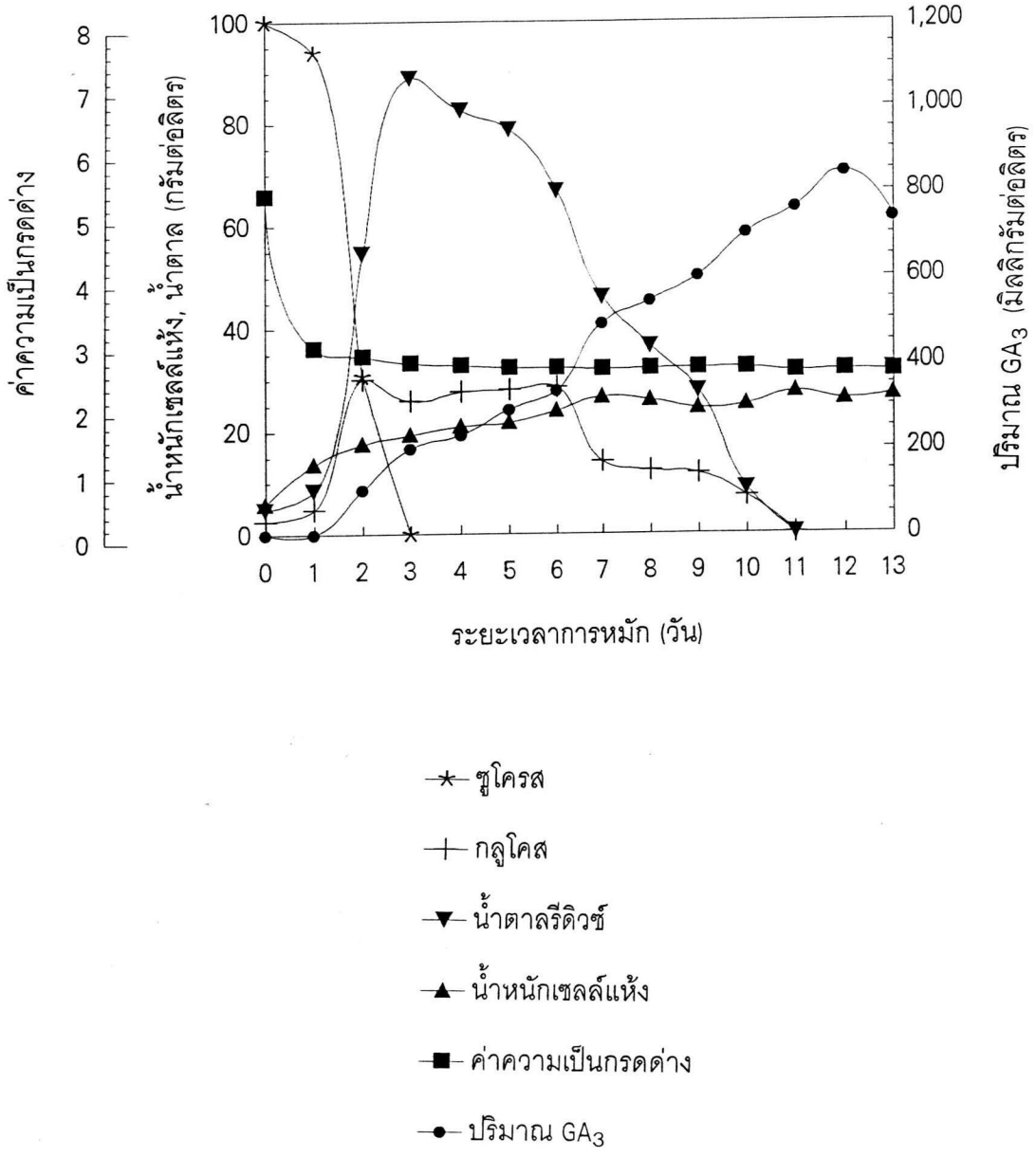
ใช้หมดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง พร้อมๆกับมีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งได้มากกว่า การผลิต GA_3 จะผลิตได้มากกว่าโดยในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงผลิต GA_3ได้ 976 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานขึ้นสามารถผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นได้อีกโดยผลิต GA_3 ได้สูงสุด 1087 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนในสูตรอาหารที่มีกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเชื้อจะใช้น้ำตาลได้ช้ากว่า โดยน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้หมดในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง และได้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่า ขณะเดียวกันการผลิต GA_3 จะผลิตได้มากที่สุดในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งผลิต GA_3 ได้เพียง 845 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้การใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ อรไท สุขเจริญ (2533) ต้องใช้อายุหัวเชื้อ 72 ชั่วโมง ส่วนการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) ใช้อายุหัวเชื้อเพียง 48 ชั่วโมง

ดังนั้นการทดลองต่อไปจะใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ โดยเก็บน้ำหมักในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อนำน้ำหมักไปหาปริมาณ GA_3 ขั้นปฐมภูมิโดยวิธี TLC และขั้นทุติยภูมิด้วยวิธี HPLC ต่อไป

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

วันที่	ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	103.01	2.54	4.78	5.09	6.58	–
1	93.91	4.76	8.49	13.58	3.61	–
2	30.74	30.13	54.59	17.53	3.45	105
3	0	25.92	88.87	19.27	3.32	200
4		27.65	82.53	20.94	3.28	232
5		28.08	78.72	21.69	3.23	291
6		28.51	66.65	24.01	3.23	336
7		14.04	46.02	26.62	3.20	492
8		12.31	36.50	26.00	3.22	545
9		11.66	27.77	24.45	3.23	602
10		7.24	8.73	25.14	3.23	702
11		0	0	27.50	3.16	761
12				26.14	3.18	845
13				27.07	3.16	738

หมายเหตุ : – คือปริมาณ GA_3 น้อยมาก

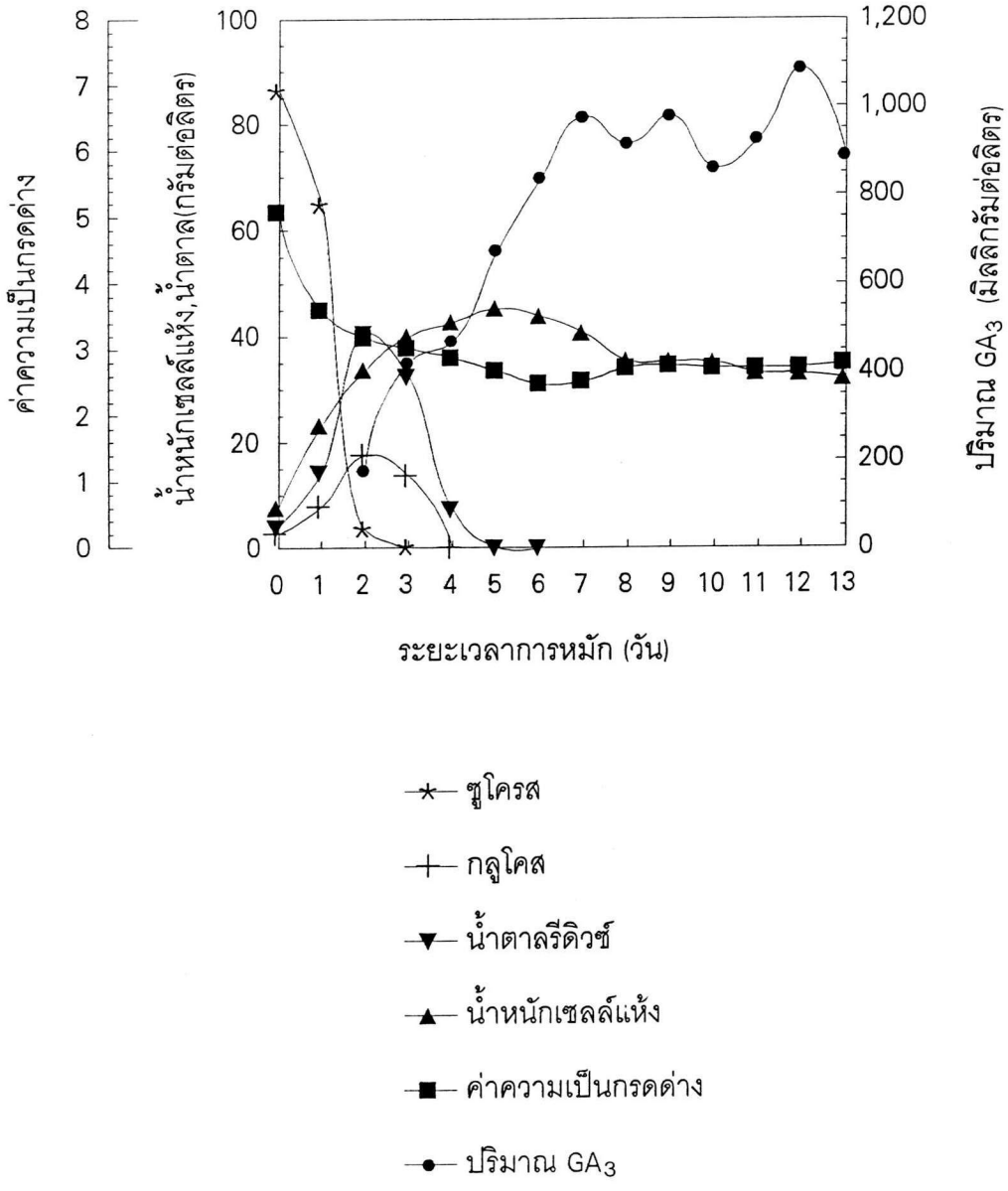


รูปที่ 4 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ อรไท สุขเจริญ (2533) ในระดับขวดเขย่า

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G.fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) ในระดับขวดเขย่า

วันที่	ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	86.33	2.59	3.49	7.64	6.35	-
1	64.76	7.78	14.28	23.15	4.49	-
2	3.39	17.50	40.63	33.65	3.97	176
3	0	13.61	32.38	39.98	3.77	420
4		0	7.30	42.62	3.59	469
5			0	45.16	3.34	674
6				43.72	3.10	838
7				40.54	3.15	976
8				35.37	3.40	916
9				35.20	3.44	978
10				35.03	3.40	860
11				33.06	3.40	926
12				32.92	3.41	1087
13				32.04	3.50	889

หมายเหตุ : - คือปริมาณ GA_3 น้อยมาก



รูปที่ 5 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G.fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของศุภชัย สมัปปิโต (2537) ในระดับขวดเขย่า

2. การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์

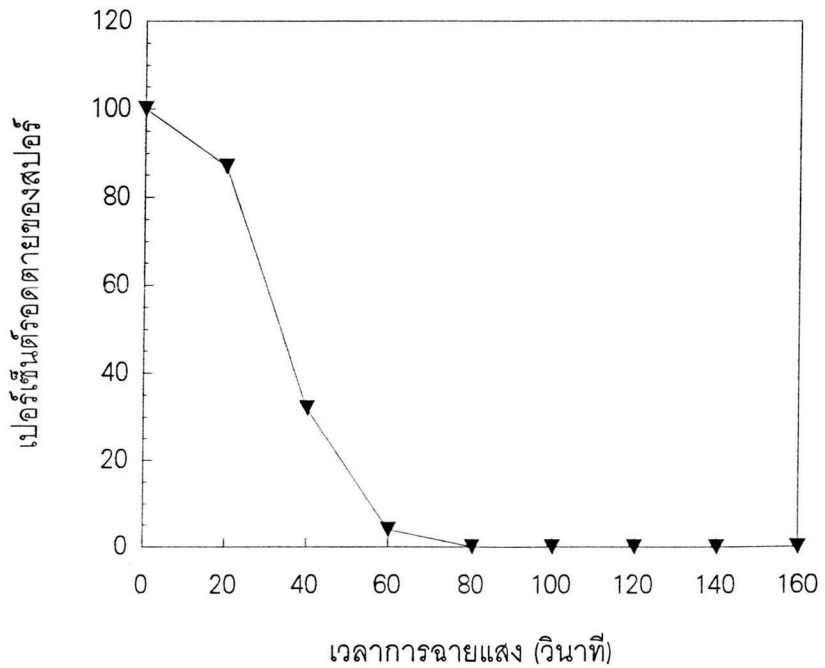
2.1 การชักนำสายพันธุ์ N9-34 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต เป็นวิธีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งมักจะถูกเลือกใช้เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์อันดับแรกในแผนการปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากง่าย สะดวก และปลอดภัยในการใช้งาน ส่วนใหญ่ใช้ germicidal lamp ซึ่งเป็นหลอดไฟเมอร์คิวรี่ที่ปล่อยรังสีความยาวคลื่น 2537 A^0 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิก จึงสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Davies, 1964) มีรายงานเปรียบเทียบผลของแสงอัลตราไวโอเลตต่อสปอร์ของ *G. fujikuroi* ที่ไม่มีการบ่มสปอร์กับสปอร์ที่บ่มแล้ว พบว่ามีอัตราการตายไม่แตกต่างกัน แสดงว่าแสงอัตราไวโอเลตไม่มีผลในการเพิ่มอัตราการตายของสปอร์ที่กำลังงอก ส่วนเส้นใยจะต้านทานต่อแสงอัลตราไวโอเลตมากกว่าสปอร์ ในการวิจัยนี้จึงนำเอาสปอร์ที่ไม่มีการบ่มมาใช้สำหรับการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Avalos et al., 1985)

งานวิจัยนี้ได้ชักนำให้เชื้อ *G fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตตามวิธีการทดลองในข้อ 5.1 โดยใช้สปอร์จากเชื้อที่มีอายุ 7-10 วัน นับจำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร หลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีแล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์รอดตาย ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 นำไปเขียนกราฟได้ดังรูปที่ 6 จะเห็นว่าเซลล์เริ่มมีการตายเล็กน้อย เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลตไปแล้ว 20 วินาที แต่หลังจากนั้นอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 3 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์สายพันธุ์ N9-34 ภายหลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลตด้วยระยะเวลาต่างๆ

ระยะเวลาที่ฉายแสง(วินาที)	จำนวนสปอร์ที่เจริญ	เปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์
0	1.29×10^5	100
20	1.14×10^5	87
40	4.10×10^4	32
60	5.60×10^3	4
80	1.10×10^2	0.090
100	16	0.010
120	4	0.003
140	3	0.002
160	0	0.000



รูปที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์สายพันธุ์ N9-34 กับระยะเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อให้เกิดการกลายพันธุ์

มีรายงานว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตนั้น ปริมาณ (dose) ที่เหมาะสมคือ ปริมาณของแสงอัลตราไวโอเลตที่ทำให้มีอัตราการอยู่รอดของสปอร์ในช่วง 0.01 - 5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงอัตราการรอดดังกล่าวจะมีโอกาสได้สายพันธุ์กลายพันธุ์มากกว่าช่วงอื่นๆ (Baltz, 1986; Davies, 1964) ดังนั้นในการทดลองนี้ได้เก็บโคโลนีจากจานแก้วเพาะเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์รอดตายน้อยกว่า 4 ซึ่งในการทดลองนี้ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-140 วินาที เก็บโคโลนีมา 505 โคโลนี สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะภายนอกได้ 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 จำนวน 479 โคโลนี เส้นใยขาวยาวฟู เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงสายพันธุ์ตั้งต้น

กลุ่มที่ 2 จำนวน 10 โคโลนี เส้นใยสีม่วงอ่อนถึงม่วงเข้ม เจริญเร็วปานกลาง

กลุ่มที่ 3 จำนวน 16 โคโลนี เส้นใยสีส้ม ไม่ฟู เจริญช้า

จันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) ได้รายงานไว้ว่าในกลุ่มสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น มีแนวโน้มที่จะพบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ใกล้เคียงหรือมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นได้มากที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำเอาสายพันธุ์กลุ่มที่ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (ภาคผนวกที่ 1.6) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเก็บน้ำหมักในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อคัดเลือกการผลิต GA_3 ขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิต่อไป

2.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงขึ้น

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ 479 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3.1 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ขั้นปฐมภูมิด้วยวิธี TLC แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีระดับความเข้มของจุด GA_3

บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้สายพันธุ์ตั้งต้นมีความเข้มจุด GA_3 อยู่ในระดับ 2 จากการคัดเลือกด้วยวิธี TLC ทั้ง 479 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่มีความเข้มของจุด GA_3 อยู่ในระดับ 3 และ 4 ทั้งหมด 34 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยนำน้ำหมักมาหาปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPLC พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 16 สายพันธุ์ จากนั้นนำ 16 สายพันธุ์เหล่านี้มาเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 กับสายพันธุ์ตั้งต้น ภายใต้สภาวะเดียวกันในอาหารเหลวสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินอีก 2 ครั้ง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงสุด โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงมาหาปริมาณ GA_3 ที่เชื้อผลิตได้ด้วยวิธี HPLC ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4

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

รหัสสายพันธุ์	ความเข้มจุด GA_3บนแผ่น TLC	ปริมาณ GA_3 (,มิลลิกรัมต่อลิตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
N9-34(C)	2	820	785	802
UV-4	3	1155	76	615
UV-5	3	1219	570	894
UV-8	3	1107	107	607
UV-14	3	1127	342	734
UV-22	3	1135	964	1041
UV-23	3	931	725	828
UV-28	3	1171	1159	1165

มีต่อ...

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	ความเข้มจุด GA_3บนแผ่น TLC	ปริมาณ GA_3 (,มิลลิกรัมต่อลิตร)		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
UV-29	3	991	1004	997
UV-30	3	1216	485	850
UV-35	3	1284	1030	1157
UV-53	3	900	635	767
UV-66	3	925	834	829
UV-86	3	1056	896	976
UV-93	3	1066	1016	1049
UV-153	3	1110	1123	1116
UV-155	3	1079	1091	1085

จากข้อมูลในตารางที่ 4 ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ได้สูงสุด พบว่าสายพันธุ์ UV-28, UV-35, UV-93, UV-153 และ UV-155 ให้ปริมาณ GA_3 ค่อนข้างคงที่และสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยที่สายพันธุ์ UV-28 ผลิต GA_3 เฉลี่ยได้มากที่สุดคือ ผลิต GA_3 1,165 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นประมาณ 45.26 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 4 สายพันธุ์ผลิต GA_3 ได้สูงเช่นกันจึงเก็บไว้เป็นสายพันธุ์สำรอง ดังนั้นการทดลองต่อไปจะนำ 5 สายพันธุ์นี้หาความเสถียรในการผลิต GA_3

2.3 ความเสถียรในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34กับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

ความเสถียรในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ของเชื้อ เป็นสิ่งสำคัญมากสำหรับอุตสาหกรรมที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นในการปรับปรุงสายพันธุ์จะต้องพิจารณาความเสถียรด้วย การทดลองนี้จะทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์ในการผลิต GA_3

โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียงโพเทโตเด็กซ์โทรสทุกๆ 7 วัน เพาะเลี้ยงเชื้อหลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 1 (7 วัน), ครั้งที่ 2 (14 วัน) และครั้งที่ 3 (21 วัน) โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.6) อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ตามวิธีทดลองที่ 7.3 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5

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

สายพันธุ์	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)*		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
N9-34(C)	772	802	756
UV-28	642	782	665
UV-35	557	696	476
UV-93	568	671	508
UV-153	461	593	397
UV-155	578	605	487

* จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

จากผลการทดลองจะพบว่าปริมาณ GA_3 ที่เชื้อสายพันธุ์เหล่านี้ผลิตลดต่ำกว่าปริมาณ GA_3 ที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 มาก (ตารางที่ 5) ซึ่งจะเห็นว่าสายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นปริมาณ GA_3 ที่ผลิตได้คงที่ไม่เปลี่ยนแปลง แต่ในขณะที่สายพันธุ์ UV-28, UV-35, UV-93, UV-153 และ UV-155 ผลิต GA_3 ลดลงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่ผลิตได้เมื่อเลี้ยงเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ (ตารางที่4) แสดงให้เห็นว่าการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตการผลิต GA_3 ของเชื้อไม่คงที่

3. เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 เมื่อเลี้ยง *G.fujikuroi* สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 5 สายพันธุ์ กับสายพันธุ์ N9-34 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและ 28 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 ที่มีผู้รายงานไว้นั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต ส่วนมากจะอยู่ในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส (Borrow et al., 1964; Darken et al., 1959; Golhwar et al.,1984; Holme and Zacharias, 1965; Sastry et al., 1989; Stodola et al., 1955; US Patent 803591) โดยสายพันธุ์ N9-34 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการทดลองนี้ซึ่งใช้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 ดังนั้นในการทดลองนี้จึงจะเพิ่มอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็น 28 องศาเซลเซียส เนื่องจากถ้าเชื้อสายพันธุ์ใดทนอุณภูมิสูงได้จะถูกคัดเลือกไว้ เพราะในการเพาะเลี้ยงจะประหยัดพลังงานของการหล่อน้ำเย็นในการผลิตระดับขยายส่วน ดังนั้นในการทดลองนี้จะนำสายพันธุ์ UV-28, UV-35, UV-93, UV-153, และ UV-155 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส ตามวิธีการทดลองที่ 4.3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.6) ควบคุมความเร็วรอบในการเขย่าที่ 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ตามวิธีการทดลองที่ 6.2 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6

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

สายพันธุ์	ปริมาณGA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร) *	
	อุณหภูมิ 25 °C	อุณหภูมิ 28 °C
N9-34	838	660
UV-28	614	713
UV-35	596	669
UV-93	537	545
UV-153	484	520
UV-155	415	460

* จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

จากตารางที่ 6 เมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าผลิต GA_3 ได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสังเกตเห็นว่าสายพันธุ์ UV-28 ผลิต GA_3 ได้มากที่สุดคือ 713 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสจะผลิต GA_3 ได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) ที่พบว่าการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ N9-34 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะมากกว่าอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และในการศึกษานี้ต้องการเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเป็น 28 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ UV-28 ซึ่งผลิต GA_3 ได้มากที่สุดเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG ต่อไป และในการทดลองครั้งต่อไปตลอด

การทดลองนี้ จะใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเชื้อและคัดเลือกสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

4. การปรับปรุงวิธีวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ขั้นปฐมภูมิด้วยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (High Performance Thin - layer Chromatography)

หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะต้องทำการคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูงขึ้น โดยจะทำการคัดเลือกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิ ซึ่งการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิจะต้องเป็นวิธีที่หาปริมาณ GA_3 อย่างคร่าวๆ สามารถทำได้คราวละมากๆ ซึ่ง สะดวกและรวดเร็ว แต่เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี TLC ไม่สามารถบอกปริมาณ GA_3 ได้ ดังนั้นจึงปรับปรุงวิธี TLC โดยนำแผ่น TLC ที่จุดตัวอย่างไปสแกนด้วย TLC-densitometer เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ได้อย่างคร่าวๆ ก่อนนำไปคัดเลือกขั้นทุติยภูมิโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งจะทราบทั้งชนิดและปริมาณ GA_3 ได้อย่างถูกต้องแน่นอน

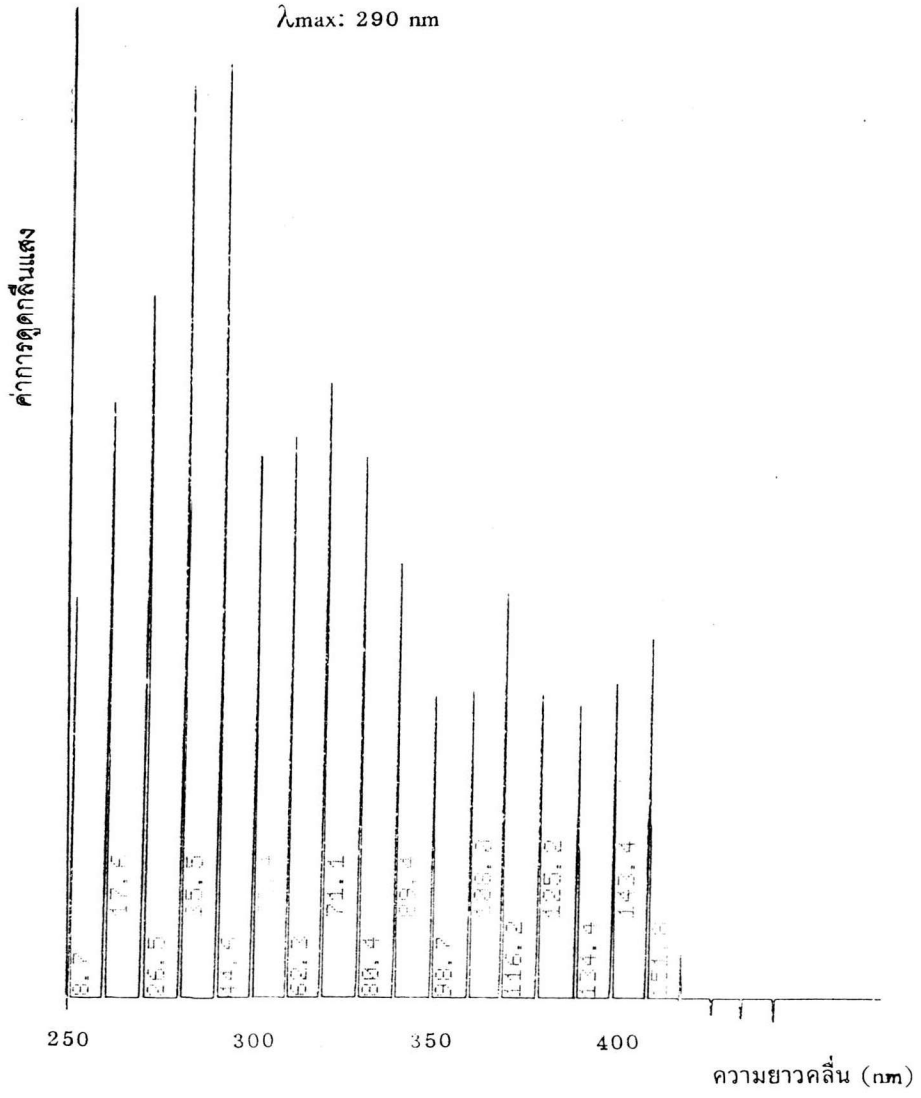
Sackett (1984) ได้รายงานการใช้วิธี TLC-densitometric ในการหาปริมาณ GA_3 ของน้ำหมักจากสายพันธุ์ต่างๆ ดังนั้นในการศึกษานี้จะปรับเปลี่ยนสภาวะให้เหมาะสม และพัฒนาวิธีนี้เพื่อใช้ในการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิให้มีประสิทธิภาพ

4.1 การหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก (λ_{max})

นำสารมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกมาละลายในเมทธานอล จากนั้นเอา

มาผ่านขั้นตอน TLC ตามวิธีการทดลองที่ 7.1 เมื่อผ่านการอบแล้วนำไปสแกนด้วยเครื่อง densitometer ตามวิธีการทดลองที่ 7.2 โดยสแกนตั้งแต่ความยาวคลื่น 250-450 นาโนเมตร โดยสแกนทีละ 10 นาโนเมตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7

จากผลการทดลองพบว่า สารมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ดังนั้นในการสแกนด้วยวิธี TLC-densitometric จะใช้ความยาวคลื่นสูงสุดค่านี้ในการทดลองตลอดการทดลอง



รูปที่ 7 พีคการสแกนหาค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกด้วยวิธี TLC-densitometric

4.2 ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูง โดยวิธี HPTLC เปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะต้องคัดเลือกเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงขึ้น โดยจะทำการคัดเลือก 2 ขั้นคือ ขั้นปฐมภูมิ และขั้นทุติยภูมิ ซึ่งขั้นปฐมภูมิในการคัดเลือกสายพันธุ์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเป็นการคัดเลือกด้วยวิธี TLC ซึ่งเป็นวิธีตรวจหาปริมาณ GA_3 คร่าวๆวิธีหนึ่ง โดยเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้น กับสายพันธุ์กลายพันธุ์โดยวิธีนี้ให้คะแนนด้วยสายตา สามารถแยกจุด GA_3 ที่มีความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์มากๆ ได้ แต่จะเกิดการผิดพลาดได้เมื่อความเข้มของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังสามารถลดจำนวนตัวอย่างได้มาก จากนั้นจึงพัฒนาวิธี TLC จากการดูความเข้มจุด GA_3 ด้วยสายตามาใช้เครื่อง TLC-densitometer อ่านความเข้ม ซึ่งเครื่องจะสแกนความเข้มจุด GA_3 เป็นพีคแล้วนำพื้นที่ใต้พีคที่ได้มาประเมินเป็นปริมาณ GA_3 โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน วิธีนี้อ่านค่าปริมาณ GA_3 ได้ระดับหนึ่งซึ่งดีกว่าการคาดคะเนปริมาณด้วยสายตา จากนั้นจึงคัดเลือกโดยการวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPLC ซึ่งเป็นการคัดเลือกขั้นสุดท้าย วิธีนี้จะวัดปริมาณ GA_3 ในน้ำหมักได้ถูกต้องแม่นยำกว่าโดยวัดเป็นหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

เพื่อเป็นการทดสอบว่าวิธีวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ทั้งวิธี TLC-densitometric และวิธี HPLC ให้ผลที่สอดคล้องกันหรือไม่ ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ในน้ำหมักซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธีทั้งสอง ใช้สายพันธุ์กลายพันธุ์ 50 สายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน(ภาคผนวกที่1.6) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี TLC-densitometric และ HPLC ตามวิธี

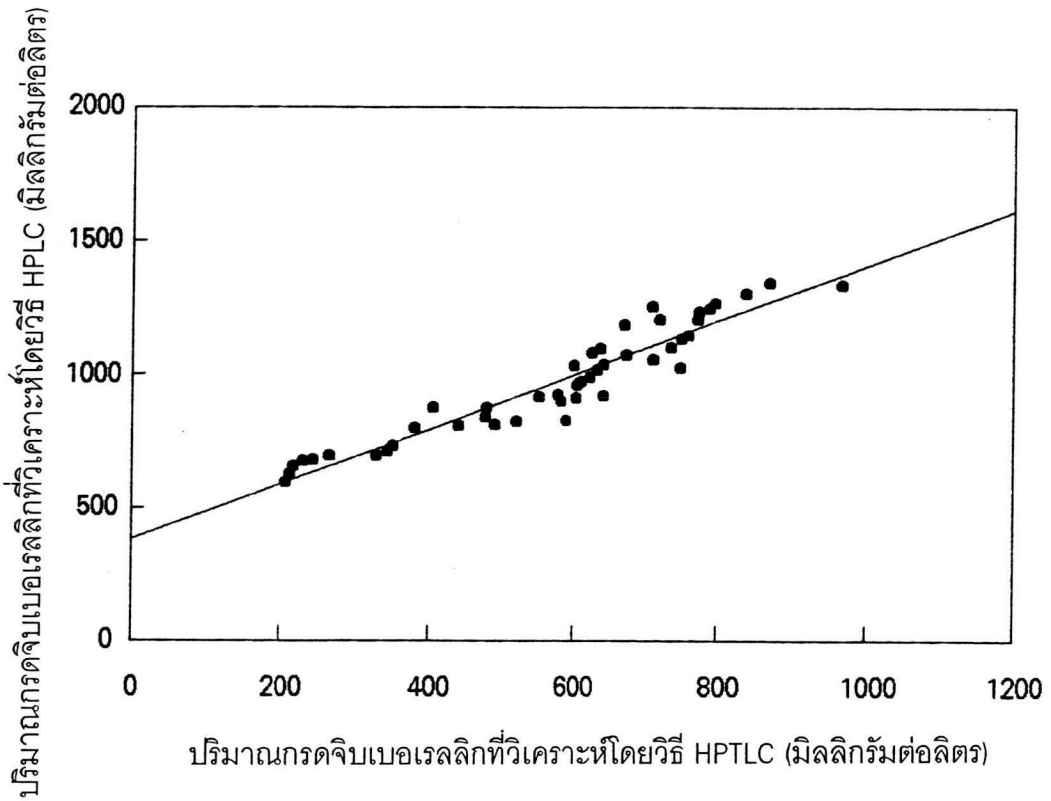
การทดลองที่ 7.2 และ 7.3 ตามลำดับ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 7 รูปที่ 8 และ 9

จากกราฟรูปที่ 8 จะเห็นว่าผลที่ได้โดยวิธีการวิเคราะห์ทั้งสองมีความสัมพันธ์กันมากโดยให้กราฟเป็นเส้นตรง โดยมีค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) (ภาคผนวกที่ 3.2) เท่ากับ 0.9545 ส่วนกราฟรูปที่ 9 จะเห็นว่าผลการวิเคราะห์ที่ได้โดยวิธีวิเคราะห์ทั้งสองมีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกัน ซึ่งปริมาณ GA_3 ที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี HPLC มีค่ามากกว่าปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPTLC ในทุกตัวอย่างโดยมีสัดส่วนความแตกต่างใกล้เคียงกัน ซึ่งปริมาณ GA_3 ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC ได้น้อย เนื่องจากในการหากราฟมาตรฐานสารมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกไม่ได้สกัด ซึ่งต่างกับตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ต้องสกัด แต่อย่างไรก็ตามวิธี HPTLC ก็ยังสามารถคัดสายพันธุ์ออกได้มาก ดังนั้นจึงใช้การวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPTLC ในการคัดเลือกสายพันธุ์ในขั้นปฐมภูมิ แล้วจึงใช้วิธี HPLC เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงอีกครั้งในขั้นทุติยภูมิเมื่อจำนวนสายพันธุ์ลดลงแล้ว

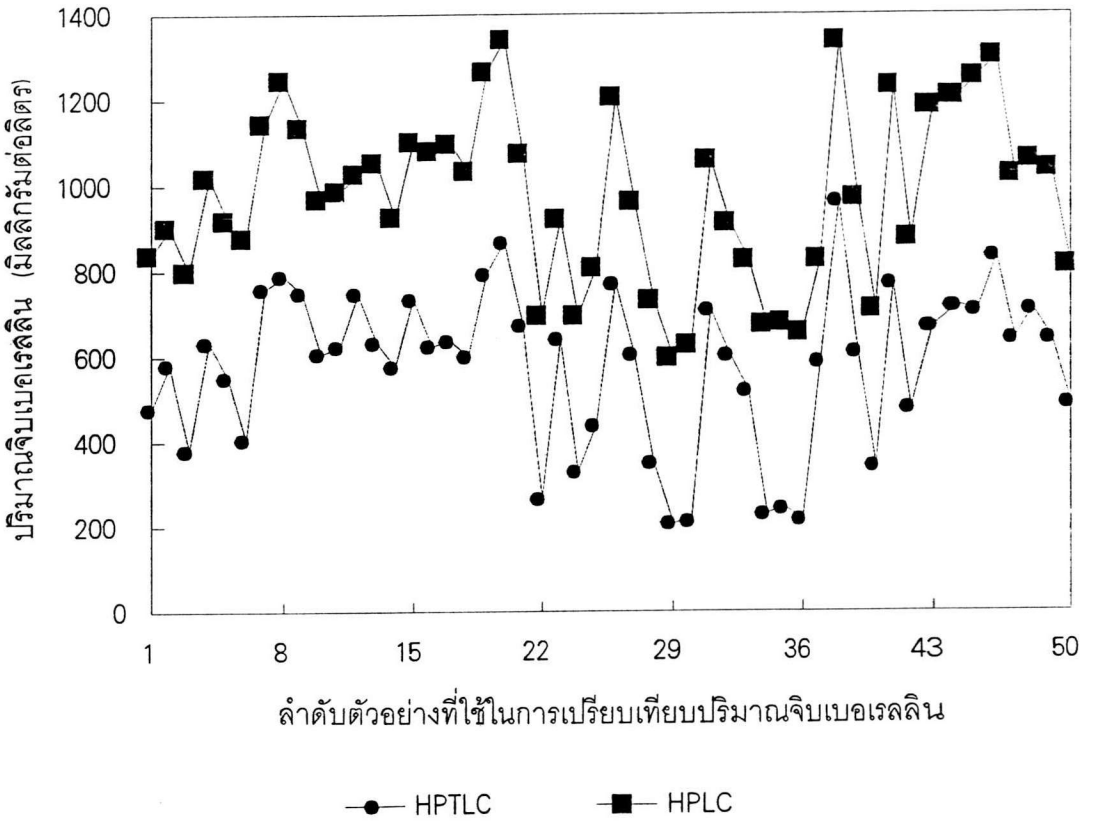
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตโดย *G.fujikuroi* 50 สายพันธุ์ วิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC และ HPLC

สายพันธุ์	ปริมาณ GA_3 (มก.ต่อ ล)*		สายพันธุ์	ปริมาณ GA_3 (มก.ต่อ ล.)*	
	HPTLC	HPLC		HPTLC	HPLC
1	477	839	26	771	1206
2	589	902	27	605	962
3	380	799	28	350	732
4	633	1018	29	208	597
5	551	918	30	213	627
6	405	877	31	710	1059
7	758	1145	32	603	913
8	788	1246	33	520	826
9	750	1135	34	230	675
10	605	968	35	243	679
11	623	987	36	297	656
12	748	1027	37	589	827
13	633	1053	38	964	1338
14	577	926	39	611	971
15	735	1102	40	343	711
16	625	1081	41	772	1233
17	637	1097	42	479	878
18	600	1034	43	670	1186
19	794	1266	44	718	1208
20	868	1341	45	708	1253
21	674	1075	46	836	1302
22	266	696	47	641	1025
23	641	922	48	710	1059
24	329	695	49	642	1039
25	439	808	50	490	813

* จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง



รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ของปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC และ HPLC



รูปที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC และ HPLC

5. การกลายพันธุ์ด้วย NTG และคัดเลือกสายพันธุ์

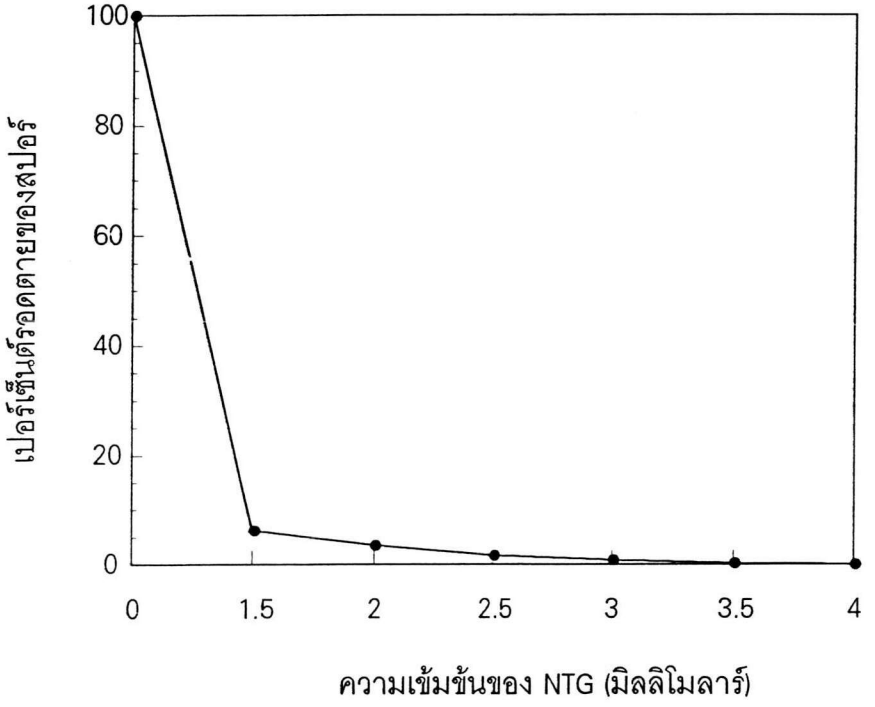
5.1 การชักนำให้สายพันธุ์ UV-28 เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG

NTGเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ดังนั้นในการวิจัยต่อไปจึงใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ โดยคาดว่าจะพบสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นได้

การชักนำให้เชื้อ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในผลการทดลองข้อ 2 คัดเลือกได้สายพันธุ์ UV-28 ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 713 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจาก UV-28 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิต GA_3 ได้ดีเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 28 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ UV-28 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG โดยปรับความเข้มข้นของ NTG เท่ากับ 0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 และ 4.0 มิลลิโมลาร์ ตามวิธีการทดลองข้อ 5.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เจริญและคำนวณเปอร์เซ็นต์รอดตาย ได้ผลดังตารางที่ 8 และรูปที่ 10

ตารางที่ 8 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซ็นต์รอดตายของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UV-28 หลังจากชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น NTG (มิลลิโมลาร์)	จำนวนสปอร์ที่เจริญ	เปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์
0	1.39×10^5	100
1.5	8.80×10^3	6.25
2.0	5.00×10^3	3.59
2.5	2.30×10^3	1.65
3.0	1.20×10^3	0.86
3.5	3.20×10^2	0.23
4.0	70	0.05



รูปที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์รอดตายของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UV-28 กับความเข้มข้นของ NTG

ความเข้มข้นของ NTG ที่เหมาะสมเป็นปัจจัยที่สำคัญของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ Calam (1970)ได้รายงานไว้ว่าในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์มักจะพบสปอร์ที่กลายพันธุ์เป็นจำนวนมากในช่วงความเข้มข้นของ NTG ที่ให้เปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์อยู่ระหว่าง 0 - 50 เปอร์เซ็นต์ และ Avalos และคณะ(1985)ได้รายงานไว้ว่าเมื่อใช้ NTG เป็นสารก่อการกลายพันธุ์ที่เปอร์เซ็นต์รอดตาย 14 เปอร์เซ็นต์ จะมีโอกาสพบออกโซโทรบ (Auxotroph) และสายพันธุ์กลายพันธุ์ในเปอร์เซ็นต์ที่สูง

จากตารางที่ 8 และรูปที่ 10 จะพบว่าที่ความเข้มข้น NTG 1.5 มิลลิโมลาร์ เปอร์เซ็นต์รอดของสปอร์จะลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น NTG เปอร์เซ็นต์รอดตายจะค่อยๆ ลดลง จากรายงานของจันทร์ธิรา ลัภยพร(2536) ได้กลายพันธุ์ *G. fujikuroi* ด้วย NTG 2 ครั้ง พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ได้สูงในกลุ่มของสปอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์รอดตาย 2.5 และ 2.7ดังนั้นในการทดลองนี้จะเตรียมความเข้มข้น NTG 2.2 มิลลิโมลาร์ซึ่งอยู่ในช่วง 2.0 - 2.5 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นความเข้มข้นของ NTG ที่ให้ค่าเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์อยู่ในช่วง 3.59 - 1.65 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่8)

จากการทดลองพบว่าสปอร์มีเปอร์เซ็นต์รอดตาย 2.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ต้องการ ดังนั้นจึงเก็บโคโลนีมา 546 โคโลนี สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะภายนอกได้ 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 จำนวน 508 โคโลนี เส้นใยยาวฟูสีขาว เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงสายพันธุ์ตั้งต้น

กลุ่มที่ 2 จำนวน 20 โคโลนี เส้นใยยาวฟูเล็กน้อย สีแดง

กลุ่มที่ 3 จำนวน 18 โคโลนี ลักษณะเป็นโคโลนีแห้งๆ สีส้ม เจริญช้า

จากการใช้ NTG ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าได้ผลการทดลองสอดคล้องกับ Koblin และคณะ(1990) ที่กล่าวว่า NTG สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกและสี (morphology and pigment) ของโคโลนี เช่น ลักษณะ

ผิวหน้าโคโลนีแห้ง เป็นโคโลนีเล็กๆ ไม่มีเส้นใย เป็นต้น เนื่องจากจันทร์ธิรา ลัภยพร (2536) ได้รายงานไว้ว่าสายพันธุ์ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้นมีแนวโน้มที่จะพบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ใกล้เคียงหรือมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นได้มากที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จะนำเอาสายพันธุ์กลุ่มที่ 1 ที่มีลักษณะภายนอกเหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้นไปเลี้ยงในอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า (ภาคผนวกที่ 1.6) และเลี้ยงตามวิธีการทดลองที่ 4.3.1 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 7 เพื่อคัดเลือกการผลิต GA_3 ขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิต่อไป

5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงขึ้น

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ 508 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3.1 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 โดยเปรียบเทียบความเข้มบนแผ่น TLC และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีระดับความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้สายพันธุ์ตั้งต้นมีความเข้มจุด GA_3 อยู่ในระดับ 2 จากการคัดเลือกด้วย TLC ทั้งหมด 508 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่มีความเข้มของจุด GA_3 อยู่ในระดับ 3 และ 4 ทั้งหมด 88 สายพันธุ์ จากนั้นนำแผ่น TLC ที่คัดไว้มาสแกนด้วย TLC-densitometer ตามวิธีการทดลองข้อ 7.2 พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 13 สายพันธุ์ จึงนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยนำน้ำหมักมาวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPLC พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 5 สายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของ*G.fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกกับสายพันธุ์ UV-28 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น

รหัสสายพันธุ์	ความเข้มจุด GA_3 บนแผ่น TLC	ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		HPTLC	HPLC
UV-28(C)	2	255	610
UN-79	4	362	771
UN-84	4	405	823
UN-148	3	262	699
UN-182	3	345	725
UN-184	3	366	724
UN-219	3	283	493
UN-255	3	304	605
UN-279	3	297	493
UN-280	3	268	677
UN-299	3	359	305
UN-306	4	469	849
UN-330	3	273	698
UN-339	3	256	650

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

ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายพันธุ์ต้องพิจารณาความเสถียรด้วย ดังนั้นในการทดลองนี้ได้นำ 5 สายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูง มาทดสอบความเสถียรในการผลิตกรด

จิบเบอเรลลิก โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งเอียงโพเทโตเด็กซ์โทรสทุกๆ 7 วัน เพาะเลี้ยงหลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และ 4 ในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.6) เพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองที่ 4.3.1 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง วิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการทดลองที่ 7.3 ได้ผลแสดงในตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่าเมื่อถ่ายเชื้อไป 4 ครั้ง การผลิต GA_3 ในการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ครั้งไม่ลดลง และเนื่องจากสายพันธุ์ UN-84 มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์ UN-84 เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG หลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และ 4

รหัสสายพันธุ์	ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)*	
	หลังถ่ายเชื้อครั้งที่ 2	หลังถ่ายเชื้อครั้งที่ 4
UV-28 (C)	610	724
UN-79	771	953
UN-84	823	981
UN-182	725	831
UN-184	724	829
UN-306	849	889

* จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

6. การกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์

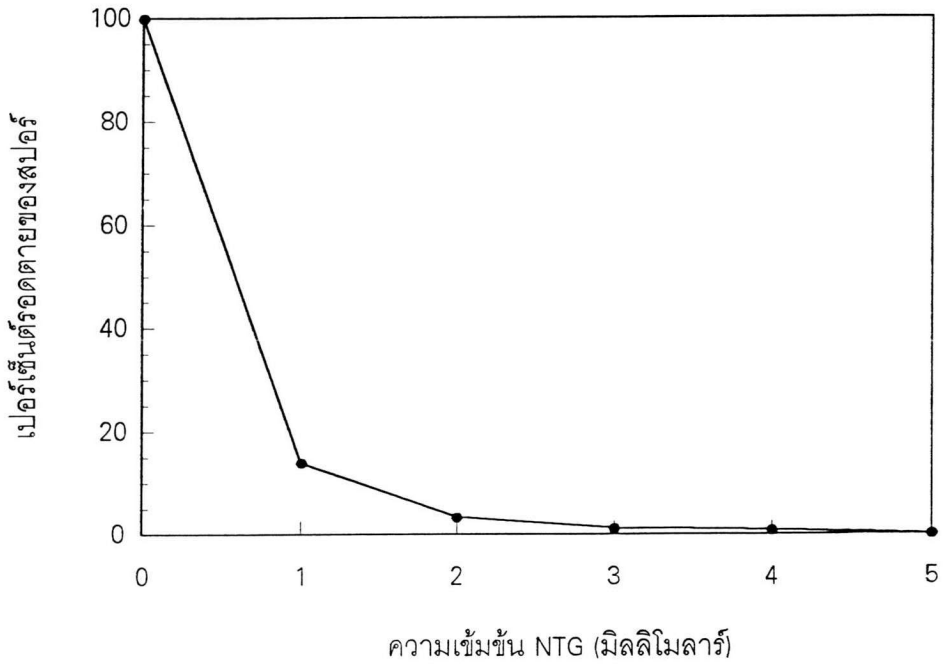
6.1 การชักนำให้สายพันธุ์ UN-84 เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG

จากผลการทดลองในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต สายพันธุ์ที่ได้จะผลิต GA_3 ได้ไม่คงที่ โดยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ 5 สายพันธุ์ หลังจากถ่ายเชื้อไป 3 ครั้ง(21 วัน) ปริมาณ GA_3 จะลดลงทุกสายพันธุ์โดยลดลงจาก 1165, 998, 1041, 1116 และ 1085 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 696, 576, 582, 483 และ 556 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในการกลายพันธุ์ครั้งต่อไปจึงเลือกใช้ NTG เป็นตัวชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ได้คัดเลือกสายพันธุ์ UN-84 ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เฉลี่ย 902 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลิตได้เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ UV-28 35.25 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงนำสายพันธุ์ UN-84 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 มิลลิโมลาร์ นำมากลายพันธุ์ตามวิธีการทดลองที่ 5.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับโคโลนีที่เจริญและคำนวณเปอร์เซ็นต์รอดตายได้ผลดังตารางที่ 11 และรูปที่ 11

ตารางที่ 11 จำนวนสปอร์ที่เจริญและเปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์สายพันธุ์ UN-84 ภายหลังการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น NTG	จำนวนสปอร์ที่เจริญ	เปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์
0	9.90×10^4	100
1.0	1.43×10^4	14
2.0	3.40×10^3	3.40
3.0	1.27×10^3	1.28
4.0	7.00×10^2	0.90
5.0	80	0.08



รูปที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์รอดตายของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UN-84 กับความเข้มข้นของ NTG

จากตารางที่ 11 และรูปที่ 11 จะพบว่ากราฟเปอร์เซ็นต์รอดตายของสายพันธุ์ UN-84 จะใกล้เคียงกับสายพันธุ์ UV-28 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและที่ความเข้มข้น NTG 1.0 มิลลิโมลาร์เปอร์เซ็นต์รอดของสปอร์จะลดลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้น NTG เปอร์เซ็นต์รอดตายจะค่อยๆ ลดลง และในการทดลองนี้เตรียมความเข้มข้น NTG 2.4 มิลลิโมลาร์ ซึ่งอยู่ในช่วง 2.0 - 3.0 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นความเข้มข้นของ NTG ที่ให้เปอร์เซ็นต์รอดตายของสปอร์อยู่ในช่วง 3.4 - 1.28 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)

จากการทดลองพบว่าสปอร์มีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย 2.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในช่วงที่ต้องการ ดังนั้นจึงเก็บโคโลนีแบบสุ่มมา 789 โคโลนี สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะภายนอกได้ 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 จำนวน 755 โคโลนี เส้นใยยาวฟูสีขาว เจริญเร็วมาก เหมือนหรือใกล้เคียงสายพันธุ์ตั้งต้น

กลุ่มที่ 2 จำนวน 5 โคโลนี ไม่มีเส้นใย โคโลนีเดี่ยวแห้งๆ สีครีม เจริญช้า

กลุ่มที่ 3 จำนวน 14 โคโลนี ไม่มีเส้นใย โคโลนีสีม่วง เจริญเร็วปานกลาง

กลุ่มที่ 4 จำนวน 15 โคโลนี เส้นใยสีส้ม การเจริญเร็ว

จากสายพันธุ์ที่เก็บมาจะนำเอาสายพันธุ์ที่เหมือนหรือใกล้เคียงกับสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะพบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ใกล้เคียงหรือมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นมากที่สุด (จันทร์ธิรา ลัภยพร, 2536) นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า (ภาคผนวกที่ 1.6) และเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองที่ 4.3.1 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อคัดเลือกการผลิต GA_3 ขั้นปฐมภูมิและทุติยภูมิต่อไป

6.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 สูงขึ้น

นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ 755 สายพันธุ์ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าตามวิธีการทดลองข้อ 4.3.1 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ด้วยวิธี TLC จากนั้นคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีระดับความเข้มจุด GA_3 บนแผ่น TLC มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ตามวิธีการทดลองข้อ 6.1 ซึ่งในการทดลองนี้กำหนดให้สายพันธุ์ตั้งต้นมีความเข้มจุด GA_3 อยู่ในระดับ 2 จากการคัดเลือกด้วยวิธี TLC ทั้งหมด 755 สายพันธุ์ พบสายพันธุ์ที่มีความเข้มของจุด GA_3 อยู่ในระดับ 3 และ 4 ทั้งหมด 133 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาสแกนด้วย TLC-densitometer ตามวิธีการทดลองข้อ 7.2 พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 17 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ โดยนำน้ำหมักมาหาปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPLC พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 12 สายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ 17 สายพันธุ์ที่คัดเลือกด้วยวิธี HPTLC และ HPLC

รหัสสายพันธุ์	ความเข้มบนแผ่น TLC	ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร)	
		HPTLC	HPLC
UN-84 (C)	2	510	932
UNN-105	3	516	937
UNN-122	3	540	798
UNN-181	3	513	793
UNN-295	3	891	967
UNN-456	3	591	1018
UNN-477	3	527	1008
UNN-506	3	626	995
UNN-507	4	753	1180
UNN-512	3	586	929
UNN-526	4	555	833
UNN-535	4	562	851
UNN-540	3	582	918
UNN-580	4	800	1201
UNN-627	4	721	1165
UNN-653	3	843	1143
UNN-656	3	785	1221
UNN-714	3	524	930

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

จากการคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ พบสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ตั้งต้นจำนวน 12 สายพันธุ์ นำ 5 สายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงมาทดสอบความ

เสถียรในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งเอียงโพเทโตเด็กซ์โทรสทุกๆ 7 วัน เพาะเลี้ยงหลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และครั้งที่ 4 ในอาหารสูตรสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.6) และเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองที่ 4.3.1 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง วิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการทดลองข้อ 7.3 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นว่าหลัง จากถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และครั้งที่ 4 การผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ UNN-507, UNN-580, UNN-627 และ UNN-653 เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ GA_3 ที่ผลิตได้ตอนคัดเลือกสายพันธุ์ไม่ลดลง แต่สายพันธุ์ UNN-656 ปริมาณ GA_3 ในการเพาะเลี้ยงหลังจากถ่ายเชื้อครั้งที่ 4 ลดลง ในจำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ สายพันธุ์ UNN-653 ผลิต GA_3 ได้ค่อนข้างมากที่สุด ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ UNN-653 เป็นสายพันธุ์ที่จะนำไปศึกษาการผลิต GA_3 ในระดับถังหมัก 5 ลิตรต่อไป

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วย NTG หลังจากการถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 และครั้งที่ 4

รหัสสายพันธุ์	ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก(มิลลิกรัมต่อลิตร)*	
	หลังถ่ายเชื้อครั้งที่	หลังถ่ายเชื้อครั้งที่
UNN-84 (C)	1039	813
UNN-507	1135	1283
UNN-580	1122	1233
UNN-627	1097	1205
UNN-653	1266	1302
UNN-656	1341	1025

* จากการทำซ้ำ 2 ครั้ง

7. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของสายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของอรไท สุขเจริญ(ศุภชัย สมัปปิโต,2537)

จากการศึกษาของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) ได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมในการผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่า พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน (ภาคผนวกที่ 1.6) แต่ต่อมาเมื่อใช้สูตรอาหารนี้ในการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าปริมาณ GA_3 ลดลงจาก 838 เป็น 347 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการหมัก ดังนั้น ศุภชัย สมัปปิโต(2537) จึงได้ปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญซึ่งได้เพิ่มปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วจาก 1.90 เป็น 5.90 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวกที่ 1.8)

ดังนั้นในการทดลองนี้จะเปรียบเทียบการผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่า ของ 5 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 สูง ซึ่งคัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG (ตารางที่ 13) โดยศึกษาในอาหารเหลวสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน 2 สูตรคือ สูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน (ภาคผนวกที่ 1.6) และสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ภาคผนวกที่ 1.8) เลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองที่ 4.3.1 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง นำมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก และปริมาณ GA_3 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วย NTG เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันและกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหาร ของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)

รหัสสายพันธุ์	แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน					
	กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน			กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว		
	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก.ต่อล.)	ปริมาณ GA_3 (มก.ต่อ ล.)	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก.ต่อล.)	ปริมาณ GA_3 (มก.ต่อ ล.)
UNN-507	3.28	37.99	1052	3.16	33.93	1120
UNN-580	3.32	37.31	1041	3.04	33.32	1263
UNN-627	3.19	39.30	1171	3.07	32.08	1265
UNN-653	3.14	37.01	1257	3.09	33.91	1358
UNN-656	3.21	37.28	1065	3.04	33.06	1291

จากตารางที่ 14 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-507, UNN-580, UNN-627, UNN-653 และ UNN-656 ในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วการเจริญของเชื้อต่ำ โดยดูได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งจะน้อยกว่าและค่าความเป็นกรดด่างจะต่ำกว่าสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน ส่วนการผลิต GA_3 พบว่าในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้มากกว่าสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยพบว่าสายพันธุ์ UNN-653 มีประสิทธิภาพ

ในการผลิต GA_3 สูงที่สุด จากนั้นจะนำสายพันธุ์ UNN-653 ไปใช้ในการศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินต่อไป

8. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก(GA_3) ของสายพันธุ์UNN-653 เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)

จากผลการทดลองที่ 7 พบว่าสายพันธุ์ UNN-653 มีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 สูงสุด ดังนั้นในการทดลองนี้จะเปรียบเทียบการเจริญและการผลิต GA_3 ในระดับขวดเขย่าของสายพันธุ์ UNN-653 โดยศึกษาในอาหารเหลวสำหรับการผลิต GA_3 2 สูตรคือ สูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน (ภาคผนวกที่1.6) และสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ภาคผนวกที่ 1.8) โดยเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 4.3.1 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักทุกวัน นำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ GA_3 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16 และรูปที่ 12 และ 13

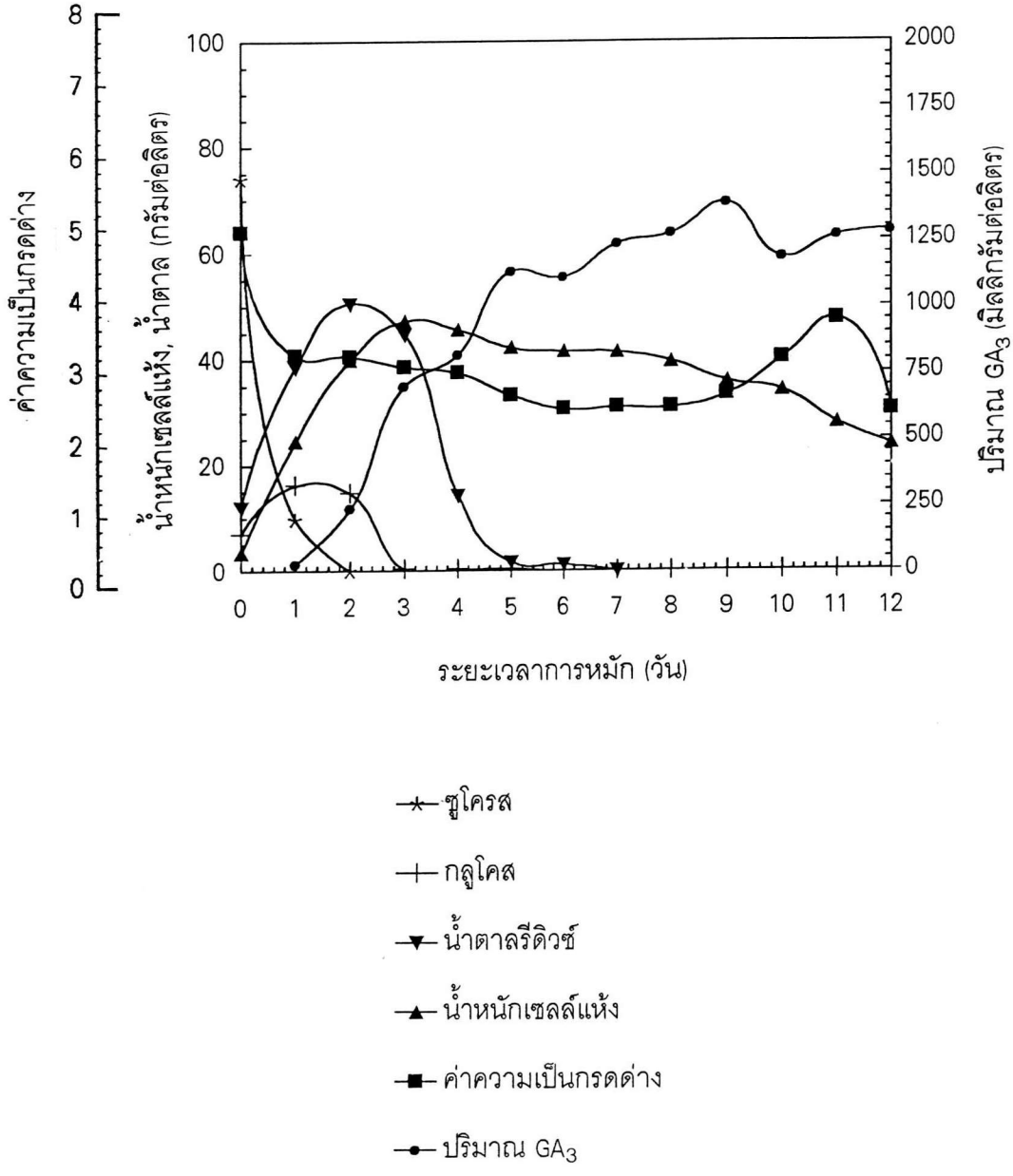
จากตารางที่ 15 และ 16 และรูปที่ 12 และ 13 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *G.fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนจะให้ผลผลิต GA_3 เท่ากับ 1,391 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อใช้เวลาในการหมักเพิ่มขึ้น พบว่าจะได้ผลผลิต GA_3 สูงสุด 1,611 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งปริมาณ GA_3 จะสูงกว่าการเลี้ยงในสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันเป็นแหล่ง

ไนโตรเจน ซึ่งได้ผลผลิต GA_3 สูงสุดเท่ากับ 1,390 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อจะเจริญในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็นแหล่งไนโตรเจนได้น้อยกว่าเมื่อเจริญในสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันคือน้ำหนักเซลล์แห้ง 36.83, 41.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการใช้น้ำตาลพบว่าในสูตรอาหารทั้ง 2 สูตรข้างต้น เชื้อใช้น้ำตาลหมดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าในการเลี้ยงเชื้อ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่านั้น สูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ให้ผลผลิต GA_3 สูงกว่าสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้สูตรอาหารกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 15 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. Fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกากเมล็ดฝ้ายย่อย ด้วยกรดกำมะถันตามสูตรของศุภชัย สมัปปิโต(2537)

วันที่	ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	98.13	7.05	12.15	3.53	6.41	-
1	32.72	16.28	38.62	4.61	4.08	-
2	0	14.76	50.64	39.90	4.06	238
3		0	44.73	47.22	3.86	700
4			14.35	45.65	3.75	819
5			1.69	42.23	3.33	1133
6			1.25	41.55	3.07	1112
7			0	41.42	3.10	1236
8				39.64	3.10	1276
9				35.92	3.34	1390
10				34.15	3.32	1185
11				27.99	3.06	1266
12				24.00	3.04	1284

หมายเหตุ: - คือปริมาณ GA_3 น้อยมาก

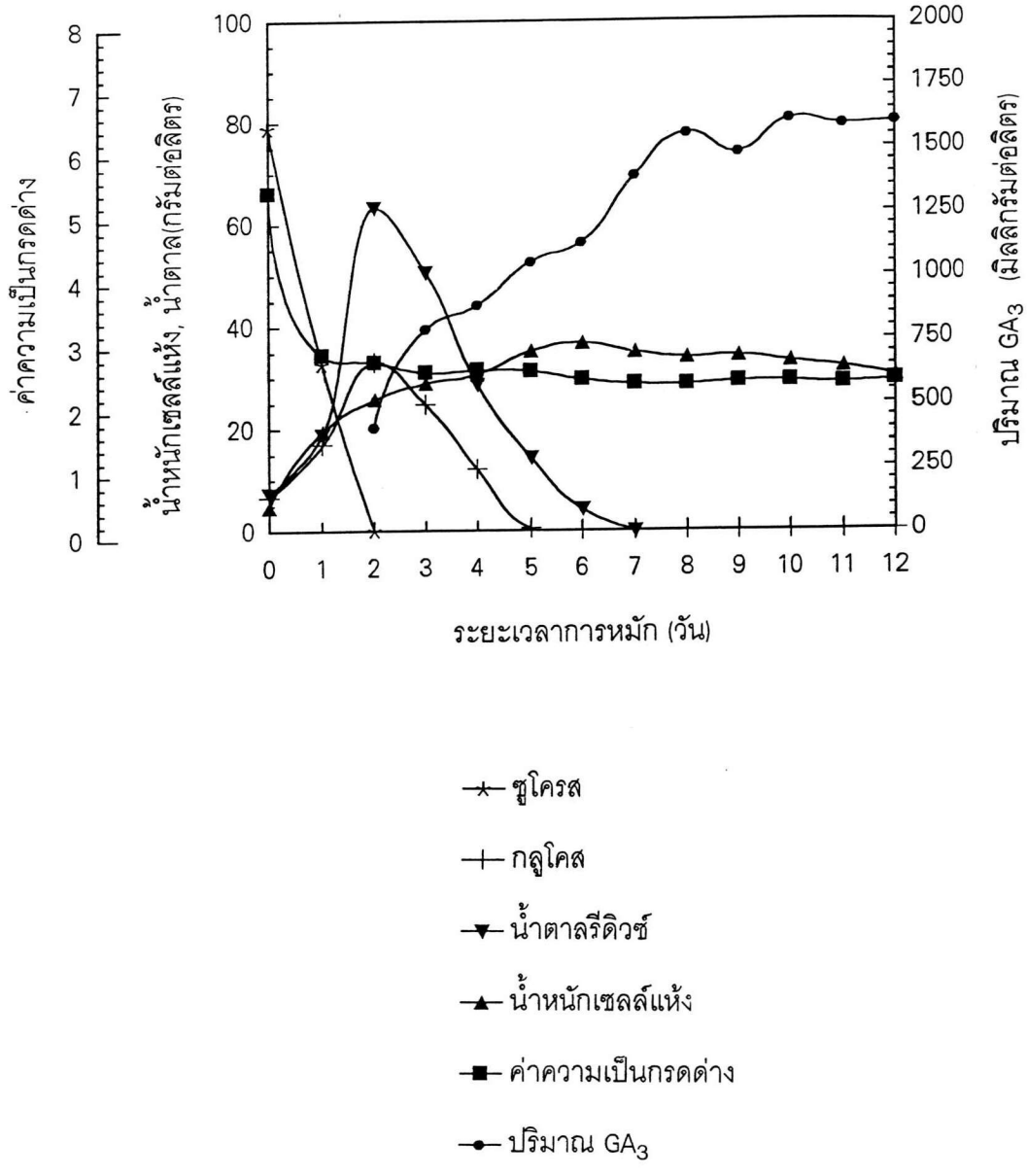


รูปที่ 12 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. Fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สารละลายกากเมล็ดฝ้ายย่อย ด้วยกรดกำมะถันตามสูตรของศุภชัย สมัปปิโต(2537)

ตารางที่ 16 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของอรไทสุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)

วันที่	ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	99.60	6.62	7.34	4.82	6.62	–
1	56.20	16.94	18.92	19.55	3.45	–
2	0	32.98	63.30	25.78	3.30	408
3		24.74	50.64	28.95	3.11	792
4		12.04	28.70	30.71	3.15	885
5		0	14.35	35.21	3.13	1054
6			4.22	36.83	2.97	1131
7			0	35.05	2.88	1391
8				34.00	2.87	1557
9				34.27	2.92	1481
10				33.20	2.93	1611
11				32.10	2.90	1592
12				30.31	2.94	1603

หมายเหตุ: – คือปริมาณ GA_3 น้อยมาก



รูปที่ 13 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)

9. เปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ การใช้น้ำตาล น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกและสีน้ำหมักของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ UNN-653 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน ระดับขวดเขย่า

นำเชื้อ *G.fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ UNN-653 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพเพิ่มมากที่สุด มาเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ ลักษณะสปอร์ สีน้ำหมัก การใช้น้ำตาล น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และการผลิต GA_3 โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งเอียงโพเทโตเด็กซ์โทรส 7 วัน และอาหารแข็งเอียงอะซิเตต 7 วัน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน ที่ใช้กากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ตามวิธีการทดลอง 4.3.1 เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 12 วัน นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก ปริมาณน้ำตาล และปริมาณ GA_3 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 17 และ 18 และรูปที่ 14 และ 15

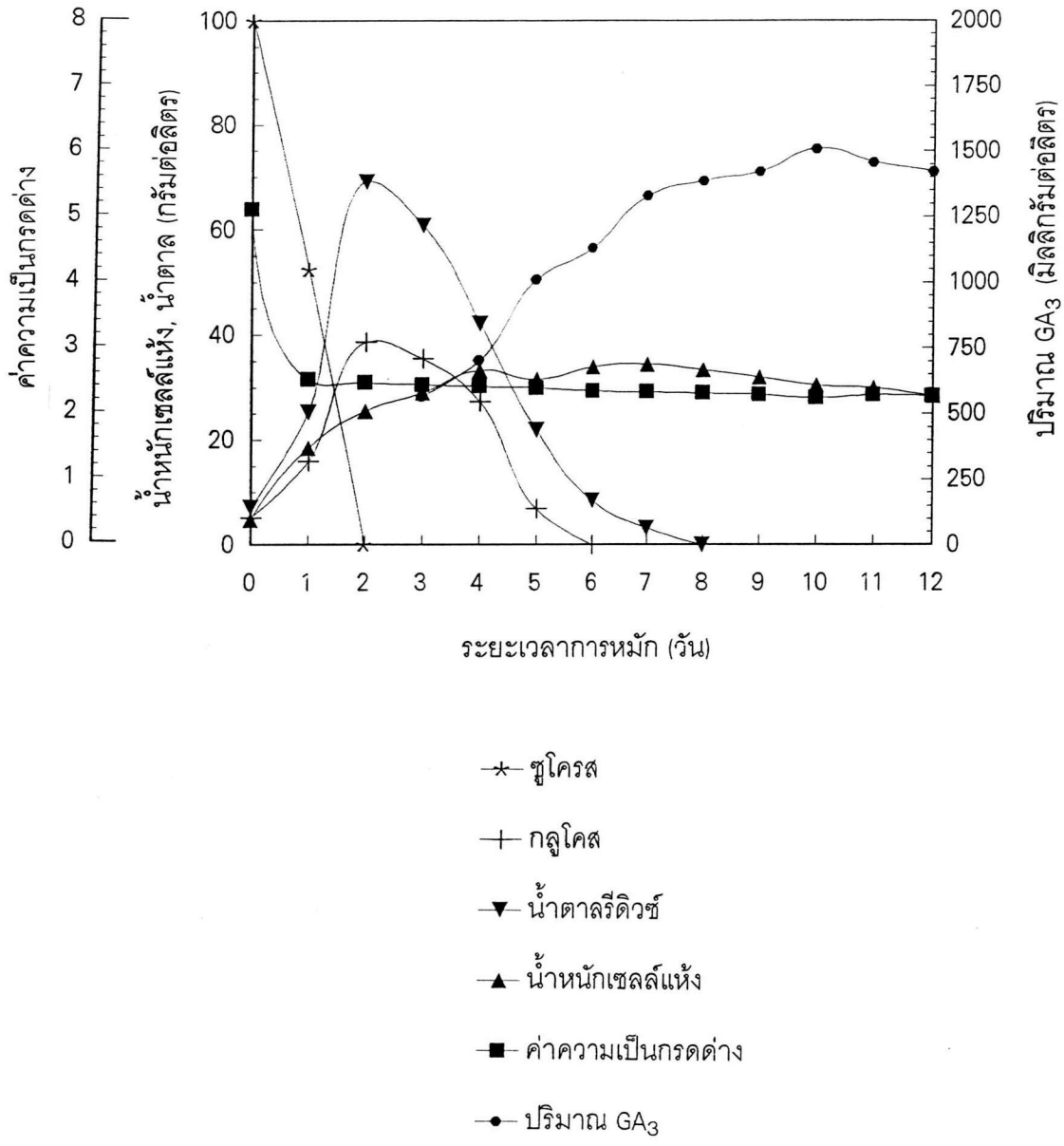
จากตารางที่ 17 และ 18 และรูปที่ 14 และ 15 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ N9-34 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์หมดวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนสายพันธุ์ UNN-653 ใช้น้ำตาลหมดช้ากว่าคือวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และน้ำหนักเซลล์แห้งสายพันธุ์ N9-34 และ UNN-653 ใกล้เคียงกัน โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 34.77, 34.42 กรัมต่อลิตรตามลำดับ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างของทั้งสองสายพันธุ์จะลดลง อย่างชัดเจนตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง โดยสายพันธุ์ UNN-653 มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำกว่าสายพันธุ์ N9-34 จาก

การวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 พบว่าการผลิต GA_3 ทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจนสายพันธุ์ N9-34 ผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงผลิตได้ 998 มิลลิกรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นปริมาณ GA_3 ค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนสายพันธุ์ UNN-653 การผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงผลิตได้ 1330 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อใช้เวลาในการหมักนานขึ้นพบว่าให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด 1510 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งปริมาณ GA_3 ของสายพันธุ์ UNN-653 จะสูงกว่าสายพันธุ์ N9-34 ดังแสดงในรูปที่ 16 จากนั้นเมื่อดูสีน้ำหมักของสายพันธุ์ N9-34 เป็นสีแดงอ่อน ส่วนสายพันธุ์ UNN-653 เป็นสีเหลืองอ่อนดังแสดงในรูปที่ 17 และจากการดูลักษณะภายนอกของเซลล์บนอาหารแข็งเอียงโพเทโตเด็กซ์โทรส พบว่าเชื้อ 2 สายพันธุ์นี้ไม่แตกต่างกัน โดยมีลักษณะเส้นใยฟูสีขาวดังแสดงในรูปที่ 18 ส่วนลักษณะสปอร์เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยระบบ Nomarski DIR (differential interference contrast) กำลังขยาย 200 เท่า ได้ภาพถ่ายดังแสดงในรูปที่ 19 จะเห็นว่าลักษณะสปอร์ไม่แตกต่างกัน รูปร่างค่อนข้างรี มีทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่

ตารางที่ 17 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิต โดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของอรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)ในระดับขวดเขย่า

วันที่	ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	99.79	5.22	7.17	4.75	6.39	–
1	52.33	15.89	25.32	18.46	3.15	–
2	0	38.59	69.21	25.30	3.09	–
3		35.41	67.77	28.97	3.05	568
4		27.24	42.20	33.25	3.02	705
5		6.81	21.94	31.59	2.97	1012
6		0	8.44	33.88	2.93	1132
7			3.21	34.42	2.91	1330
8			3.21	33.31	2.89	1388
9			0	31.93	2.86	1423
10				30.42	2.80	1510
11				29.92	2.86	1458
12				28.33	2.83	1423

หมายเหตุ : – คือปริมาณ GA_3 น้อยมาก

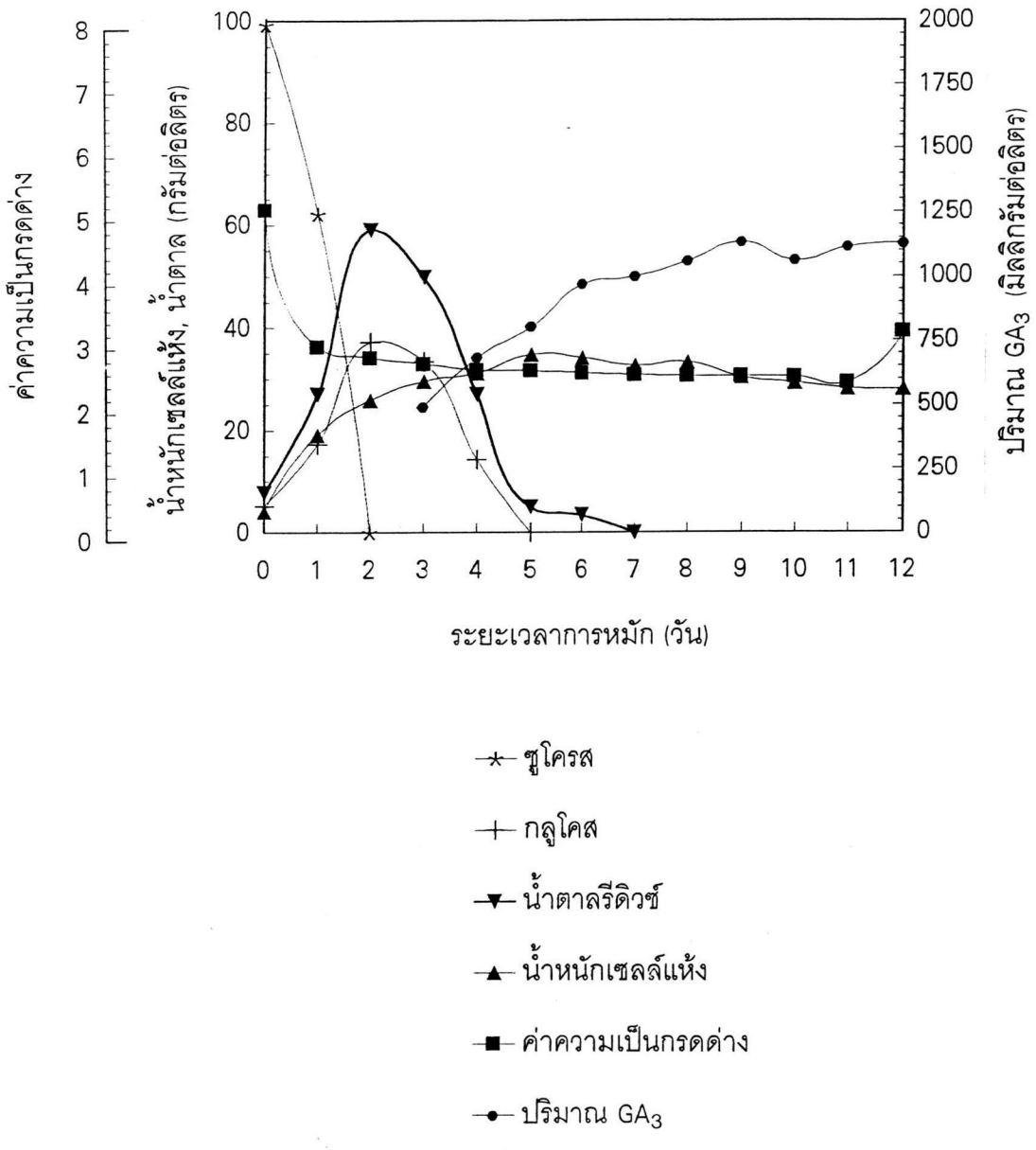


รูปที่ 14 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิต โดย *G.fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ในระดับขวดเขย่า

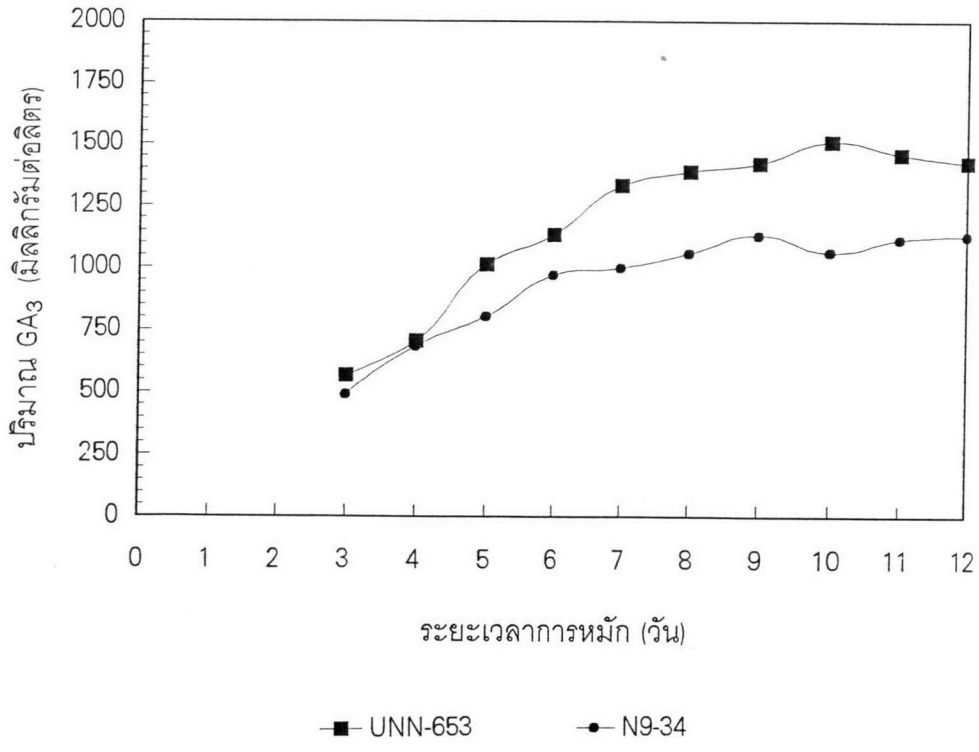
ตารางที่ 18 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ในระดับขวดเขย่า

วันที่	ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)
0	99.23	5.22	7.76	4.09	6.29	–
1	62.16	17.25	27.00	19.09	3.63	–
2	0	37.23	59.08	25.92	3.42	–
3		33.37	49.80	29.58	3.30	492
4		14.30	27.01	31.19	3.18	684
5		0	5.06	34.77	3.16	803
6		0	3.38	34.16	3.12	968
7			0	32.62	3.08	998
8				33.25	3.05	1058
9				31.30	3.05	1132
10				29.25	3.04	1062
11				29.92	2.94	1114
12				28.21	2.92	1129

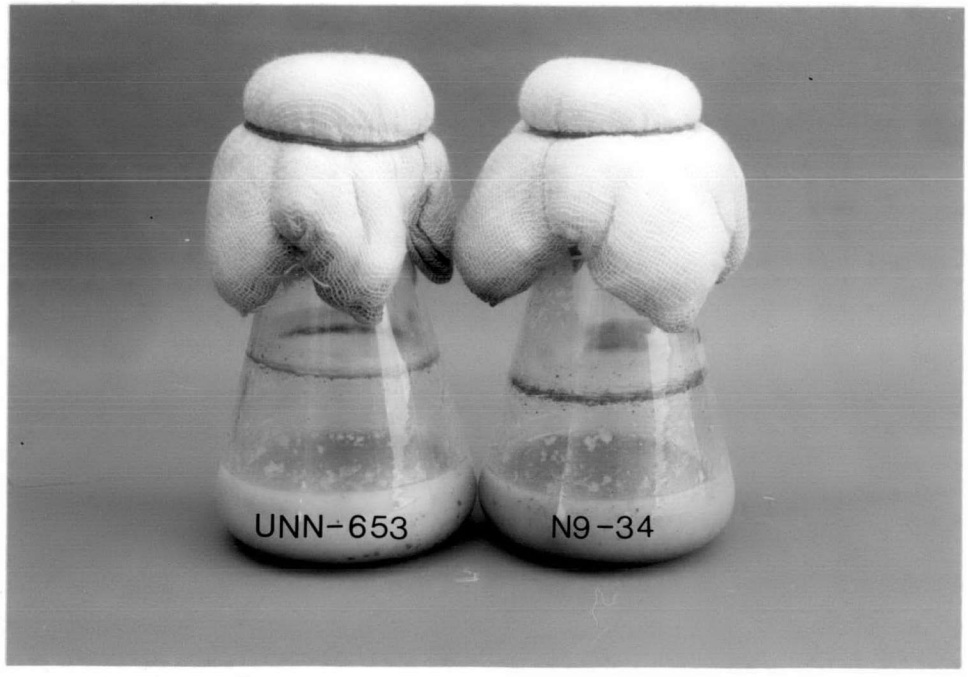
หมายเหตุ : – คือปริมาณ GA_3 น้อยมาก



รูปที่ 15 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว โดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537) ในระดับขวดเขย่า

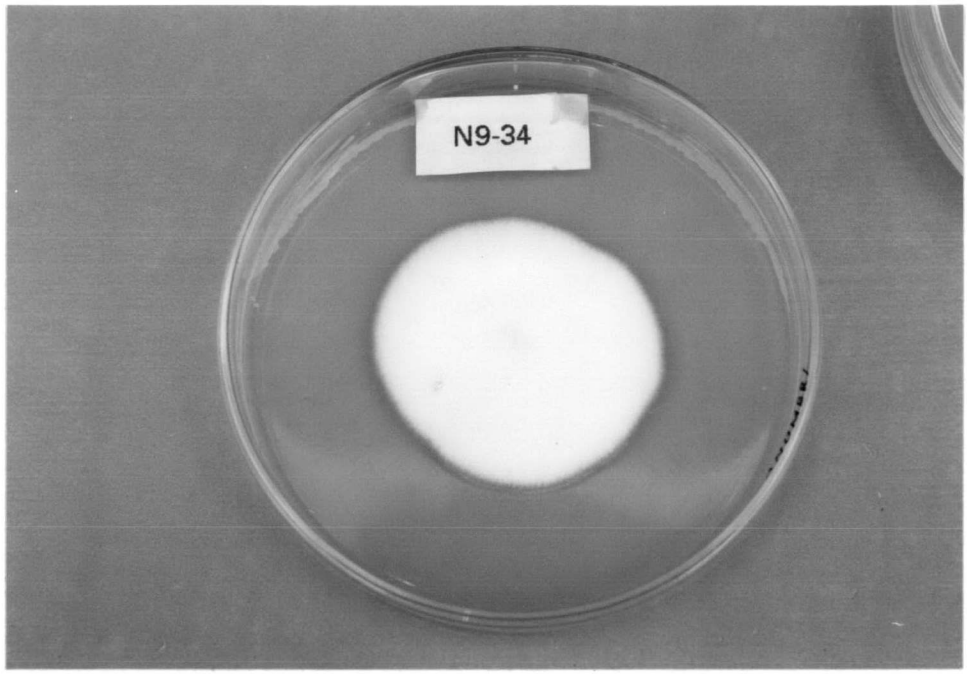


รูปที่ 16 ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ N9-34 และ UNN-653 ในระดับขวดเขย่า

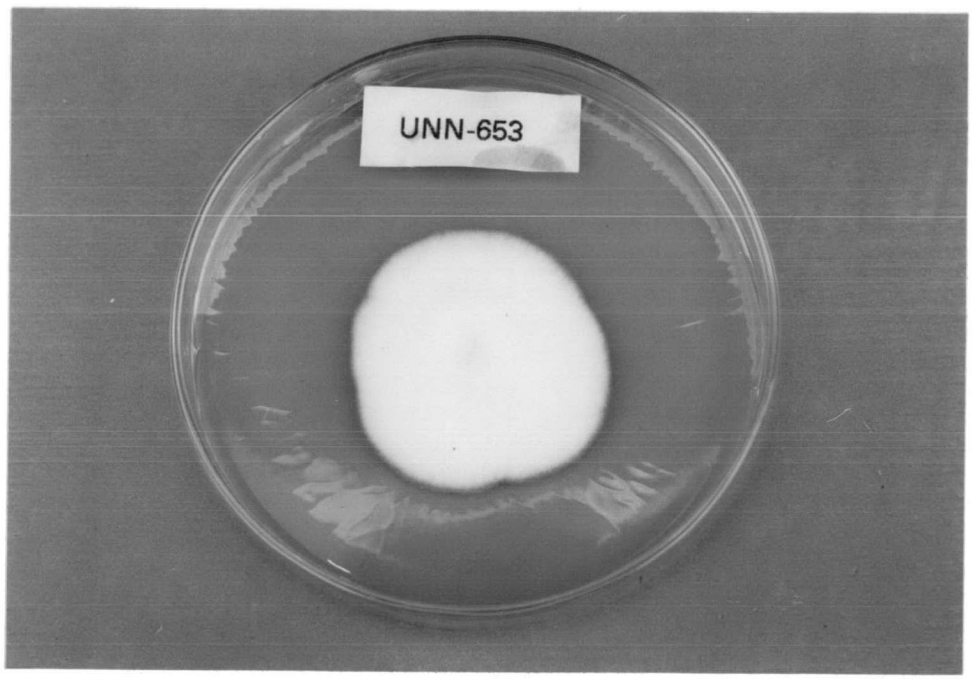


รูปที่ 17 เปรียบเทียบสีน้ำหมักอายุ 7 วันของสายพันธุ์ N9-34 และ UNN-653

รูปที่ 18 ลักษณะของเชื้อ *G. fujikuroi* ที่เจริญบนอาหารโพเทโตเด็กซ์โทรส อาการ์เสริมแร่ธาตุ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน

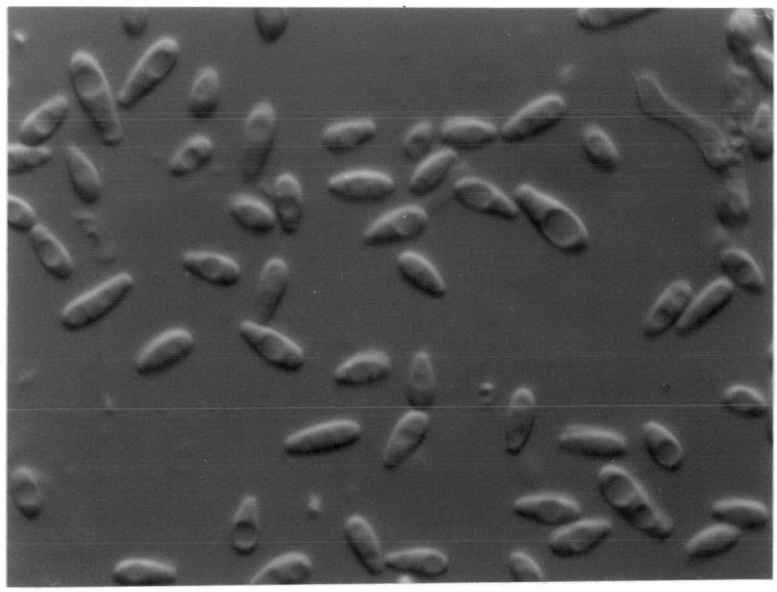


ก. สายพันธุ์ N9-34

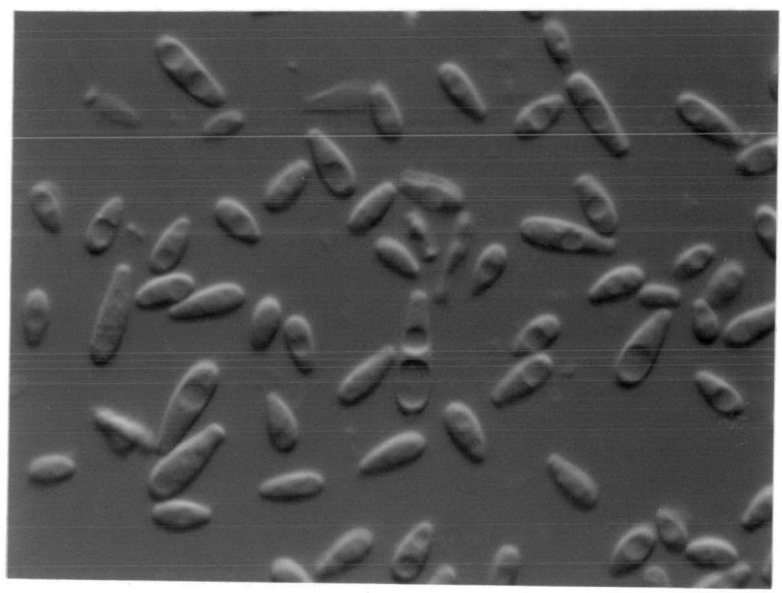


ข. สายพันธุ์ UNN-653

รูปที่ 19 ลักษณะของสปอร์ที่เจริญบนอาหารแข็งเอียงอะซิเตต บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อายุ 7 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยระบบ Nomarski DIR กำลังขยาย 200 เท่า



ก. สายพันธุ์ N9-34



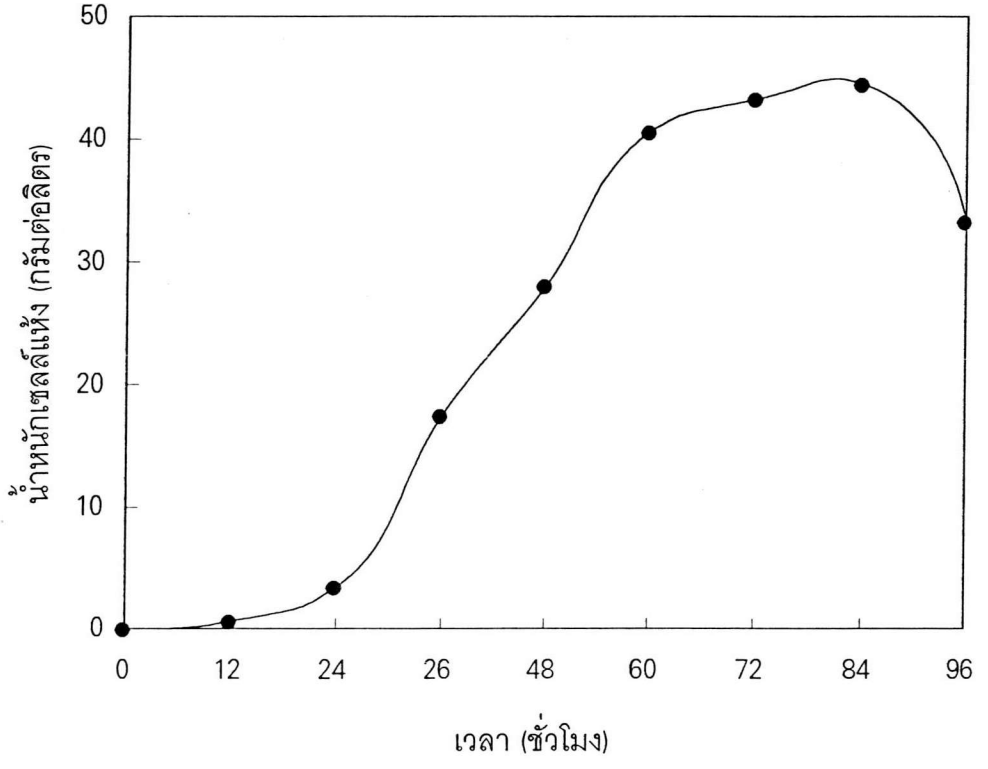
ข. สายพันธุ์ UNN-653

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

จากการศึกษาของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) ในการหาอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ N9-34 พบว่าเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะกึ่งกลางช่วงทวีคูณที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ส่วนรายงานของ อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ F4W-6(9) พบว่าเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะกึ่งกลางช่วงทวีคูณที่เวลา 60 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง การเจริญของเชื้อ N9-34 เร็วกว่าเชื้อ F4W-6(9) เนื่องจากว่าสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ N9-34 เป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน ซึ่งจะมีอินทรีย์ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารโมเลกุลเล็ก เช่น กรดอะมิโนอิสระ หรือเปปไทด์สายสั้นๆ ดังนั้นเชื้อจึงนำไปใช้ได้ง่ายกว่าสูตรอาหารของอัครวิทย์ กาญจนโอภาษ(2536) ที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เนื่องจาก UNN-653 เป็นสายพันธุ์กลายพันธุ์จากสายพันธุ์ N9-34 ดังนั้นจึงหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมของสายพันธุ์ UNN-653 โดยเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารเตรียมหัวเชื้อของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) (ภาคผนวกที่1.5) อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักที่ 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 และ 96 ชั่วโมง และหาน้ำหนักเซลล์แห้งดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 20

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

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.00
12	0.60
24	3.42
36	17.42
48	32.03
60	40.58
72	43.23
84	44.47
96	33.26



รูปที่ 20 รูปแบบการเจริญของ *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

จากรูปที่ 20 เมื่อดูรูปแบบการเจริญพบว่า การเจริญระยะกึ่งกลางช่วงทวีคูณของเชื้อคือ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 32.02 กรัมต่อลิตร หลังจาก 60 ชั่วโมงเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วงคงที่ และจากการศึกษาของศุภชัย สมัปปิโต(2537) นำหัวเชื้อที่มีอายุ 36 ถึง 60 ชั่วโมงพบว่ามีผลต่อการผลิต GA_3 ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปเพื่อศึกษาการผลิต GA_3 ในระดับถังหมัก 5 ลิตรจะใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 48 ชั่วโมง

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

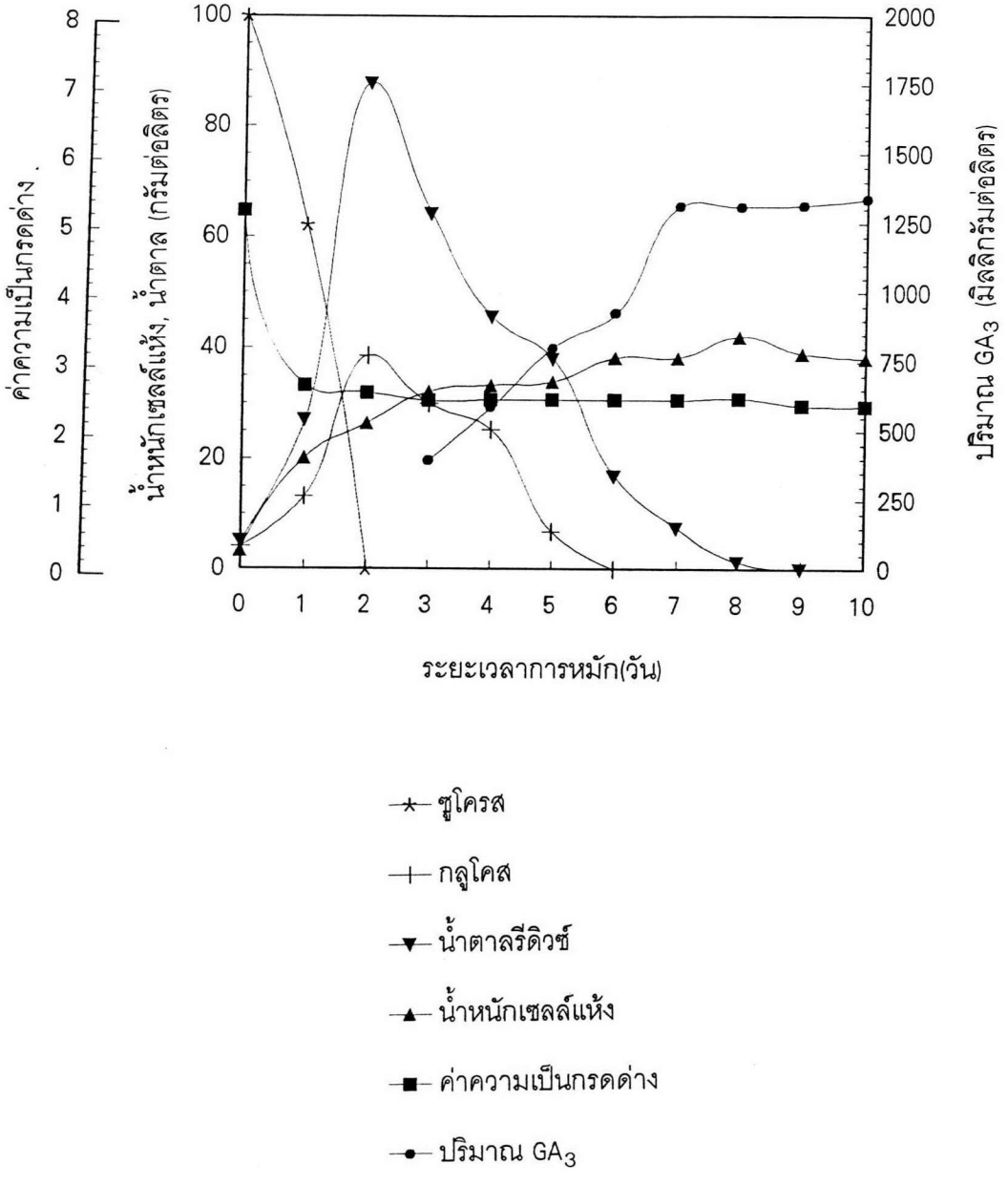
จากการทดลองที่ผ่านมา *G. fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 ได้มากที่สุดเท่ากับ 1,391 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่าในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (ภาคผนวกที่1.8) ดังนั้นจึงทำการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์นี้ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อายุหัวเชื้อ 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที เก็บน้ำหมักทุกวันเป็นเวลา 10 วัน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก และการใช้น้ำตาลได้ผลตามตารางที่ 20 และรูปที่ 21 จะเห็นว่าเชื้อมีการเจริญดีโดยที่น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ โดยที่น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 42.11 กรัมต่อลิตร พร้อมๆกับมีการใช้น้ำตาล พบว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จะหมดวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะเดียวกันเซลล์จะสลายเป็นผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งลดลง ลักษณะสีน้ำหมักเป็นสีเหลือง (รูปที่ 22) ส่วนการผลิต GA_3 จะผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

ผลิตได้ 1310 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานขึ้น พบว่าให้ผลผลิต GA_3 สูงสุด 1337 มิลลิกรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าการผลิต GA_3 ในวันที่ 7 น้อยกว่าในระดับขวดเขย่าประมาณ 5.90 เปอร์เซ็นต์

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

วันที่	ซูโครส (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณ GA_3 (มิลลิกรัม
0	105.05	4.09	5.06	3.38	6.48	–
1	62.16	13.17	27.00	20.17	3.32	–
2	0	38.59	87.78	26.42	3.19	–
3		29.97	64.14	32.10	3.05	396
4		25.20	45.58	33.25	3.06	586
5		6.81	27.98	33.90	3.06	799
6		0	16.88	38.24	3.06	925
7			7.43	38.32	3.06	1310
8			1.35	42.11	3.09	1309
9			0	39.04	2.96	1313
10				38.95	2.95	1337

หมายเหตุ: – คือปริมาณ GA_3 น้อยมาก



รูปที่ 21 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณ GA_3 ที่ผลิตโดย *G.fujikuroi* สายพันธุ์ UNN-653 ในระดับถังหมัก 5 ลิตร

รูปที่ 22 แสดงสีน้ำหมักการผลิตจิบเบอเรลลิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

12. การเปรียบเทียบการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก(GA_3)ระหว่างสายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ ด้วยแสง UV และ NTG 2 ครั้ง เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)

หลังจากชักนำให้ *G. fujikuroi* เกิดการกลายพันธุ์แล้ว เพื่อเปรียบเทียบการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ N9-34 กับสายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และ NTG จะต้องเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกัน ซึ่งในการวิจัยนี้ในขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์ ใช้อาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลินโดยใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน (ภาคผนวกที่ 1.6) เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน แต่ต่อมาพบว่าสูตรอาหารผลิตจิบเบอเรลลินที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต ,2537)(ภาคผนวกที่ 1.8) มีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 ดีกว่า ดังนั้นจึงได้นำสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงสุดของแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน 2 สูตรคือ สูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน และสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน โดยเลี้ยงเชื้อตามวิธีการทดลองที่ 4.3.1 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เก็บน้ำหมักในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง นำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วัดค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมัก และปริมาณ GA_3 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ของ *G. fujikuroi* ระหว่างสายพันธุ์ N9-34 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นกับสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในแต่ละขั้นตอน การกลายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน และกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วโดยปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ (ศุภชัย สมัปปิโต,2537)

รหัสสายพันธุ์	แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน					
	กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน			กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว		
	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก.ต่อล.)	ปริมาณ GA_3 (มก.ต่อ ล.)	ค่าความเป็นกรดด่าง	น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก.ต่อล.)	ปริมาณ GA_3 (มก.ต่อ ล.)
N9-34	3.27	40.57	577	2.98	35.91	1025
↓						
UV-28	3.29	43.91	701	2.95	36.74	1095
↓						
UN-84	3.21	42.42	909	3.01	35.23	1051
↓						
UNN-653	3.23	42.91	1275	3.03	35.11	1396

จากตารางที่ 21 เมื่อเลี้ยง *G. fujikuroi* สายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้แต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์ในสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว เนื่องจากกากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันซึ่งมีอินทรีย์ไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารโมเลกุลเล็ก ดังนั้นเชื้อจึงนำไปใช้ได้ง่าย และค่าความเป็นกรดด่าง

ของน้ำหมักมีความเป็นกรดด่างสูงกว่าในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ที่ผลิตได้ในสูตรอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถัน พบว่าปริมาณ GA_3 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละขั้นตอนการกลายพันธุ์ เริ่มตั้งแต่สายพันธุ์ N9-34, UV-28, UN-84 และ UNN-653โดยผลิต GA_3 ได้ 577, 701, 909 และ 1275 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว สายพันธุ์ N9-34, UV-28 และ UN-84 ปริมาณ GA_3 ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นสายพันธุ์ UNN-653 ที่ผลิต GA_3 ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ คือผลิตได้ 1396 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามทุกสายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วจะผลิต GA_3 ได้มากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากเมล็ดฝ้ายย่อยด้วยกรดกำมะถันเป็นสารแหล่งไนโตรเจน