

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- จันทร์ธิดา ลักยพร. 2536. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi* เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์
- พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร : ไดนามิกส์การพิมพ์.
- มนตรี จุฬาวัดนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ม.ร.ว. ชัยณัฐ สวัสดิวัฒน์, ประหยัด โกมาทัต, ประพนธ์ วิไลรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม, และภิญโญ พานิชพันธ์. 2530. ชีวเคมี. กรุงเทพมหานคร : ห้างหุ้นส่วนจำกัด ศ.ส.
- วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์. 2532. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อราจิบเบอเรลลา ฟุจิกูรอย ซี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ศุภชัย สมป์ปิโต. 2537. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดย *Gibberella fujikuroi* N9-34. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุภาพร พรพรหมกุล. 2533. การสกัดแยกและการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักของเชื้อ *G. fujikuroi*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรไท สุขเจริญ. 2533. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อัศววิทย์ กาญจนโอภาส. 2536. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดย *Gibberella fujikuroi* F4W-6(9). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Aiba, S., Humphrey, A.E. and Mills, N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2nd ed. New York : Academic Press.

- Albone, K.S., Gaskin, P., Macmillan, J., and Sponsel, V.M. 1984. Identification and localization of gibberellins in mature seed of the curcubit *Sechium edule* and a comparison between this curcubit and legume *Phaseolus coccinens*. Planta, 162 : 560-565.
- Atkinson, B., and Mavituna, F. 1989. Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook : 2nd ed. New York : Stockton Press.
- Bartholonew, W.H. 1960. Scale-up of submerged fermentations. Adv. Appl. Microbiol. 2 : 289-300.
- Bearder, J.R., MacMillan, J., and Phinney, B.O. 1975. Fungal products. XIV. Metabolic pathway from ent-kaurenoic acid to the fungal gibberellina in mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1: 721-726.
- Bernfeld, P. 1955. Amylases, α and β . In P.S. Colowick and O.N. Kaplan. (eds.), Method in Enzymology , Vol. 1 pp. 149. New York : Academic Press.
- Birch, A.J., Richards, R.W., Smith, H., Harris, A., and Whalley, W.B. 1959. Studies in relation to biosynthesis. XXI. Rosenolactone and gibberellic acid. Tetrahedron, 7 : 241-251.
- Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E.G., Kessell, R.H.J., Lloyd, E.C., Lloyd, P.B., Rothwell, A., Rothwell, B., and Swait, J.C. 1964a. Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. Can. J. Microbiol. 10 : 407-444.
- _____, Brown, S., Jefferys, E.G., Kessell, R.H.J., Lloyd, E.C., Lloyd, P.B., Rothwell, A., Rothwell, B., and Swait, J.C. 1964b. The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. Can. J. Microbiol. 10 : 407-444.
- _____, Jefferys, E.G., and Nixon, I.S. 1959a. Process of producing gibberellic acid by two stage cultivation of *Gibberella fujikuroi*. U.S. Patent 2,906,670.
- _____, Jefferys, E.G., and Nixon, I.S. 1959b. Process of producing gibberellic acid by cultivation of *Gibberella fujikuroi*. U.S. Patent 2,906,671.
- Bruckner, B., and Blechschmidt, D. 1991a. The gibberellin fermentation. Crit. Rev. Biotech. 11(2) : 163-192.
- _____, and Blechschmidt, D. 1991b. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35 : 646-650.
- _____, and Blechschmidt, D., Sembdner, G., and Schneiger, G. 1989. Fungal gibberellin production. In E.S. Vandamme (ed.), Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors, pp. 383-429. London : Elsevier Applied Science.

- Calam, C.T. 1969. The evaluation of mycelial growth. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (eds.), Methods in Microbiology, pp. 567. New York : Academic Press.
- Charles, M. 1985. Fermenter design and scale-up. In C.L. Cooney, and A.E. Humphrey (eds.), Comprehensive Biotechnology, vol. 2 pp. 57-75. New York : Programon Press.
- Corey, E.J., Danheiser, R.L., Chandraeharan, S., Keck, G.E., Gobalan, B., Larsen, S.D., Siret, P., and Gras, J.L. 1978. Stereospecific total synthesis of gibberellic acid. J. Am. Chem. Soc. 100 : 8034-8036.
- Coss, B.E., and Hanson, J.R. 1963. A new gibberellin and its derivatives and process for its production. GB Patent 914,893.
- _____, Galt, R.H.B., and Hanson, J.R. 1964. Fermentation process for the production of gibberellic acid. GB patent 957,634.
- Crueger, W., and Crueger, A. 1984. Biotechnology : A text of Industrial Microbiology. In D. Brock (ed.), chap.5, pp. 54-97. Medison : Science Tech, Inc.
- Darken, M.A., Jensen, A.L., and Shu, P. 1959. Production of gibberellic acid by fermentation. Appl. Microbiol. 7 : 301-303.
- Dewitt, J.P., Jackson, J.V., and Paulus, T.J. 1989. Scaleup. In J.O. Neway (ed.), Fermentation Process Development of Industrial Organism, pp. 27-71. New York : Dekker.
- Elander, R.P. 1989. Bioprocess technology in industrial fungi. In J.O. Neway (ed.), Fermentation Process Development of Industrial Organism, pp. 162-219. New York : Dekker.
- Fuska, J., Kuhr, I., Podojil, M., and Sevcik, V. 1961. The influence of the nitrogen source on the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*. Folia Microbiol. 6 : 18-21.
- Gancheva, V., and Dimova, Ts. 1984. Biosynthesis of gibberellins. II. Influence of the quantity and age of inoculum on the biosynthesis of gibberellins from the strain *Fusarium moniliforme* IM-11. Acta Microbiol. Bulgarica. 14 : 74-79.
- Geissmar, T.A., Verbiscar, A.J., Phinney, B.O., and Cragg, G. 1966. Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-) Kaurenolic acid in culture of *Gibberella fujikuroi*. Phytochemistry. 5 : 933-947.
- Gohlwar, C.S., Sethi, R.P., Marwaha, S.S., Seghal, V.K., and Kennedy, J.F. 1984. Gibberellic acid biosynthesis and simulation of culture parameter. Enzyme Microb. Technol. 6 : 312-316.

- Hemphill, D.D., Baker, L.R., and Sell, H.M. 1972. Isolation and identification of the gibberellin of *Curcumis sativus* and *Curcumis melo*. Planta. 103 : 241-248.
- Holme, T., and Zacharias, B. 1965. Gibberellic acid formation in continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 7 : 405-415.
- Hori, S. 1898. Some observations on "bakanae" disease of the rice plant. Mem. Agric. Res. Sta. Tokyo. 12 : 110-119. cited by Bruckner, B., and Blechschmidt, D. 1991a, The Gibberellin Fermentation. Crit. Rev. Biotech. 11(2) : 163-192.
- Huggett, A. and Nixon, D.A. 1957. Enzymatic determination of blood glucose. J. Biochem. 66:12
- Jefferys, E.G. 1970. The gibberellin fermentation. Adv. App. Biol. 13 : 283-316.
- Kristiansen, B., and Chamberlain, H.E. 1983. Fermenter design. In J.F. Smith and D.R. Berry (eds.), The Filamentous Fungi, pp. 1-7.
- Kumar, P.K.R., and Lonsane, B.K. 1989. Microbial production of gibberellins: State of the art. Adv. Appl. Microbiol. 34 : 29-139.
- Maddox, I.S., and Richert, S.H. 1977. Production of gibberellic acid using a dairy waste as the basal medium. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 201-202.
- Miura, Y. 1976. Transfer of oxygen and scale-up in submerged aerobic fermentation. Adv. In Biochem. Eng. 4 : 3-40.
- Oyama, Y., and Endoh, K. 1955. Power characteristics of gas-liquid contacting mixers. Chem. Eng. 19 : 2-11. cited by Aiba, S., Hemphill, A.E. and Mills, N.F. 1973. Biochemical Engineering. 2nd ed. New York : Academic Press Inc.
- Pace, G.W. 1985. Scale-up of fermentation processes. Proceeding of Biotech' 85 Asia, 249-263.
- _____, 1986. Scale-up of Bioreactor. Lecture Note for Training Course on Utilization of Pilot Plant for Fermenter Design and Operation. Vol. 4 Part 1, Fermenter Design and Operation 2, KMIT, Bangkok, Thailand.
- Rowe, J.W. 1968. The Common and Systematic Nomenclature of Cyclic Diterpenes. Proposal IUPAC Org. Nomenclature. 3rd revision. Forest Products Laboratory. U.S. Department of Agriculture. Madison. Wisc. cited by Takahashi, N., Yamaguchi, I., and Yamane, H. 1986. Gibberellins. Chemistry of Plant Hormones. pp. 282. Florida : CRC. Press Inc.
- Sanchez-Marroquin, A. 1963. Microbiological production of gibberellic acid in glucose media. Appl. Microbiol. 11 : 523-528.

- Sastry, K.S.M., Singh, P., Srinivasa Rao, M.V.V., and Subrahmanyam, C.V.S. 1988. Production of gibberellic acid by fermentation. Indian J. Exp. Biol. 26 : 851-854.
- Shechter, I., and West, C.A. 1969. Biosynthesis of gibberellins. IV. Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranylgeranyl pyrophosphate. J. Biol. Chem. 224 : 3200-3209
- Steyermark, A. 1951. Microdetermination of nitrogen by the kjeldahl method. In Quantitative Organic Microanalysis, pp.135-153. New York : the Blakiston. Philadelphia.
- Stodola, F.H., Raper, K.B., Fennell, D.I., Conway, H.F., Johns, V.E., Langford, C.T., and Jackson, R.W. 1955. The microbial production of gibberellins A and X . Arch. Biochem. Biophys. 54 : 240-245.
- Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E., Lilly, M.D. 1979. Fermentation and Enzyme Technology. New York : John Wiley & Sons.
- West, C.A. 1973. Biosynthesis of gibberellins. In B.V. Milborrow. (ed.), Biosynthesis and Its Control in Plants. pp.143-169. London : Academic Press.
- _____, and Phinney, B.O. 1956. Properties of gibberellin-like factors from extracts of higher plants. Plant. Physiol. 31 : 20-25. cited by Bruckner, B., and Blechschmidt, D. 1991a. The gibberellin fermentation. Crit. Rev. Biotech. 11(2) :163-192.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารแข็งสำหรับการเก็บรักษาเชื้อราไฟเคโตเดกซ์โทรสอาการ์ (potato dextrose agar ; PDA) เสริมแร่ธาตุในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง (ต้มให้เดือด 30 นาที แล้วกรองเอาเฉพาะน้ำใส)	300	กรัม
เดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.5	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	0.5	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.01	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.6 หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สูตรอาหารแข็งสำหรับกระตุ้นการสร้างสปอร์ อะซิเตต อาการ์ (acetate agar) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	1	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
โซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$)	0.6	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.0 หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. สูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (inoculum medium) ตามสูตรของ ศุภชัย สมป์ปิโต (2537) ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.39	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์	0.1	กรัม
กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน (cotton seed hydrolysate) ที่มีปริมาณไนโตรเจน	1.14	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. สูตรอาหารเหลวสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิน (production medium) ตามสูตรของ ศุภชัย สมป์ปิโต (2537) ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.89	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์	0.1	กรัม
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว	5.9	กรัม
น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ	0.2	(ปริมาตรต่อปริมาตร)

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน

ชั่งกากเมล็ดฝ้ายปริมาณ 200 กรัม เติมสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปย่อยในตู้หนึ่งฝาเชื่อมด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งให้เย็น นำมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1200 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น นำมาปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำส่วนใสไปเตรียมอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

2. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมโพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต (potassium sodium tartate ; $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในตู้เย็น

4. การเตรียมสารละลายของ ฟิจิโอ เอนไซม์

ละลายฟิจิโอ เอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ในสารละลาย

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายโอ-ไดอะนิซีน (O-dianisidine) เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอทานอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0

5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ไนโตรเจน

5.1 ของผสมตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst mixture) ประกอบด้วยโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 95 กรัม และ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 5 กรัม ทำการปั่นของผสม ด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด

5.2 อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator) ละลายเมธิลเรด (methyl red) และ เมธิลีนบลู (methylene blue) 0.1 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร

5.3 สารละลายกรดบอริก (borric acid) ละลายกรดบอริก (borric acid) 4 กรัมใน น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

5.4 สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล โดยละลายกรดไฮโดร-คลอริก 8.9 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนเป็น 1,000 มิลลิลิตรในขวดวัด ปริมาตร

6. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน โดยวิธี HPLC

6.1 การเตรียมสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน

ชั่งจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน 0.0768 กรัม (ความบริสุทธิ์ 97.5) ละลายใน เมธา นอลเข้มข้นร้อยละ 35 ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร ซึ่งจะได้สาร ละลายเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐาน ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำ กราฟมาตรฐานแสดงไว้ในตารางที่ ข-1

6.2 การเตรียมสารละลายภายในมาตรฐาน (internal standard)

สารละลายภายในที่ใช้ได้แก่ ยาพาราเซตามอล (Paracetamol) ชนิดฉีดของบริษัท ATLANTIC ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้น 6.0 มิลลิ กรั่มต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

6.3 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้จาก ข้อ 6.1 สกัดหาปริมาณกรดจิบเบ อเรลลิก เพื่อวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 2.6.7 นำค่าสัดส่วนของพื้นที่ ได้กราฟของกรดจิบเบอเรลลิกและสารละลายมาตรฐานภายในแต่ละความเข้มข้นมาเขียน

กราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิก และ ค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟดังแสดงในรูปที่ ฉ-5

ตารางที่ ข-1 การเตรียมสารละลายกรดจิบเบอเรลลิกมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้น ของ GA ₃ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลาย GA ₃ มาตรฐานความ เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	อาหารเหลวสำหรับ เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA ₃ (มิลลิลิตร)
0	0	3.0
0.2	0.2	2.8
0.4	0.4	2.6
0.6	0.6	2.4
0.8	0.8	2.2
1.0	1.0	2.0

ภาคผนวก ค

สูตรการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์

1. อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate ; μ)

$$dx/dt = \mu x$$

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของเซลล์ (g/l)

x_0 = ความเข้มข้นของเซลล์ที่เวลาเริ่มต้น (g/l)

t = เวลา (hr)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (hr^{-1})

2. อัตราการเจริญ (Growth rate ; γ_x)

$$dx/dt = \gamma_x$$

$$\gamma_x = (x - x_0)/(t - t_0)$$

เมื่อ γ_x = อัตราการเจริญ (g cell/l/hr)

t_0 = เวลาเริ่มต้น (hr)

3. Biomass yield ($Y_{x/s}$)

$$dx/dt = - Y_{x/s} ds/dt$$

$$Y_{x/s} = (x - x_0)/(s_0 - s)$$

เมื่อ $Y_{x/s}$ = ปริมาณเซลล์ต่อสารอาหารที่ใช้ (g cell/ g substrate)

s = ความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ (g/l)

s_0 = ความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ที่เวลาเริ่มต้น (g/l)

4. Product yield ($Y_{p/s}$)

$$dp/dt = -Y_{p/s} ds/dt$$

$$Y_{p/s} = (p - p_0)/(s_0 - s)$$

เมื่อ $Y_{p/s}$ = ปริมาณผลผลิตต่อสารอาหารที่ใช้
(g product/g substrate)

P = ปริมาณผลผลิต (g/l)

P_0 = ปริมาณผลผลิตที่เวลาเริ่มต้น (g/l)

5. Specific product yield ($Y_{p/x}$)

$$dp/dt = Y_{p/x} dx/dt$$

$$Y_{p/x} = (p - p_0)/(x - x_0)$$

เมื่อ $Y_{p/x}$ = ปริมาณผลผลิตต่อปริมาณเซลล์ (g product/ g cell)

6. Specific rate of substrate consumption (q_s)

$$q_s = 1/x ds/dt$$

เมื่อ q_s = specific rate of substrate consumption (hr^{-1})

7. Productivity

P = ปริมาณผลผลิต/เวลาที่ใช้ในการหมัก

$$= (p - p_0)/(t - t_0)$$

เมื่อ Productivity มีหน่วยเป็น (g product/l/hr)

8. Specific rate of product formation (q_p)

$$q_p = 1/x dp/dt$$

เมื่อ q_p = Specific rate of product formation (hr^{-1})

9. Substrate consumption rate

= ปริมาณสารอาหารที่ใช้(g substrate/l)/เวลาที่ใช้หมัก(hr)

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน(k_La)และ Parameter constant (α & β)
โดยวิธี Dynamic measurement (ดัดแปลงจาก Wang, 1979)

อัตราการส่งผ่านออกซิเจน สามารถอธิบายได้โดยใช้สมการดังนี้

$$dC_L/dt = k_La (C^* - C_L) - rx \quad \text{----- 26}$$

เมื่อ C_L = ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว (mmol/l)
 C^* = ความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเหลว (mmol/l)

dC_L/dt = การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนในระยะเวลาหนึ่งหรือ
อัตราการส่งผ่านออกซิเจน (mmolO₂/l/h)

k_La = สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อปริมาตร (h⁻¹)

x = ความเข้มข้นของเซลล์ (g cell)

r = อัตราการหายใจจำเพาะของจุลินทรีย์ (mmolO₂/g cell/h)

จากสมการที่ 1

$$dC_L = k_La (C^* - C_L)dt - rxdt$$

$$dC_L = (k_La C^* - rx)dt - k_LaC_Ldt$$

$$\int_{C_{Lo}}^{C_{Lf}} dC_L = (k_La C^* - rx) \int_{t_0}^{t_f} dt - k_La \int_{t_0}^{t_f} C_L dt$$

$$(C_{Lf} - C_{Lo}) = (k_La C^* - rx)(t_f - t_0) - k_La \int_{t_0}^{t_f} C_L dt$$

$$(C_{Lf} - C_{Lo}) / (t_f - t_0) = (k_La C^* - rx) - k_La / (t_f - t_0) \int_{t_0}^{t_f} C_L dt \quad \text{----- 27}$$

จากสมการที่ 2 ถ้าเขียนกราฟระหว่าง $(C_{Lf} - C_{Lo})/(t_f - t_0)$ เป็นแกนตั้ง กับ $\int C_L dt$ เป็นแกนนอน

$$\text{จะได้ความชัน} = -k_{La}/(t_f - t_0)$$

$$\text{กราฟตัดแกน } Y = (k_{La} C^* - rx)$$

เนื่องจากค่า k_{La} มีความสัมพันธ์กับค่า Parameter 2 ตัว คือ อัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P_g/V) และ ค่าความเร็วของอากาศ (V_s) ซึ่งมีความสัมพันธ์ดังสมการดังนี้

$$k_{La} = K (P_g/V)^\alpha (V_s)^\beta \text{ ----- 28}$$

และเนื่องจากการทดลองไม่สามารถวัดค่า (P_g/V) ได้โดยตรง แต่เนื่องจากค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักเปลี่ยนแปลงตามความเร็วรอบของการกวน ดังนั้นในการทดลองจะใช้ค่าความสัมพันธ์นี้ในการหาค่าคงที่ของ α และ β ดังสมการที่ 21

$$k_{La} = K (n)^\alpha (V_s)^\beta \text{ ----- 21}$$

เมื่อ n = ความเร็วรอบของการกวน (rpm)

โดยเขียนกราฟระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนเป็นแกนตั้ง กับ อัตราการกวนเมื่อให้อัตราการให้อากาศคงที่เป็นแกนนอน และ เขียนกราฟระหว่างค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนเป็นแกนตั้ง กับ อัตราการให้อากาศเมื่อให้อัตราการกวนคงที่เป็นแกนนอน จากนั้นหาค่าความลาดเอียงของกราฟของความสัมพันธ์ทั้ง 2 ซึ่งจะได้ค่า Parameter α และ β ของถังหมัก ตามลำดับ

ตัวอย่าง การคำนวณค่า K_La

การหาค่า K_La ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการให้อากาศ 1 VVM อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที

จากสมการที่ 27 ได้ความชัน = $-k_{La}/(t_f - t_0)$

จากตารางที่ 3-19 สามารถหาความชันได้เท่ากับ $-2.34 \times 10^{-5} \text{ (sec}^{-2}\text{)}$

ดังนั้น $-k_{La}/(t_f - t_0) = -2.34 \times 10^{-5} \text{ (sec}^{-2}\text{)}$

เมื่อ t_f มีค่า 290 วินาที

$$\begin{aligned} k_{La} &= 2.34 \times 10^{-5} \times (t_f - t_0) \text{ (sec}^{-1}\text{)} \\ &= 2.34 \times 10^{-5} \times 290 \text{ (sec}^{-1}\text{)} \\ &= 2.34 \times 10^{-5} \times 290 \times 3600 \text{ (hr}^{-1}\text{)} \\ &= 24.43 \text{ (hr}^{-1}\text{)} \end{aligned}$$

ภาคผนวก จ

การคำนวณค่าความเร็วรอบของการกวนเมื่อใช้เกณฑ์ทางกายภาพ ในการกำหนดการขยายส่วนของถังหมัก

1. สัดส่วนของถังหมักมาตรฐาน

1.1 ถังหมักขนาด 5 ลิตร

- เส้นผ่านศูนย์กลางถังหมัก(D_T)	17	cm
- ความสูงของถังหมัก(H_T)	23.5	cm
- เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด(D_i)	8	cm
- ความกว้างของใบพัด	1.5	cm
- ความยาวของใบพัด	2	cm

1.2 ถังหมักขนาด 30 ลิตร

- เส้นผ่านศูนย์กลางถังหมัก(D_T)	28.4	cm
- ความสูงของถังหมัก(H_T)	40.9	cm
- เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด(D_i)	11.3	cm
- ความกว้างของใบพัด	2.2	cm
- ความยาวของใบพัด	2.8	cm

1.3 ถังหมักขนาด 300 ลิตร

- เส้นผ่านศูนย์กลางถังหมัก(D_T)	65.0	cm
- ความสูงของถังหมัก(H_T)	75.0	cm
- เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด(D_i)	21.6	cm
- ความกว้างของใบพัด	4.3	cm
- ความยาวของใบพัด	5.4	cm

2. การคำนวณความเร็วรอบของการกวน

2.1 อัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P_g/V) ของถังหมัก 30 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 13

$$P_g/V = K_1 n^3 D_i^2 \text{ ----- 13}$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกัน จะได้ตั้งสมการที่ 14

$$n_2^3 D_{i2}^2 = n_1^3 D_{i1}^2 \text{ ----- 14}$$

เมื่อ n_2 = ความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 30 ลิตร

n_1 = ความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 5 ลิตร

D_{i2} = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด 30 ลิตร

D_{i1} = เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด 5 ลิตร

$$n_2 = 600 \times (8/11.3)^{2/3}$$

$$= 476.60 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 30 ลิตร จะใช้ประมาณ 500 รอบต่อนาที

2.2 ความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$) ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 22

$$\text{Tip speed} \propto n D_i \text{ ----- 22}$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้

$$n_2 D_{i2} = n_1 D_{i1}$$

$$n_2 = (600 \times 8)/11.3$$

$$= 424.77 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 30 ลิตร จะใช้ประมาณ 400 รอบต่อนาที

2.3 ความเร็วรอบของปลายใบพัด ($\pi n D_i$) ของถังหมักขนาด 300 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้

$$n_2 D_{i2} = n_1 D_{i1}$$

$$n_2 = (600 \times 8) / 21.6$$

$$= 222.22 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 300 ลิตร จะใช้ประมาณ 250 รอบต่อนาที

2.4 ค่าเรโนลด์นัมเบอร์ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน
จากสมการที่ 2

$$\text{Reynolds number} = \rho n D_i^2 / \mu \text{ ----- 2}$$

ความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกันในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้
ดังสมการที่ 24

$$\text{Reynolds number} \propto n D_i^2 \text{ ----- 24}$$

$$n_2 D_{i2}^2 = n_1 D_{i1}^2$$

$$n_2 = (600 \times 8^2) / 11.3^2$$

$$= 300.72 \text{ รอบต่อนาที}$$

ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 30 ลิตร จะใช้ประมาณ 300 รอบต่อนาที

2.5 สัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน (K_{La}) ในถังหมักขนาด 30 ลิตร และ 5 ลิตร มีค่าเท่ากัน

จากสมการที่ 21

$$K_{La} = K (n)^\alpha (v_s)^\beta \text{ ----- 21}$$

เมื่อ K_{La} = สัมประสิทธิ์ของการส่งผ่านออกซิเจนต่อปริมาตร (hr^{-1})

n = ความเร็วรอบของการกวน (rpm)

v_s = ความเร็วของอากาศ (cm/sec)

= อัตราการไหลของอากาศ (w/m) / พื้นที่หน้าตัดของถังหมัก (cm^2)

เมื่อมีอัตราการไหลของอากาศ เท่ากับ 1 w/m

α, β = ค่าคงที่

และจากการทดลองที่ 3.6.2.4 ค่า α และ β ของถังหมัก 30 ลิตร และ 5 ลิตร
มีค่าเท่ากับ 0.45 , 0.13 และ 1.99 , 1.48 ตามลำดับ

จากสมการที่ 4 สามารถหาค่า K ของถังหมัก 5 และ 30 ลิตร โดยทำการหาค่า K_{La} ของ
การเลี้ยงเชื้อที่ 12 ชั่วโมง ที่ 25 °C อัตราการให้อากาศ 1 w/m อัตราการกวน 600 rpm ตาม
การทดลองที่ 3.6.2.4

ค่า K_{La} ของถังหมัก 5 ลิตร เท่ากับ 53.46 ชั่วโมง⁻¹

ค่า K_{La} ของถังหมัก 30 ลิตร เท่ากับ 57.51 ชั่วโมง⁻¹

ถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อกำหนดค่า α และ β ได้เท่ากับ 1.99 และ 1.48 ตามลำดับ ดังนั้นจะได้ความสัมพันธ์

$$\begin{aligned} K_L a &= K (n)^{1.99} (V_s)^{1.48} \\ K &= K_L a / (n^{1.99} \cdot V_s^{1.48}) \\ &= 53.46 / (600^{1.99} \times 0.0044^{1.48}) \\ K &= 0.49 \end{aligned}$$

ถังหมักขนาด 30 ลิตร

เมื่อกำหนดค่า α และ β ได้เท่ากับ 0.45 และ 0.13 ตามลำดับ ดังนั้นจะได้ความสัมพันธ์

$$\begin{aligned} K_L a &= K (n)^{0.45} (V_s)^{0.13} \\ K &= K_L a / (n^{0.45} \cdot V_s^{0.13}) \\ &= 57.51 / (600^{0.45} \times 0.0016^{0.13}) \\ K &= 7.47 \end{aligned}$$

ดังนั้นเมื่อภาวะการหมักเหมือนกัน ในการผลิตที่มีขนาดแตกต่างกันจะได้สมการเป็น

$$7.47 (n_{30})^{0.45} (V_{s30})^{0.13} = 0.49 (n_5)^{1.99} (V_{s5})^{1.48}$$

เมื่อ n_2 = ความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 30 ลิตร

n_1 = ความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 5 ลิตร

$$\begin{aligned} V_{s2} (30 \text{ lit}) &= 1 / \pi r^2 \\ &= 1 / (3.14 \times 14.2^2) \\ &= 0.0016 \text{ cm/sec} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V_{s1} (5 \text{ lit}) &= 1 / \pi r^2 \\ &= 1 / (3.14 \times 8.5^2) \\ &= 0.0044 \text{ cm/sec} \end{aligned}$$

ดังนั้น

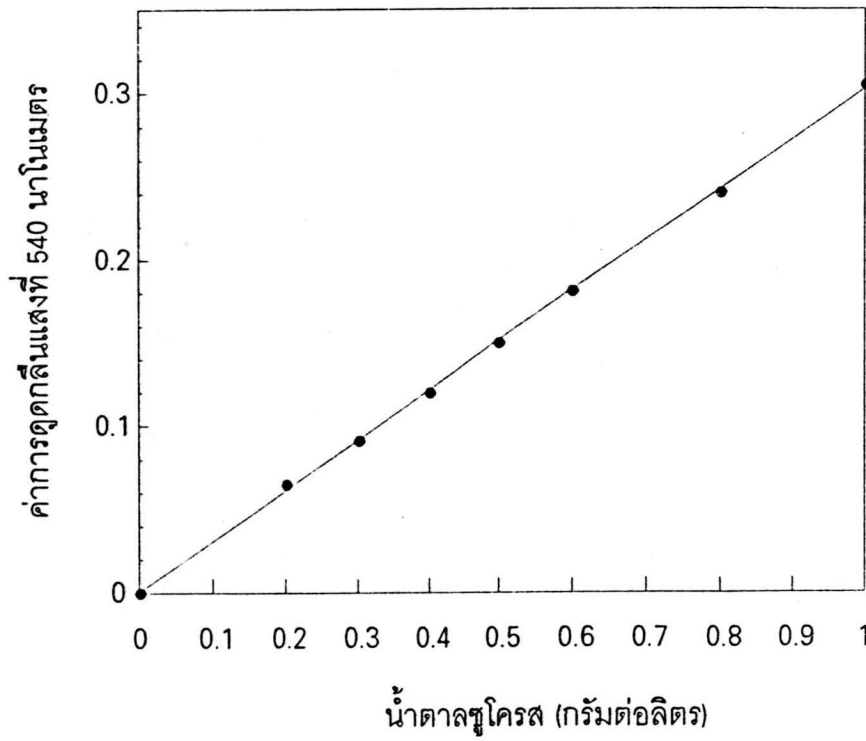
$$(n_{30})^{0.45} = \frac{(0.49(600)^{1.99} \times (0.0044)^{1.48})}{(7.47 \times (0.0016)^{0.13})}$$

$$n_{30} = 517.26 \text{ rpm}$$

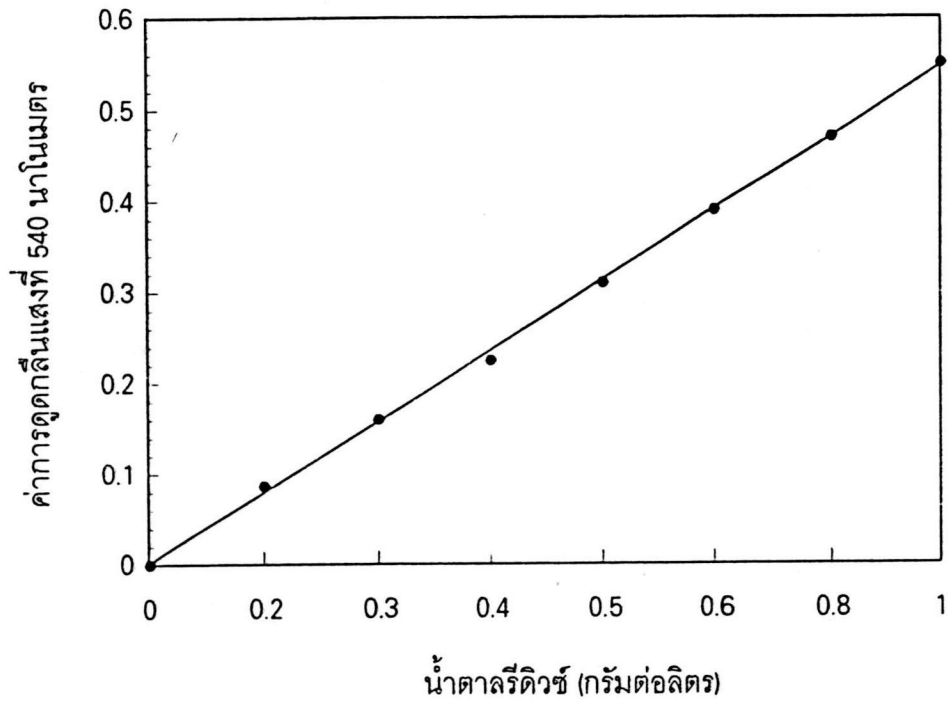
ดังนั้นความเร็วรอบของการกวนของถังหมัก 30 ลิตร จะใช้ประมาณ 500 รอบต่อนาที

ภาคผนวก ฉ

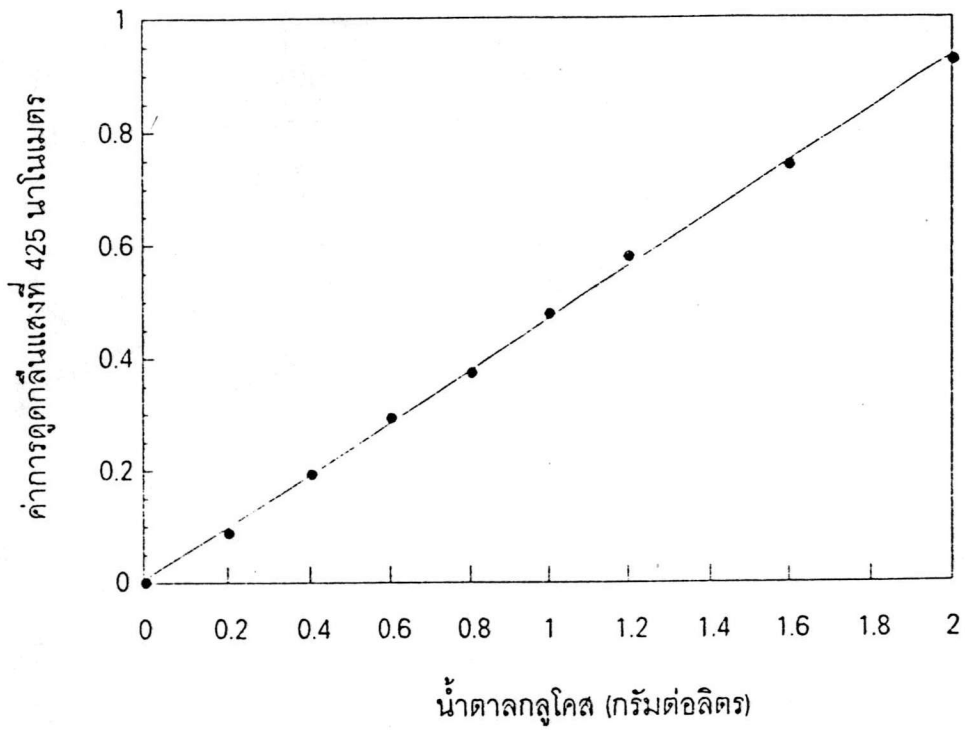
กราฟมาตรฐาน



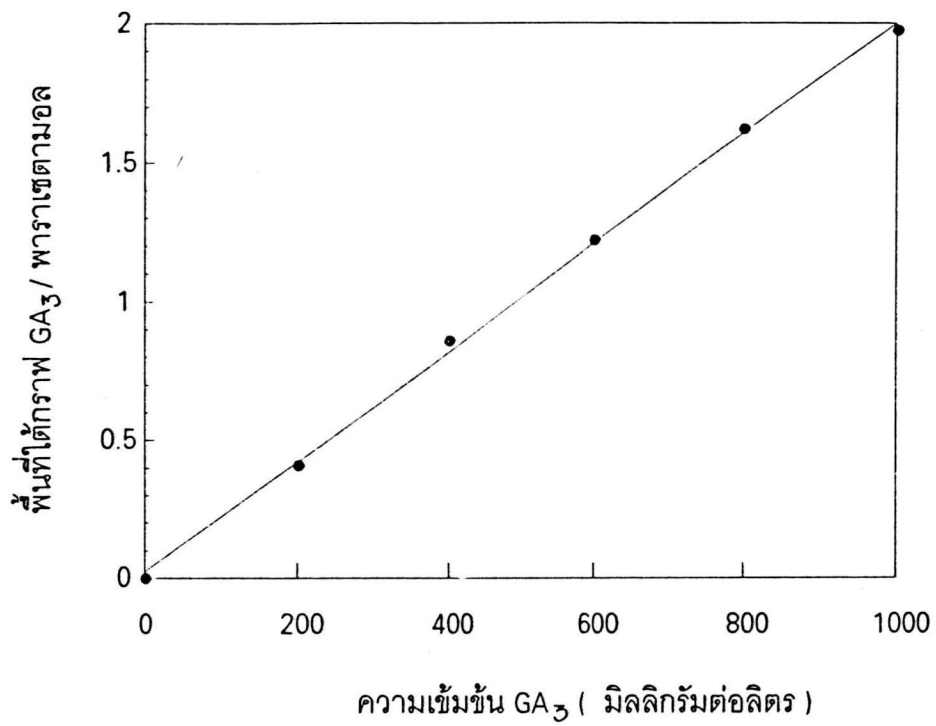
รูปที่ ฉ-1 กราฟมาตรฐานสำหรับหาน้ำตาลซูโครส



รูปที่ ฉ-2 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
ด้วยวิธีของ Bernfeld (Bernfeld, 1955)

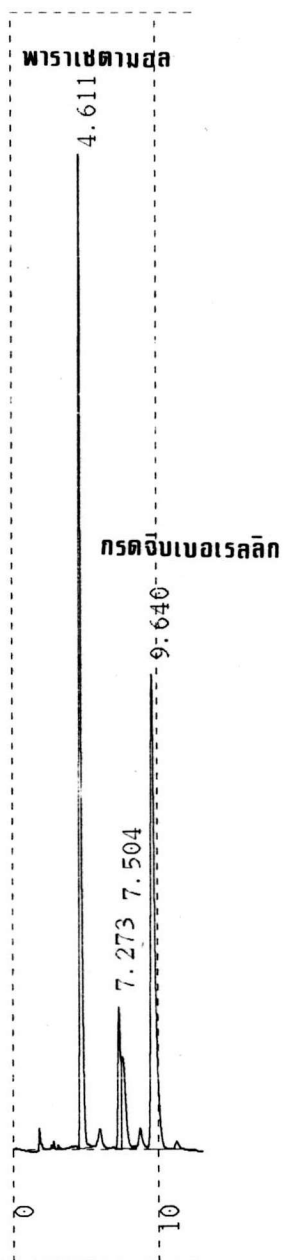


รูปที่ ฉ-3 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี
ของ Huggett และ Nixon (Huggett and Nixon, 1957)



รูปที่ ๔-4 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPLC

หมายเหตุ : การทำกราฟมาตรฐาน ทำโดยการละลาย GA_3 มาตรฐานในอาหาร
เลี้ยงสำหรับการผลิต และวิเคราะห์หา GA_3 ด้วย HPLC



รูปที่ ๕-5 ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA₃ เมื่อใช้พาราเซตามอล เป็นสารเปรียบเทียบภายใน วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ประวัติผู้เขียน

นายสันติ เหมศรี เกิดวันที่ 22 กันยายน พ.ศ. 2513 ที่อำเภอบางกอกน้อย จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) คณะเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรังสิต ในปีการศึกษา 2534 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2535