

การปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi เพื่อผลิตจิบเบอเรลิน



นางสาว จันทร์ธิดา ลักยพร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

หลักสูตร เทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2536

ISBN 974-582-588-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

๕ ๑๘๙ ๕ ๑๒๘๙

Strain Improvement of Gibberella fujikuroi
for Gibberellin Production

Miss Chantira Luppayaporn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Programme of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1993
ISBN 974-582-588-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi เพื่อผลิตจีบเบอเรลิน
โดย นางสาว จันทรีธิดา ลักยพร
ภาควิชา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ บันพานิชการ

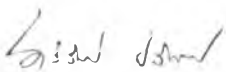
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชรภักย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)



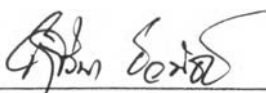
กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ บันพานิชการ)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์)

จันทร์ธิดา ลักขพร : การปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi เพื่อผลิต
จิบเบอเรลลิน (STRAIN IMPROVEMENT OF Gibberella fujikuroi FOR
GIBBERELLIN PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.นลิน นิลอุบล อาจารย์
ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ 86 หน้า ISBN 974-582-588-3

จิบเบอเรลลิน เป็นฮอร์โมนพืชที่มีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้เชื้อรา Gibberella fujikuroi การเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อราในการผลิตเป็นปัจจัยสำคัญที่จะลดต้นทุนการผลิต ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ให้มีประสิทธิภาพในการผลิต GA_3 สูงขึ้น โดยการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตสลับกับ NTG และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงขึ้น ได้คัดเลือกขึ้นปฐมภูมิโดยการตรวจสอบ GA_3 ด้วย TLC และขั้นทุติยภูมิโดยการวิเคราะห์ GA_3 ด้วย HPLC พร้อมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายพันธุ์กับประสิทธิภาพการผลิต GA_3

จากการกลายพันธุ์ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต คัดเลือกได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ UV4-28 ซึ่งผลิต GA_3 สูงกว่าสายพันธุ์ C 5.1 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลิตสีแดงในอาหารเหลวน้อยกว่าสายพันธุ์ C จากนั้นชักนำให้สายพันธุ์ UV4-28 เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG และคัดเลือกได้สายพันธุ์ 08-19 ซึ่งสามารถผลิต GA_3 ได้ 722 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือผลิตเพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ C 32.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำสายพันธุ์ 08-19 มากลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG อีกครั้ง ได้คัดเลือกสายพันธุ์ N6-3 N7-54 และ N9-34 ซึ่งสามารถผลิต GA_3 สูงขึ้นคือ 850 852 และ 884 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หรือมีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์ C 55.6 56 และ 62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สายพันธุ์ N9-34 สามารถผลิต GA_3 ได้ 983 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ผลิตเพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า 11 เปอร์เซ็นต์ ผลงานจากการปรับปรุงสายพันธุ์ครั้งนี้พบว่า สามารถใช้การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (morphology) ของสายพันธุ์กลายพันธุ์มาเป็นคุณสมบัติในการคัดเลือกสายพันธุ์เบื้องต้นได้ กล่าวคือ จะมีโอกาสพบสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงขึ้นในกลุ่มของสายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายสายพันธุ์ C คือ มีเส้นใยยาวฟู การเจริญเร็ว ในขณะที่กลุ่มที่มีลักษณะเปลี่ยนไปจะมีโอกาสพบน้อยมาก

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2535

ลายมือชื่อนิสิต จันทิมา ลักขพร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C226003 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: Gibberella fujikuroi/GIBBERELIC ACID/STRAIN IMPROVEMENT/MUTATION

CHANTIRA LUPPAYAPORN : STRAIN IMPROVEMENT OF Gibberella fujikuroi
FOR GIBBERELLIN PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. MALINE
NILUBOL PH.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. PAIROH
PINPHANICHAKARN PH.D., 86 pp. ISBN 974-582-588-3

Gibberellin, a plant hormone, has been produced industrially by Gibberella fujikuroi. Continuous strain improvement of industrial microorganisms is an essential role in the commercial success. The aim of this work was to improve gibberellic acid yield by mutagenesis of Gibberella fujikuroi strain C by ultraviolet light and NTG using TLC and HPLC as primary and secondary screening, respectively. Correlation between morphological change of mutant strains and efficiency of GA₃ production was also studied.

UV4-28 was a mutant obtained by UV irradiation of spores of Gibberella fujikuroi strain C. Maximum yield of GA₃ produced by UV4-28 was 5.1% higher than that by the original strain while the content of red pigment in fermentation broth was lower. Treatment of UV4-28 with NTG resulted in strain 08-19 capable to produce GA₃ at 722 mg/l which was 32.2% higher than that by strain C.

Strains N6-3, N7-54 and N9-34 were obtained by further treatment of strain 08-19 with NTG. GA₃ produced by these strains were 850, 852 and 884 mg/l, respectively which were 55.6, 56 and 62% higher than that by strain C, respectively. Cultivation of N9-34 in a 5-L fermentor gave maximum GA₃ yield of 983 mg/l on day 13 which was 11% higher than that in shake flask.

The present work also found that morphological change can be used for primary selection. Most mutants having similar morphology to that of the original strain gave higher GA₃ yield than those with morphological changes.

ภาควิชา..... เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา..... 2535

ลายมือชื่อนิสิต..... จันทิรา ลัพพายน

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง " การปรับปรุงสายพันธุ์ Gibberella fujiikuroi เพื่อผลิต จิบเบอเรลลิน " ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดีจนสมบูรณ์เป็นรายงานการวิจัยฉบับนี้ได้ก็ด้วยความอนุเคราะห์ จาก รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล และ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปันพานิชการ ที่ได้กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ และ แนวความคิด อันมีค่ายิ่งตลอดระยะเวลาการ ดำเนินการวิจัย

การวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนและอนุญาติให้ใช้สถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์ และสารเคมีจาก ผู้อำนวยการสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการ สนับสนุนเงินทุนอุดหนุนการวิจัย ของบัณฑิตวิทยาลัย ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การวิจัยนี้สามารถ ดำเนินการและบรรลุความสำเร็จได้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคส์ตฤศาสตร์ ดร.ดารารัตน์ รอดพยาธิ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ และ อาจารย์อรไท สุขเจริญ ที่ได้ช่วยเหลือแนะนำให้แนว ความคิดตลอดจนให้คำปรึกษาในการแก้ไขอุปกรณ์การทดลองจนสามารถดำเนินการวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และขอ ขอบคุณ คุณวาสนา โตเลี้ยง คุณขจีนาฏ โพธิเวชกุล เจ้าหน้าที่ฝ่ายช่างเทคนิค เจ้าหน้าที่สถาบัน เทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ทุกท่าน พี่ เพื่อน และน้องๆ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือใน ด้านสถานที่ อุปกรณ์ สารเคมี ค่าแนะนำ และกำลังใจอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินการ วิจัย

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และผู้อยู่เบื้องหลังทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน ตั้งแต่เริ่มต้นจนงานวิจัยสำเร็จลง ข้าพเจ้าได้ตระหนักถึงบุญคุณที่ได้รับจากทุกท่าน ด้วยดีเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ.....	ท
บทที่	
1 บทนำ	
1 ประวัติความเป็นมา.....	1
2 การปรับปรุงสายพันธุ์.....	3
3 การปรับปรุงสายพันธุ์ <i>Gibberella fujikuroi</i>	8
4 การวิเคราะห์หาปริมาณจีบเบอเรลลิน.....	10
5 เหตุจูงใจในการวิจัย.....	13
6 ขั้นตอนการวิจัย.....	14
2 วิธีการทดลอง	
1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	15
2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	16
3 วิธีเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	16
4 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	16
5 วิธีการวิเคราะห์.....	18
6 การกลายพันธุ์ <i>Gibberella fujikuroi</i> ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์.....	22
7 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA ₃ สูงขึ้น.....	24

3 ผลการทดลอง	
3.1 การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และการคัดเลือกสายพันธุ์	
3.1.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์.....	26
3.1.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ สูงขึ้น.....	33
3.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายพันธุ์กับ ประสิทธิภาพการผลิต GA ₃	38
3.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG และการคัดเลือกสายพันธุ์	
3.2.1 ศึกษาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มสปอร์ (preincubation) ของ <i>Gibberella fujikuroi</i> ก่อนการกลายพันธุ์ด้วย NTG.....	40
3.2.2 การชักนำให้สายพันธุ์ UV4-28 กลายพันธุ์ด้วย NTG.....	45
3.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ สูงขึ้น.....	48
3.2.4 ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะภายนอกของสายพันธุ์กลายพันธุ์กับ ประสิทธิภาพการผลิต GA ₃	55
3.3 การกลายพันธุ์สายพันธุ์ 08-19 ช้ำด้วย NTG	
3.3.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์.....	58
3.3.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ สูงขึ้น.....	61
3.3.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ ระหว่างสายพันธุ์ตั้งต้นกับ สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต และ NTG สองซ้ำ.....	64
3.4 ประสิทธิภาพการคัดเลือกสายพันธุ์ชั้นปฐมภูมิด้วย TLC เปรียบเทียบกับ HPLC.....	67
3.5 ตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ ของสายพันธุ์ N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	68
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	72
เอกสารอ้างอิง.....	76

ภาคผนวกที่

1	สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย.....	81
2	การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	82
3	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA ₃ โดยวิธี HPLC.....	84
	ประวัติผู้เขียน.....	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	การพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินของเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ..... 4
2	จำนวนสปอร์ที่เจริญและ เบอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ C ภายหลังการฉายแสง อุลตราไวโอเลตในช่วงเวลาต่างๆ.....28
3	แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ C พร้อมทั้งปริมาณ GA ₃ ที่ สายพันธุ์ต่างๆผลิตได้.....34
4	ลักษณะของสายพันธุ์และประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ ของสายพันธุ์ที่ผ่านการ คัดเลือกขั้นทุติยภูมิ เทียบกับสายพันธุ์ C.....37
5	แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกและความสามารถในการ ผลิต GA ₃39
6	เบอร์เซนต์การอยู่รอดของสปอร์ที่มีอายุการงอกต่างกัน เมื่อทำปฏิกิริยากับ NTG ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์.....41
7	จำนวนสปอร์ที่เจริญและ เบอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ UV4-28 ภายหลังการ เติม NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....46
8	แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์สายพันธุ์ UV4-28 พร้อมทั้งปริมาณ GA ₃ ที่สายพันธุ์ต่างๆผลิตได้.....48
9	ลักษณะของสายพันธุ์และประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ ของสายพันธุ์ที่ผ่านการ คัดเลือกขั้นทุติยภูมิ เทียบกับสายพันธุ์ UV4-28.....54
10	แสดงกลุ่มของสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกและความสามารถในการ ผลิต GA ₃56
11	จำนวนสปอร์ที่เจริญและ เบอร์เซนต์รอดของสปอร์สายพันธุ์ 08-19 ภายหลังการ เติม NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ.....59
12	จำนวนสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ ที่ตรวจสอบด้วยวิธี TLC มีความเข้มของจุด GA ₃ อยู่ในระดับต่างๆกัน.....61

- 13 แสดงจำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในชั้นปฐมภูมิที่ผลิต GA₃ ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC ในระดับต่างๆกัน.....62
- 14 ลักษณะของสายพันธุ์และประสิทธิภาพการผลิต GA₃ ของสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกชั้นทุติยภูมิ เทียบกับสายพันธุ์ 08-19.....63
- 15 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA₃ ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละขั้นตอนของการกลายพันธุ์.....64
- 16 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการคัดเลือกสายพันธุ์ด้วย TLC กับ HPLC.....68
- 17 ผลการเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....70

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	สูตรโครงสร้างของ Tetra-carbocyclic gibbane และ กรดจิบเบอเรลลิก..... 2
2	thymine dimer..... 5
3	กลไกของ NTG ในการเติมหมู่เมธิลให้กับเบสกวานีนของกรดนิวคลีอิก..... 7
4	แสดงอุปกรณ์การกวนที่ตัดแปลงสำหรับการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต..22
5	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เบอร์ เซนโตรอดของสปอร์สายพันธุ์ C หลังจากชักนำให้สปอร์เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต.....28
6	ลักษณะ โครโมนิของ สายพันธุ์ C และ ตัวอย่างสายพันธุ์กลายพันธุ์กลุ่มต่างๆ29
7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลาในการบ่มสปอร์กับเบอร์ เซนโตรอดของสปอร์เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NTG 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์.....42
8	การเปลี่ยนแปลงของสปอร์เมื่อบ่มใน nutrient broth ที่ช่วงเวลา 0-6 ชั่วโมง...43
9	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เบอร์ เซนโตรอดของสปอร์สายพันธุ์ UV4-28 กับความเข้มข้นของ NTG.....47
10	แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เบอร์ เซนโตรอดของสปอร์สายพันธุ์ 08-19 กับความเข้มข้นของ NTG.....60
11	โตะแกรมแสดงขั้นตอนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ และประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ ที่เพิ่มขึ้นในแต่ละขั้นตอน.....66
12	แสดงการเจริญและประสิทธิภาพการผลิต GA ₃ ของ สายพันธุ์ N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....71
13	กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA ₃ โดยวิธี HPLC มีพาราเซตามอลเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน.....84
14	ลักษณะ โครมาโตแกรมของ GA ₃ ที่ผลิตโดย <i>Gibberella fujikuroi</i> สายพันธุ์ N9-34 วิเคราะห์ด้วย HPLC.....85

คำย่อ

GA ₃	=	กรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid)
TLC	=	ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี
HPLC	=	ไฮเพอฟอร์แมนซ์ลิกวีดโครมาโตกราฟี
NTG	=	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
องศา	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ล.	=	ลิตร
มก./ล.	=	มิลลิกรัมต่อลิตร
mM.	=	มิลลิโมลาร์
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร