เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

จันทร์ธิรา ลัภยพร. 2536. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi* เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประยูรศรี วัฒนโกศล. 2537. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *G. fujikuroi* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2533. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 3(3) : 24-26.

พีรเดช ทองอำไพ. 2529. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย กรุงเทพมหานคร : ไดนามิกส์การพิมพ์.

แม้น อมรสิทธิ์., อมร เพชรสม. 2534. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์ทางเครื่องมือ กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชวนพิมพ์.

สุภาพร พรพรหมกุล. 2533. การสกัดแยกและการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักของเชื้อ *G.fujikuroi.* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์. 2537. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อราจิบเบอเรลลา ฟูจิคูรอย ซี.วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภชัย สมัปปิโต. 2537. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดย *Gibberella fujikuroi* N9-34. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตร

เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ. 2536. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดย *Gibberella fujikuroi* F4W-6(9). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรไท สุขเจริญ. 2533. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุทัย คันโท. 2529. วัตถุดิบอาหารสัตว์. ใน อาหารและการผลิตอาหารเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีก, หน้า 52-106. นครปฐม : ภาควิชาสัตวบาลและนักวิชาการอาหารสัตว์ ประจำศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Alikhanian, S. I. 1962. Induced mutagenesis in the selection of microorganism. Advan. Appl. Microbiol. 4 : 1-50.

Anne, J. and Peberdy, J. R. 1967. Induced fusion of fungal protoplast following treatment with polyethyleneglycol. J. Gen. Microbiol. 92 : 413-417.

Avalos, J.,Casadesus, J. and Cerda-Olmedo, E. 1985. *Gibberella fujikuroi* mutant obtained with UV radiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine. Appl. Environ. Microbiol. 49 : 187-791

Baltz, R. 1986. Strain improvement. In Demain,A. L. and Solomon, N. A. (eds.), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology,

pp.154-169.

Beader,R., MacMillan, J., Wels, M. and Phinney, B. O. 1973. Metabolism of steriol and its derivatives by *Gibberella fujikuroi* mutant B1-41a. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 415-468.

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β. In Colowick, P. S. and Kaplan, O. M. (eds.), Method in Enzymology, vol.1,pp.149. New York : Academic Press.

Betina, V. 1985. Thin - layer chromatography of mycotoxin. J. Chromatog. 334 : 221-276.

Borrow, A., Brown, S., Jefferys, E. G., Kessell, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, B., Rothwell, A., Rothwell, B. And Swait, J. C. 1964. The Kinetics of metabolism of Gibberella fujikuroi in stirred culture. Can. J. Microbiol. 10 : 407-444.

Bradley, S. G. 1966. Genetic in applied microbiology. Advan. Appl. Microbiol. 8: 29-59

Bruckner, B. And Blechschmidt 1991. The gibberellin fermentation. Crit. Rev. Biotechnol. 11(2) :163-192.

_____ , and Blechschmidt, D., Sembdner, G. and Schneider, G. 1989. Fungal gibberellin production.In Biotechnology of Vitamin Pigment and Growth Factor, chap 21, pp. 383-429.

Bu Lock, J. D., Detroy, R. W., Hostalek, Z. And Monin - Al - Shakarchi, A. 1974. Regulation of secondary biosysthesis in Gibberella fujikuroi. Trans. Br. Mycol. Soc. 62 : 377 - 389.

Calam, C. T. 1970. Improvement of microorganism by mutation, hybridization and selection. Method in Microbiology. In Norris, J. R. And Ribbon, N. W. (Eds.), Vol. 3A, pp.435 -459, New York: Academic Press.

Corey, E. J. And Danheiser, R. L. 1978. Stercospecific total synthesis of gibberellic acid. J. Am. Chem. Soc. 8034.

Crozier, A., Kuo, C. C., Durley, R. C. and Pharis, R. P. 1970. The biological activities of 26 gibberellins in nine plant bioassays. Can. J Bot. 48: 867- 877.

Crueger, U. and Crueger, A. 1987. Strain development. In Biotechnology, chap 3, pp. 9-15. New York : Acedemic Press.

Curtis, P. J. and Cross, B. E. 1954. Gibberellic acid : A new metabolite from the culture filtrates of *Gibberella fujikuroi*. Chem. Ind. 1066. cited by Bruckner, B. and Blechschmidt, D. 1991. The gibberellin fermentation. Crit. Rev. Biotechnol. 11(2) : 163-192.

Darken, M. A., Jensen, A. J. And Shu, P. 1959. Production of gibberellic acid by fermentation. Appl. Microbiol. 7 : 301 - 303.

Davies, O. L. 1964. Screening for improve mutants in antibiotic research. Biometrics 20 : 576-591.

Erokhina, L. T. 1972. USSR Patent 440408, cited by Bruckner, B. Blechschmidt, D., Sembdner, G. and Schneider, G. 1989. Fungal gibberellin production. In Biotechnology of Vitamin, Pigment and Growth Factor, chap 21, pp. 383-429.

_____ ,and Sokolova, E.V. 1966. Selection of *Fusarium moniliform* Sheld. (producers of gibberellins) with application of mutagenic factors. Genetika 1 : 109-115

Fatini, A. A. 1965. Strain development. In Method in Enzymology, vol.43, pp. 24-41. New York : Academic Press.

Funk, W., Kerler, R.,Boll, L. and Dammann, V. 1981. High performance thin layer chromatography determination of fluorescence - labelled cortisol. J. Chromatog. 217 : 349-355.

Gancheva, V. and Dimova, T. 1984. Biosynthesis of gibberellin influence of the quantity and age of inoculum on the biosynthesis of gibberellin from strain *Fusarium moniliform* IM-11. Acta Microbiol. Balgalica. 14 : 74-79.

Geissman,T. A., Verbiscar, A. J., Phinney, B. O. and Cragg, G. 1966. Study on the biosynthesis of gibberellin from (-) kaurenoic acid in culture of *G. fujikuroi*. Phytochemistry 5 : 933.

Gohlwar, C. S., Sethi, R. P., Marwaha, S. S., Seghal, V. K. And Kenedy, J. F. 1984. Gibberellic acid biosynthesis and simulation of cultural parameter. Enzyme. Microb. Technol. 6 : 312 - 316

Harold, L., Bird, JR. and Charles, T. P. 1957. A paper chromatographic seperation of gibberellic acid and gibberellin A1. Plant Physiol. 6 : 45-46.

Holbrook, A. A., Edge, W. J. W. And Bailey, F. 1961. Adv. Chem. Ser. 28 : 159. cited by Spectrofluorodensitometric estimation in

thin - layer chromatography of gibberellic acid produced by solid-stated fermentation. J. Chromatg. 369 : 222-226.

Holme, T. and Zacharias, B. 1965. Gibberellic acid formation in continuous culture. Biotechnol. Bioeng. 7 : 405.

Hopwood, D. A. 1970. The isolation of mutants. In Norris, J. R. and Ribbon, D. W. (eds.), chap 6, vol.3A, pp. 36-430. New York : Academic Press.

Hori, S. 1898. Some observations on "bakanae" disease of rice plant. Mem. Agr. Res.Sta. (Tokyo), 12 : 110 - 119. cited by Bruckner, B. and Blechschmidt, D. 1991. The gibberellin fermentation. Crit. Rev. Biotechnol. 11(2) : 163-192.

Huggett, A. and Nixon, D. A. 1957. Enzymatic determination of blood glucose. J. Biochem. 66 :12

Imshenetskii, A. A., and Ul'yanova, O. M. 1962. Biochemical activity of *Fusarium moniliform* Sheld. mutants. Microbiologia 31(5) : 832-837.

Jaenchen, D. E. and Haleem, J. I. 1988. Modern thin-layer chromatography: advances and perspectives. J. Liq. Chromatog 11(9-10) : 1941-1965.

Jefferys, E.G. 1970. The gibberellin fermentation. Adv. Appl. Microbiol. 13 : 283-316.

Kawanabe,Y., Yamane,H., Murayama, T., Takahashi, N. and Nakamura, T. 1983. Identification of gibberellin A_3 in mycelia of

Neurospora crassa. Agric. Biol.Chem. 47(7) : 1693 - 1694.

Kolblin, R., Bruckner,B., Blechschmidt, D., and Fischer, W. 1990. Activity of mutagens in the fungus *Gibberella fujikuroi*. J. Basic Microbiol. 30 (9) : 675 - 677.

Korosawa, E. 1926. Experimental studies on the nature of the substance excreted by the "bakanea" fungus. Trans. Nat. Soc. Formosa. 16:213-227. cited by Bruckner, B. and Blechschmidt, D. 1991. The gibberellin fermentation. Crit. Rev. Biotechnol. 11(2) : 163-192.

Kumar, P. K. R., and Lonsane, B. K. 1986. Spectrofluorodensitometric estimation in thin-layer chromatography of gibberellic acid produced by solid-stated fermentation.J. Chromatog. 369:222-226.

Lonsane, B. K., and Kumar, P. K. R. 1986. Microbial product of gibberellins: State of Art. 34 : 31-37. New York : Academic Press.

_____ , 1991. Fungal plant growth regulators. In Arora, D. K., Elander, R. P. and Merkerji, K. G. (eds), Handbook of Applied Mycology Fungal Biotechnology, vol.4, pp.565-576.

MacMillan, J. and Suter, P. J. 1963. Thin - layer chromatography of the gibberellins Nature 197 : 790.

_____ , and Takahashi, N. 1968. Proposed procedure for the allocation of trivial names to gibberellins. Nature 217 : 171-171.

Mertz,D. and Henson, W. 1967. Light stimulated biosynthesis of gibberellins in *Fusarium moniliform*. Nature 214 : 844-846.

Muromtsev, G. S., Rakovskii, Y. S., Dubovoya, L. P., Taemnikova, T. V.

and Fedchenko, A. N. 1968. Sucrose and fat as carbon source for the biosynthesis of gibberellins. Prikl. Biokhim. Microbiol. 4: 398-407.

Phinney, B. O., West, C. A., Ritzel, M. and Neely, P. M. 1957. Evidence for gibberellin - like substances from flowering plant. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 43 : 398-404. cited by Harold, L., Bird, JR. and Charles, T. P. 1957. A paper chromatographic separation of gibberellic acid and gibberellin A1. Plant Physiol. 6 : 45-46.

Sackett, P. H. 1984. High performance thin-layer chromatography of gibberellin in fermentation broth. Anal. Chem. 56 : 1600-1603.

Sastry,K. S., Singh, P., Srinarasa Rao, M. V. V. and Subrahmanyam, C. V. S. 1988.Residues in gibberellic acid fermentation. Indian. J. Exp. Biol. 20: 851 - 854.

Saucedo,J.E.N., Barbotin, J.N. and Thomas,D. 1989. Continuous production of gibberellic acid in fixed bed reactor by immobilized mycelia of *Gibberella fujikuroi* in calcium alginate beeds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 :226 - 233.

Shen,N. and Chang, F. 1981. Gibberellin determination by spectrophotometry using molypdenum blue. Yaoxue Xuebao 16(5) : 397-400

Sikyta, B. 1983. Genetic of industrial microorganism. In Method in Industrial Microbiology, chap 7, pp. 214-239.

Stanbury,P. E. and Whitaker, A. 1984. Isolation, preservation and improvement of industrial microorganism. In Principle of Fermentation

Technology, pp.26-73. Great Britain : BPPC Wheatons Ltd., Exeter.

Stephen, W. J. and Ronald, C. C. 1990. Light stimulated gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Plant Physiol. 94:1696-1701.

Stodola, F. H., Raper, K. B., Fennell, D. I., Conway, H. F., John, V. E., Langford, C. T. And Jackson, R. W. 1955. The microbiological production of gibberellin A and X. Arch. Biochem. Biophys. 54 : 240-245

Sussmuth, R., Haerlin, r. and Lingen, F. 1972. The mode of action of N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in mutagenesis. Biochem. Biophys. Acta. 269: 276-286.

Sweig, G. and Devay TE. 1959. On the biosynthesis of gibberellins from carbon-14 substrates by *Fusarium moniliform*. Mycologia 51: 877-886. cited by Stephen, W. J. and Ronald, C. C. 1990. Light stimulated gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Plant Physiol. 94:1696-1701.

Takahashi, N., Yamaguchi, I., and Yamane, H. 1986. Gibberellins. In Takahashi, N.(eds), Chemistry of Plant Hormones, pp. 282. Florida : CRC Press Inc.

U.S. patent No. 803591. ICI. Ltd. Gibberellin production

Vass, R. C. and Jeffery, E. G. 1979. Gibberellic acid. In Economic Microbiology, vol.3, pp. 421. Florida : Academic.

Yabuta and Hayashi, Y. 1938. Agric. Hortic. 13 : 21-25. cited by Lonsane,

B.K., and Kumar, P. K. R. 1986. Microbial product of gibberellins : State of Art. 34 : 31-37. New York. Academic Press.

_____ , and Sumuki, Y. 1938. J. Agric. Chem. Soc. Jpn. 14:1526. Cited by Lonsane, B. K., and Kumar, P. K. R. 1986. Microbial product of gibberellins : State of Art. 34 : 31-37. New York. Academic Press.

Yamane, H., Satoh, Y., Nohara, K., Nakayama, M.,Murofushi, N., Takahashi, Takahashi, N., Takeno, K., Furuya, M., Furber, M., Mander, LN. 1988. The methy ester of a new gibberellin GA_{73} the principle anteridiogen in *Lygodium Japonicum*. Tetrahedon Lett. cited by Stephen, W. J. And Ronald, C. C. 1990. Light stimulated gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Plant Physiol. 94 : 1696-1701.

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับการเก็บรักษาเชื้อรา โพเทโตเด็กซ์โทรสอาการ์ (potato dextrose agar, PDA) เสริมแร่ธาตุในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารแข็งสำหรับกระตุ้นการสร้างสปอร์ อะซิเตต อาการ์(acetate agar) ใน อาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	1	กรัม
โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
โซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa.3H_2O$)	0.6	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (inoculum medium) ตามสูตรของ อรไท สุขเจริญ(2533) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลซูโครส	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted soybean meal)	1.90	กรัม
โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์	0.1	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สูตรอาหารเหลวสำหรับผลิต GA_3 ของอรไท สุขเจริญ(2533) มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในข้อ 1.3 แต่มีน้ำมันถั่วเหลืองปริมาณร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.5 สูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(inoculum medium) ตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลซูโครส	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.39	กรัม
กากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน (cotton seed hydrolysate)	1.14	
โพตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์	0.1	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.6 สูตรอาหารเหลวสำหรับผลิต GA_3 (production medium) ตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในข้อที่ 1.5 แต่มีน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.7 สูตรอาหารเหลวสำหรับผลิต GA_3 ที่ปรับปรุงจากสูตรอาหารของ อรไท สุขเจริญ ตามสูตรของ ศุภชัย สมัปปิโต(2537) มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารสำหรับผลิต GA_3 ในข้อ 1.4 แต่เพิ่มปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วจาก 1.9 กรัมเป็น 5.9 กรัม

1.8 Nutrient broth (Avalos et al., 1985)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Yeast extract	4	กรัม
Peptone	8	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2.1 การเตรียมกากเมล็ดฝ้ายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถัน

ชั่งกากเมล็ดฝ้ายปริมาณ 200 กรัม เติมสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น 0.5 นอร์มอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปย่อยในตู้นึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1200 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น นำมาปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ร้อลละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำส่วนใสไปเตรียมอาหารเชื้อรา พบว่าปริมาณไนโตรเจนรวมทั้งหมดประมาณร้อยละ 0.30 - 0.33 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

2.2 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมโพตัสเซียมโซเดียมตาเตรต(potassium sodiumtartate, $C_4H_4KNaO_6 . 4H_2O$) 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและเก็บไว้ในตู้เย็น

2.4 การเตรียมสารละลายของ พีจีโอ เอนไซม์

ละลายพีจีโอ เอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย และเปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ในสารละลายโพตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติม 0.5 มิลลิลิตรของสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน(0-dianisidine) เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอทธานอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0

2.5 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ไนโตรเจน

2.5.1 การผสมของเกลือ (salt mixture) ประกอบด้วย โปตัสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 95 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 5 กรัม ทำการปั่นของผสมด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด

2.5.2 อินดิเคเตอร์ผสม (mixed indicator)สารละลายเมทธิลเรด (methyl red)และเมทธิลีนบลู (methylene blue) 0.1 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอทธานอลปริมาตร 150 มิลลิลิตร

2.5.3 สารละลายกรดบอริก (borric acid) ละลายกรดบอริก (borric acid) 4 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.5.4 สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล

2.6 การเตรียม NTG

เตรียม NTG (น้ำหนักโมเลกุล 147.1) เข้มข้น 1mg/ml หรือ 6.7980 mM ละลายใน 0.5 โมลาร์ ทริส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8 นำไปใช้ทันที การเตรียม NTG เตรียมแต่ละครั้งในการทดลอง ต้องชั่งในที่ลมสงบ ใส่ถุงมือ

ปิดปากและปิดจมูก วางกระดาษรองระหว่างเครื่องชั่งกับภาชนะบรรจุ ป้องกันการปนเปื้อนสารเคมี NTG ในห้องปฏิบัติการ และวัสดุอุปกรณ์การทดลองที่ปนเปื้อน NTG ให้นำมาแช่ในสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ภายใต้ตู้ควันที่ดูดอากาศนาน 6-8 ชั่วโมง

2.7 การเตรียมสารละลาย ทริส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตรประกอบด้วย

Tris(hydroxymethyl)aminomethane	12.1	กรัม
Maleic acid	11.6	กรัม

ปรับความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.8 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 มาตรฐานโดยวิธี HPLC

2.8.1 การเตรียมสารละลาย GA_3 มาตรฐาน

ชั่ง GA_3 มาตรฐาน 0.0768 กรัม (ความบริสุทธิ์ 97.5) ละลายในเมทธานอลเข้มข้นร้อยละ 35 ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร ซึ่งจะได้สารละลาย เข้มข้น GA_3 เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เจือจางสารละลาย GA_3 มาตรฐานให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อทำกราฟมาตรฐานแสดงไว้ในตารางที่ 22

2.8.2 การเตรียมสารละลายภายในมาตรฐาน (Internal Standard)

สารละลายภายในที่ใช้ได้แก่ ยาพาราเซตามอล (Paracetamol) ชนิดฉีดของบริษัท ATLANTIC ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

2.8.3 นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้จากข้อ 2.8.1 สกัดหาปริมาณ GA_3 เพื่อวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ตามวิธีในข้อ 7.3 นำค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของ GA_3 และสารละลายมาตรฐานภายในแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟมาตรฐาน ระหว่างความเข้มข้นของ GA_3 และค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟดังแสดงในรูปที่ 28

ตารางที่ 22 การเตรียมสารละลาย GA_3 มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สารละลาย GA_3 มาตรฐานความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (มิลลิลิตร)	อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตGA_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

2.9 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 มาตรฐานโดยวิธี HPTLC

ชั่ง GA_3 มาตรฐาน 0.0195 กรัม (ความบริสุทธิ์ 97.5) ละลายในเมทธานอล ปรับปริมาตรให้ได้ 25 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร ซึ่งจะได้สารละลาย GA_3 เข้มข้น 800 มิลลิกรัมต่อลิตร เจือจางสารละลาย GA_3 มาตรฐานให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงไว้ในตารางที่ 23

นำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ สกัดหาปริมาณ GA_3 เพื่อวิเคราะห์โดยวิธี TLC-densitometric ตามวิธีในข้อ 7.2 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของ GA_3 แต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ GA_3 และค่าพื้นที่ใต้กราฟ

ดังแสดงในรูปที่ 26

ตารางที่ 23 การเตรียมสารละลาย GA_3 มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี HPTLC

ความเข้มข้นของ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สารละลาย GA_3 มาตรฐาน ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (มิลลิลิตร)	สารละลายเมทธานอล (มิลลิลิตร)
0	-	4.00
50	0.25	3.75
100	0.50	3.50
150	0.75	3.25
200	1.00	3.00

ภาคผนวก ค

สูตรการคำนวณ

3.1 ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$S = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(Xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

n = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

3.2 สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient ; r)

$$r = \frac{\sum_{i=1}^{N} (X_i - \mu_x)(Y_i - \mu_y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N} (X_i - \mu_x)^2 \sum_{i=1}^{N} (Y_i - \mu_y)^2}}$$

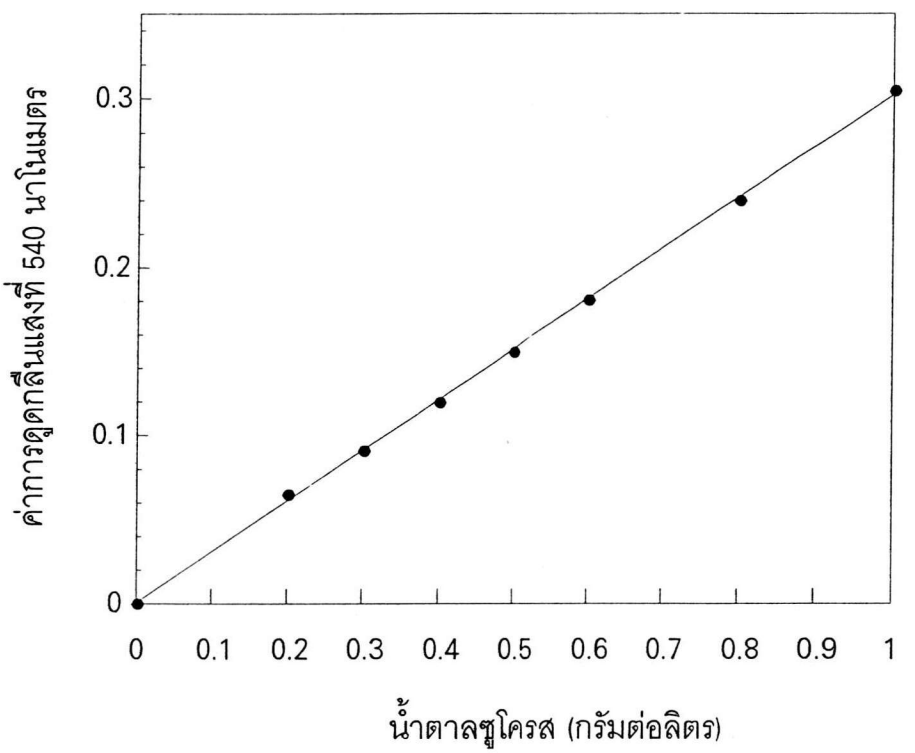
โดย N = จำนวนข้อมูลทั้งหมดในประชากรของ X และ Y

μ = ค่าเฉลี่ย (mean)

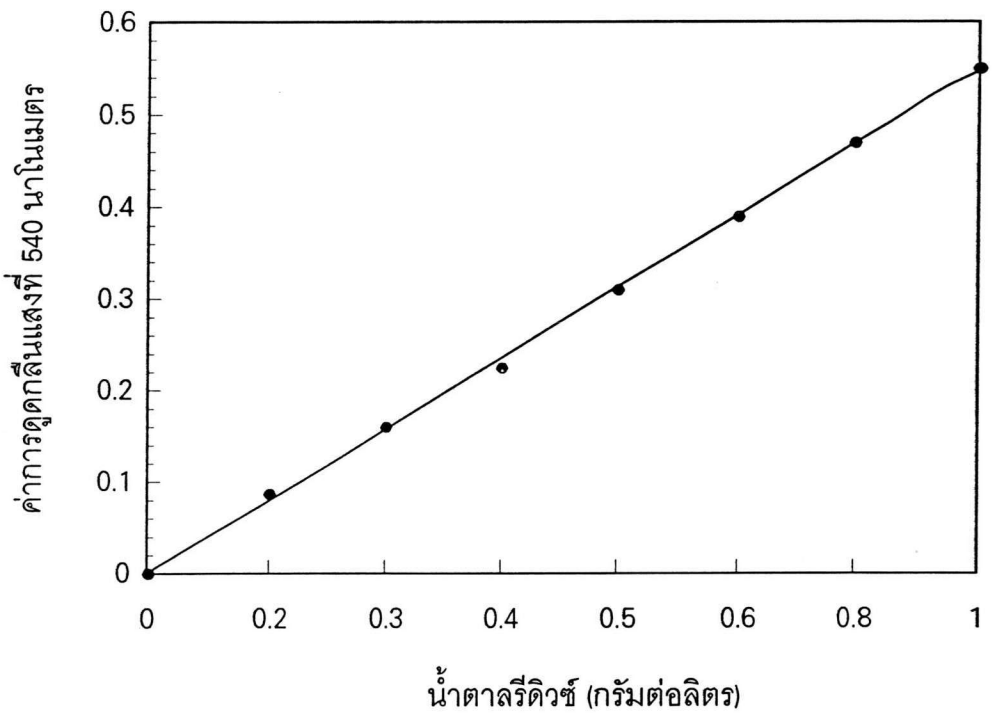
ค่า r นี้มีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง +1 เป็นค่าที่ไม่มีหน่วย จะบอกระดับความสัมพันธ์ของ X และ Y ว่ามีมากน้อยเพียงใด กล่าวคือถ้า r เข้าใกล้ +1 หรือ -1 มากเท่าใด แสดงว่า X และ Y มีความสัมพันธ์กันมากเท่านั้น โดยอาจเป็นไปในทางตามกันถ้าเข้าใกล้ +1 เป็นไปในทางกลับกันถ้าเข้าใกล้ -1 และถ้า r เข้าใกล้ 0 มากเท่าใด แสดงว่า X และ Y มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงต่อกันน้อยลงเท่านั้น

ภาคผนวก ง

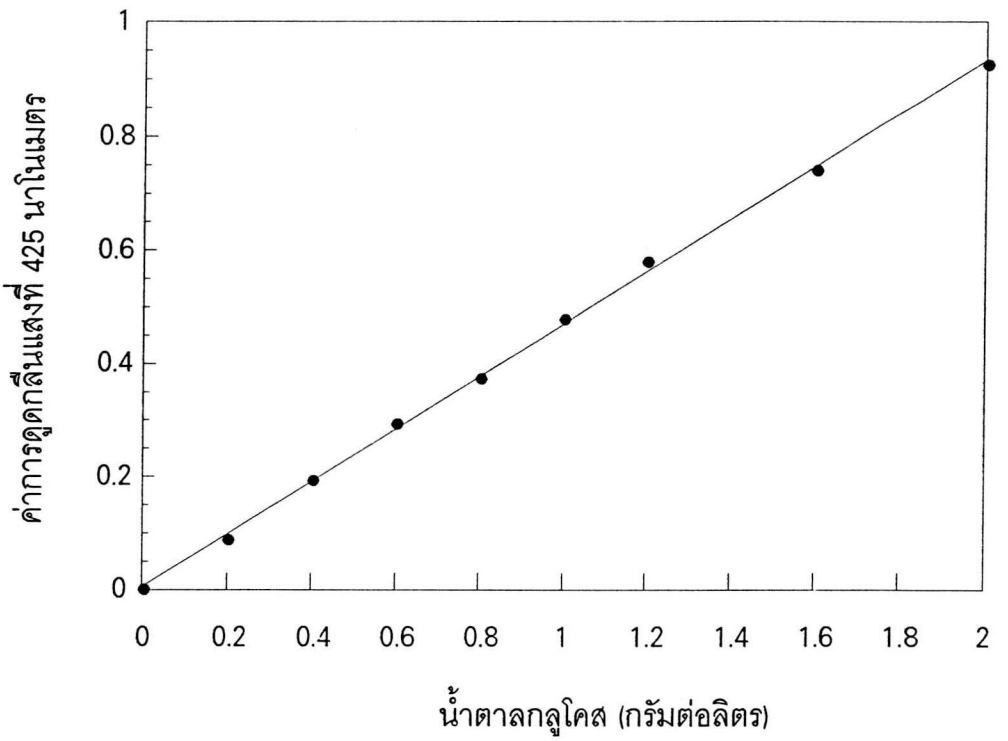
กราฟมาตรฐาน



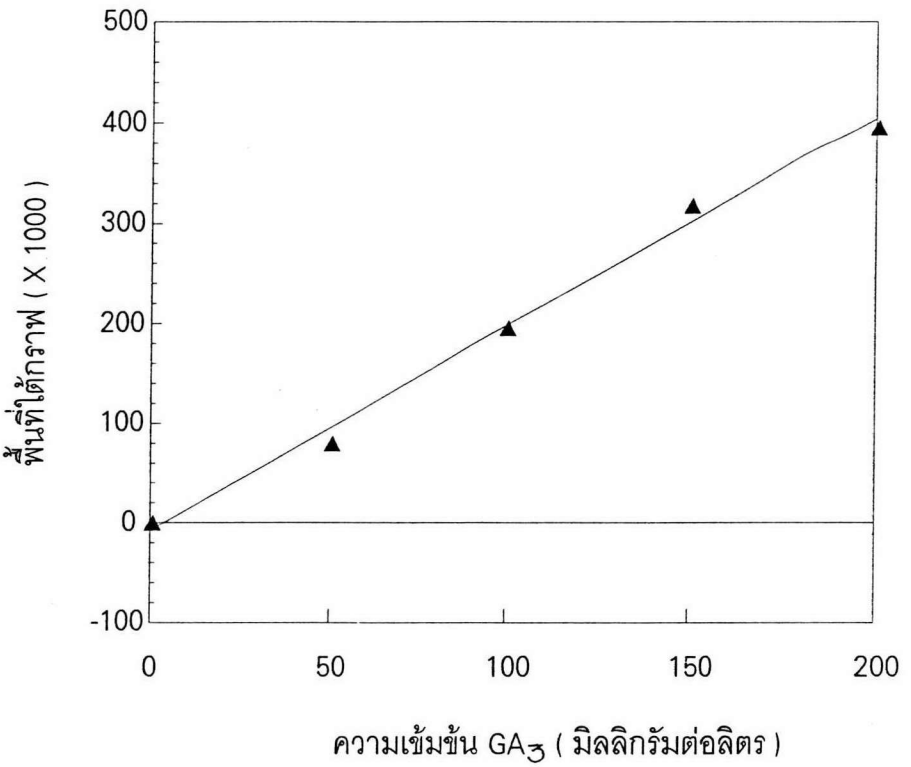
รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานสำหรับหาน้ำตาลซูโครส



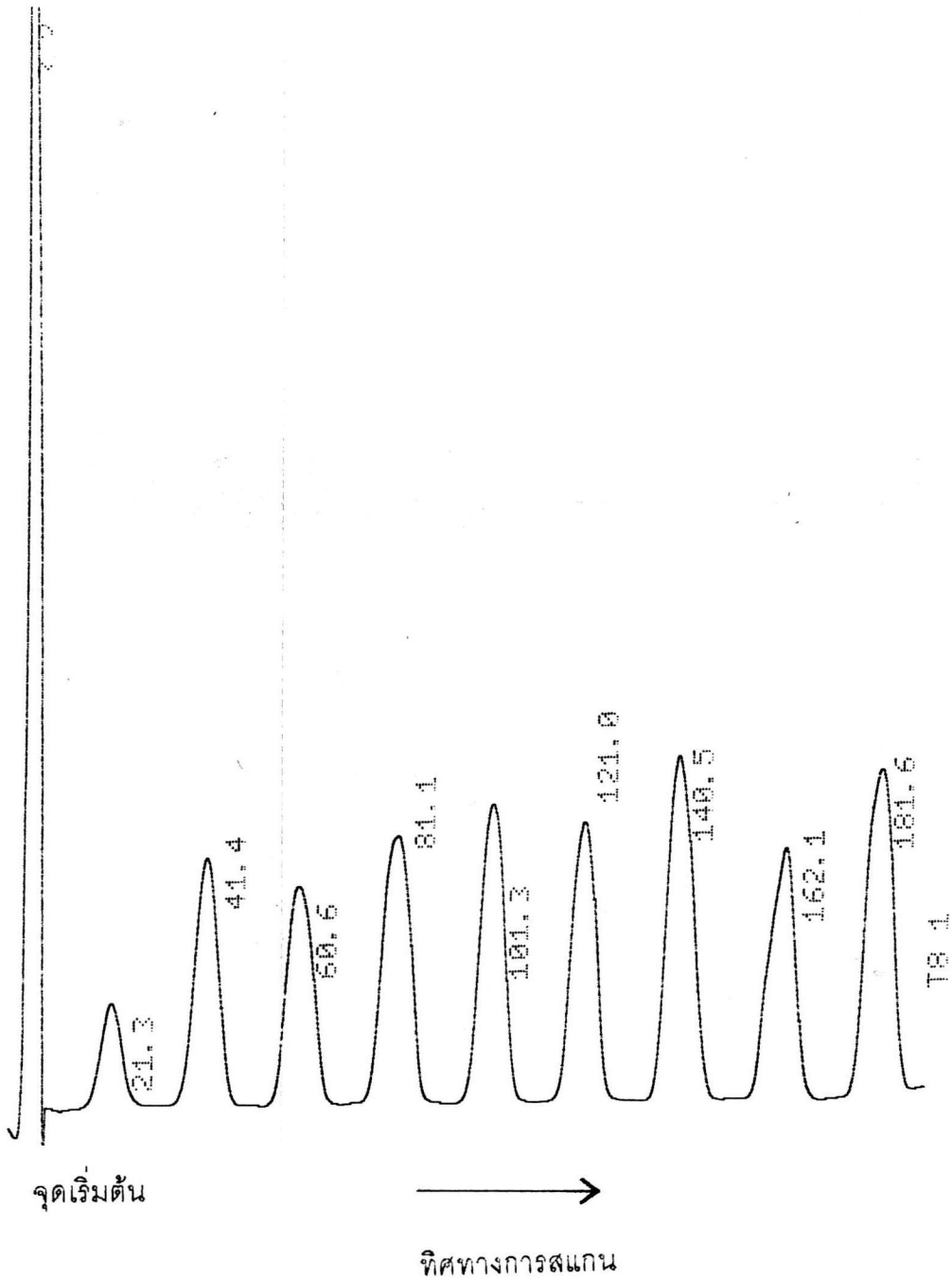
รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
ด้วยวิธีการของ Bernfeld



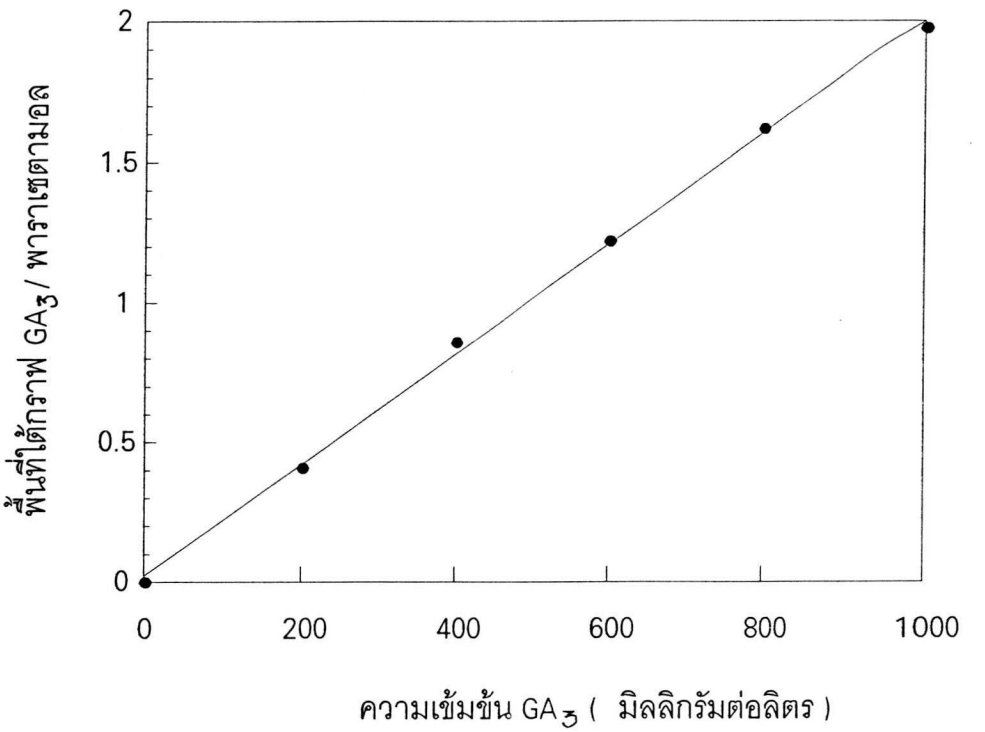
รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีการของ Huglet และ Nixon



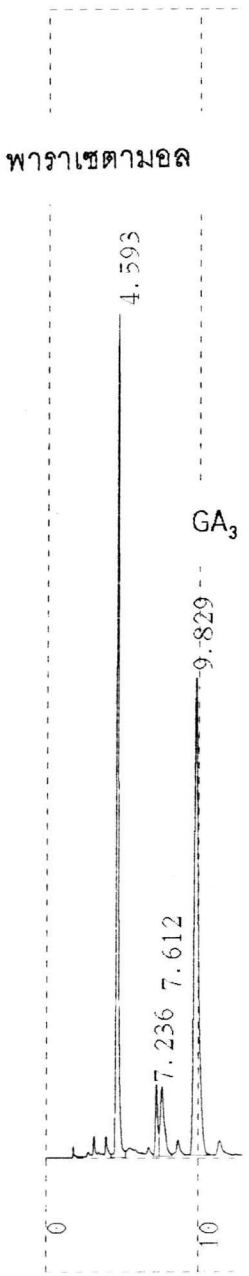
รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPTLC



รูปที่ 27 ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 ที่สแกนด้วยเครื่อง TLC-densitometer ที่ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร



รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPLC



รูปที่ 29 ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 เมื่อใช้พาราเซตามอล
เป็นสารเปรียบเทียบภายใน วิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอุษามาส วังชัยสุนทร เกิดวันเสาร์ที่ 22 สิงหาคม พ.ศ. 2512 ที่จังหวัดอุดรธานี สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2533 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2535