บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

2.1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psychotherm incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., N.J., USA.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น RC-TK ของบริษัท Infor Co., Ltd.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Aquatherm water bath shaker) รุ่น G-86 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., USA.

ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ รุ่น IN-81 ของบริษัท Yamato Scientific Co., Ltd., Japan.

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) Laboratory hot plate PC-101 Corning Glass Works, Corning, N.Y. ,USA.

เครื่องเขย่า (vortex) รุ่น Vortex-Genie No. 2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc.,USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Minor 35 MSE ของบริษัท MSE Ltd., England.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T ของบริษัท Kubota.

เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-26 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

ตู้อบแห้ง ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มีอุณหภูมิในช่วง 0 - 200 ^{o}C ความผิดพลาด $\pm$ 5 ^{o}C สั่งทำในประเทศ

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) รุ่น CHA ของบริษัท Olympus Optical Co., Ltd., Japan.

แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer) รุ่น Neubauer Bright Line ของบริษัท Bacco Co., Ltd., Germany.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21ของบริษัท Bausch & Lomb USA.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH-meter) รุ่น HI 8424 ของบริษัท Hanna Instruments, Italy

เครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator RE 52 ของบริษัท Yamato Scientific Co., Ltd., Japan.

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High performance liquid chromatography) Shimadzu Co., Ltd., Japan.

เครื่องกลั่นไนโตรเจน (Unit distillation) รุ่น Buchi 315 ของบริษัท Laboratoriums-Technik AG Co., Ltd., Switzerland

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD 300-5L ของบริษัท B.E. Marubishi, Tokyo, Japan. ตัวถังเป็นแก้ว มีใบพัด (impeller) แบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC-SS เครื่องอัดอากาศ (air compresser) ของบริษัท Hitachi, Japan. และเครื่องควบคุมระบบหล่อน้ำเย็น (circular type handy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Kagaka, Japan.

ถังหมักขนาด 30 ลิตร รุ่น MSJ-U2CL ของบริษัท B.E. Marubishi Co., Ltd., Tokyo, Japan. ตัวถังเป็นสเตนเลส มีใบพัด แบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC-C1 เครื่องอัดอากาศ (air compresser) รุ่น AL 15 SA ของบริษัท Kobelco, Japan.

ถังหมักขนาด 300 ลิตร รุ่น MSJ-U300L ของบริษัท B.E. Marubishi Co., Ltd., Tokyo, Japan. ตัวถังเป็นสเตนเลส มีใบพัด แบบ 6-blade turbine ตัวควบคุมภาวะเป็น bioprocess controller รุ่น MDIAC-C3 เครื่องอัดอากาศ (air compresser) รุ่น AL 15 SA ของบริษัท Kobelco, Japan.

2.1.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 2-1 แสดงชื่อสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
เมธิลแอลกอฮอล์	J.T. Baker ประเทศสหรัฐอเมริกา
เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical ประเทศญี่ปุ่น
พี จี โอ เอนไซม์	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา
พาราเซตามอล	Atlantic Laboratories ประเทศไทย
กรดจิบเบอเรลลิก(GA_3)มาตรฐาน	Sigma ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมีที่ใช้แสดงดังตารางที่ 2-1 ส่วนสารเคมีที่ใช้นอกจากที่กล่าวมานี้ สั่งซื้อจากบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน และ สารอาหาร เช่น น้ำตาลซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง และวุ้นผง ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้เกรดทางการค้า (Commercial grade) ที่มีจำหน่ายในประเทศไทย ส่วนกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้ว และ กากเมล็ดฝ้ายที่สกัดน้ำมันออกแล้ว ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท อุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อ *G.fujikuroi* N9-34 ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์โดย จันทร์ธิรา ลัภยพร (2536)และได้ทำการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย ศุภชัย สมัปปิโต(2537)

2.3 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เขี่ยเส้นใยของเชื้อ *G.fujikuroi* N9-34 โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเดกซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar,PDA)(ภาคผนวก ก. 1) ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

2.4.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเส้นใยของเชื้อ *G.fujikuroi* N9-34 ลงบนอาหารแข็งเอียงอะซิเตต(Acetate agar slant) (ภาคผนวก ก. 2) ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้หลอดไฟความเข้มแสง 9,840 ลักซ์ เป็นเวลา 7 วัน ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใช้เข็มเขี่ยสปอร์กระจายให้ทั่ว เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) กรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 5 ชั้น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นับจำนวนสปอร์แขวนลอยโดยใช้แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Haemacytometer) ถ้าในกรณีที่ใช้เชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาเลี้ยงเพื่อเตรียมสปอร์จะต้องนำเชื้อไปเลี้ยงในอาหารแข็งเอียงโพเตโตเดกซ์โทรสอาการ์เสริมแร่ธาตุ (ภาคผนวก ก.1) บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มที่ จึงนำมาใช้เพื่อเตรียมสปอร์ตามวิธีข้างต้น

2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

2.4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 2.4.1 จำนวน 10^6 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4.2.2 การเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.2.1 ให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.3) ปริมาตร 2,700 มิลลิลิตร ที่บรรจุในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4.2.3 การเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.2.2 ให้ได้ปริมาตร 2 ลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก.3) ปริมาตร 18 ลิตร ที่บรรจุในถังหมักขนาด 30 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

2.4.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่า

ถ่ายเชื้อจากข้อ 2.4.2.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 7 วัน นำมาหาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ตามวิธีการวิเคราะห์ ในข้อ 2.6

2.4.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในระดับถังหมัก 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.2.1 ให้ได้ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 3,150 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 7 ไม่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการหมัก และใช้อะดีคานอล (adecanol) เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างทุกวันครั้งละ 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน นำมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด และวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกตามวิธีการวิเคราะห์ในข้อ 2.6

2.4.3.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในระดับถังหมัก 30 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.2.2 ให้ได้ปริมาตร 2 ลิตรถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 18 ลิตร ที่บรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 30 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเป็นไปตามการคำนวณของการกำหนดเกณฑ์การขยายส่วน ตามภาคผนวก จ. และ อัตราการให้อากาศมีค่า 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ใช้อะดีคานอล(adecanol) เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน

2.4.3.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินในระดับถังหมัก 300 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 2.4.2.3 ให้ได้ปริมาตร 20 ลิตรถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวก ก.4) ปริมาตร 180 ลิตร ที่บรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 300 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน และ อัตราการให้อากาศเป็นไปตามภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ที่ได้จากการศึกษาในถังหมักขนาด 30 ลิตร เพื่อกำหนดเป็นเกณฑ์การขยายส่วน ใช้อะดีคานอล(adecanol) เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดย *Gibberella fujikurol* N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) เป็นภาวะอ้างอิง

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามข้อที่2.4.1นำมาใช้ในการเตรียมหัวเชื้อตามข้อที่2.4.2.1 และนำมาใช้ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อที่ 2.4.3.2 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก หาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.2 การศึกษาผลการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดย *Gibberella fujikurol* N9-34 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อให้อากาศที่มีการผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ทำการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อ 2.4.3.2 เติมอากาศที่ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั่วโมงที่ 72 ของการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยควบคุมความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็น 5 % (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยง) ตลอดการเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ วัน นำตัวอย่างมาหา ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก และทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ตามวิธีการทดลอง 2.5.1)

2.5.3 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อเพิ่ม และ ลดปริมาณเซลล์ในช่วงต้นของการผลิต โดย *Gibberella fujikurol* N9-34 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ตามข้อ 2.4.3.2 จำนวน 3 ถัง โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างจากถังที่ 1 และ ถังที่ 2 มาถังละ 1,200 มิลลิลิตร ปั่นแยกเซลล์ออก นำเซลล์ที่ได้เติมลงในถังที่ 1 และนำเอาน้ำหมักที่แยกได้เติมลงในถังที่ 2 โดยให้มีปริมาตรสุทธิของน้ำหมักในส่วนที่ 1 และ 2 มีปริมาตร 3.5 ลิตร ส่วนถังที่ 3 เป็นตัวอย่างควบคุม ปริมาตร 3.5 ลิตร จากนั้นทำการเลี้ยงต่อจนครบ 8 วัน โดยทำการเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1

ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆวัน นำมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก และทำการเปรียบเทียบการทดลอง

2.5.4 ศึกษาผลของการเตรียมหัวเชื้อ 2 ขั้นตอน และ ขนาดของขวดเพาะเลี้ยงหัวเชื้อต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

ทำการเตรียมสปอร์ตามข้อ 2.4.1 แยกเตรียมหัวเชื้อออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นตัวอย่างควบคุม โดยทำการเลี้ยงหัวเชื้อตามข้อ 2.4.2.1ทำการเลี้ยงหัวเชื้อ 2 ครั้ง ซึ่งมีขนาดของหัวเชื้อเพิ่มขึ้น โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตร และขวดขนาด 250 มิลลิลิตร มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขั้นตอนที่ 1 และ 2 ตามลำดับ และทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ใช้ขนาดขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทั้ง 2 ขั้นตอน จากนั้นถ่ายหัวเชื้อ 10 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารสำหรับผลิตตามข้อ 2.4.3.1 โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ 500 มิลลิลิตร มีอาหารเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆวันทั้ง 2 ส่วน นำมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.5 การหาอายุของหัวเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร สำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมัก 30 ลิตร ของเชื้อ *Gibberella fujikurol* N9-34

หาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อตามวิธีเตรียมหัวเชื้อ 2.4.2.2 ในสูตรอาหารเตรียมหัวเชื้อของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) (ภาคผนวก ก.4) อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงคือ 25 องศาเซลเซียส ทำการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนถึง 96 ชั่วโมง และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราการเจริญจำเพาะ

2.5.6 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมักขนาด 30 ลิตร โดย *Gibberella fujikurol* N9-34

2.5.6.1 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมักขนาด 30 ลิตร ในภาวะการเลี้ยงเช่นเดียวกับ 5 ลิตร

ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อ 2.4.3.3 โดยมีการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.5.6.2 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนให้คงที่ในถังหมักขนาด 30 ลิตร

2.5.6.2.1 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ (Reynold number) ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และถังหมักขนาด 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อ 2.4.3.3 โดยมีการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และ อัตราการกวนประมาณ 300 รอบต่อนาที (ได้จากการคำนวณตามภาคผนวก จ. 2.4) ทำการเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.6.2.2 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อกำหนดให้ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัด (πnDi) ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และถังหมักขนาด 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.5.6.2.1 แต่อัตราการกวนมีค่าประมาณ 400 รอบต่อนาที (ได้จากการคำนวณตามภาคผนวก จ. 2.2)

2.5.6.2.3 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังของมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก (P_g/V) ของถังหมักขนาด 30 ลิตร และถังหมักขนาด 5 ลิตรมีค่าเท่ากัน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.5.6.2.1 แต่อัตราการกวนมีค่าประมาณ 500 รอบต่อนาที (ได้จากการคำนวณตามภาคผนวก จ. 2.1)

2.5.6.2.4 การหาค่า Parameter constant ของถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยวิธี Dynamic measurement

เพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.4.3.3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อทำการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 12 ทำการปิดการให้อากาศ บันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลาย โดยใช้หัววัดออกซิเจน (dissolved oxygen probe) จากนั้นเปิดการให้อากาศอีกครั้ง บันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลายเพิ่มขึ้นจนคงที่ จากนั้นทำการปรับภาวะการหมักโดยกำหนด อัตราการกวนเป็น 500 และ 600 รอบต่อนาที และทำการปิดและเปิดอากาศ พร้อมบันทึกปริมาณออกซิเจนที่ละลาย จากนั้นปรับอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำตามวิธีข้างต้น โดยใช้

อัตราการกวนเป็น 400,500 และ 600 รอบต่อนาที จากนั้นนำค่าออกซิเจนที่บันทึกได้ไปคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนที่ภาวะต่างๆตามภาคผนวก ง และ หาค่า Parameter α และ β ของถังหมัก 5 ลิตร โดยเขียนกราฟระหว่างค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนกับอัตราการกวนเมื่อให้อัตราการให้อากาศคงที่ และ เขียนกราฟระหว่างค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนกับอัตราการให้อากาศเมื่อให้อัตราการกวนคงที่ จากนั้นหาค่าความชันของกราฟ จะได้ค่า Parameter α และ β ของถังหมัก 5 ลิตร ตามลำดับ

2.5.6.2.5 การหาค่า Parameter constant ของถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยวิธี Dynamic measurement

เพาะเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.4.3.3 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร ที่มีการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2.5.6.2.4 และเพิ่มอัตราการให้อากาศอีกค่าหนึ่งคือ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที

2.5.7 การเปรียบเทียบผลการทดลองเมื่อกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนในถังหมักขนาด 30 ลิตรให้คงที่

ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก และ ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อกำหนดเกณฑ์การขยายส่วนคงที่ และ กำหนดเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดย *Gibberella fujikuroi* N9-34 กับการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.5.8 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย *G. fujikuroi* N9-34 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก

ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อ 2.4.3.3 โดยทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (dissolved oxygen) มีค่า 10 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ตลอดการหมัก เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดอัตราการกวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเริ่มต้น 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ขณะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจน ทำโดยควบคุมอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเป็นแบบอัตโนมัติ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน และทำการเก็บ

I20514827

ตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.9 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย *G. fujikurol* N9-34 ในถังหมักขนาด 30 ลิตร เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก โดยมีการแปรอัตราการให้อากาศ

ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อ 2.4.3.3 โดยทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (dissolved oxygen) มีค่า 10 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ตลอดการหมัก เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดอัตราการกวนเริ่มต้น 400 รอบต่อนาที แปรอัตราการให้อากาศ 1 และ1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีตลอดการทดลอง ขณะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจน ทำโดยควบคุมอัตราการกวนเป็นแบบอัตโนมัติ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.10 การเปรียบเทียบผลการทดลองการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 10 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ที่ภาวะต่าง ๆในถังหมักขนาด 30 ลิตร กับการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน อัตราการกวน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก และ ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการหมักในถังหมักขนาด 30 ลิตร ที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 10 % กับการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.5.11 การหาอายุของหัวเชื้อในถังหมักขนาด 30 ลิตรสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในถังหมัก 300 ลิตร ของเชื้อ *Gibberella fujikurol* N9-34

หาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อตามวิธีเตรียมหัวเชื้อ 2.4.2.3 ในสูตรอาหารเตรียมหัวเชื้อของ ศุภชัย สมัปปิโต (2537) (ภาคผนวก ก. 4) อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงคือ 25 องศาเซลเซียส ทำการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศ

ต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมง และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราการเจริญจำเพาะ

2.5.12 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย *G. fujikurol* N9-34 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 10 %

ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อ 2.4.3.4 โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (dissolved oxygen) มีค่า 10 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยกำหนดอัตราการกวนเริ่มต้น 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตลอดการทดลองขณะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจน ทำโดยควบคุมอัตราการกวนเป็นแบบอัตโนมัติ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน และเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.5.13 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย *G. fujikurol* N9-34 ในถังหมักขนาด 300 ลิตร เมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 20 %

ทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกตามข้อ 2.4.3.4 โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก (dissolved oxygen) มีค่า 20 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว เมื่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเริ่มลดลงจนใกล้ 20 % โดยกำหนดอัตราการกวนเริ่มต้น 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ตลอดการทดลองขณะที่ควบคุมปริมาณออกซิเจน ทำโดยควบคุมอัตราการกวนเป็นแบบอัตโนมัติ ทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน และก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำตัวอย่างมาหา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก

2.6 วิธีการวิเคราะห์

2.6.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (Calam,1969)

นำน้ำหมักปริมาตร 25 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรองวัตต์แมนเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นนำไปอบแห้ง โดยนำไปอบแห้งที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นใน desiccator นำไปชั่งน้ำหนักและหักลบน้ำหนักกระดาษกรองจะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง

2.6.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก

วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก ด้วยเครื่องวัดพีเอช(pH meter)

2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(reducing sugar) โดยวิธีการของ Bernfeld (Bernfeld,1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข. 2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที และทำให้เย็นทันที แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 0.1- 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ตามภาคผนวก ฉ-2

2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase)

เติมสารละลายอินเวอร์เทสในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1โมลาร์พีเอช 4 (ภาคผนวก ข. 3) ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมลงในตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามข้อ2.6.3 จะได้น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด นำปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากข้อ 2.6.4 ลบออกด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากข้อ 2.6.3 จะเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากน้ำตาลซูโครสในตัวอย่าง

กราฟมาตรฐานใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0.1- 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ตามภาคผนวก ฉ-1

2.6.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้ พีจีโอเอนไซม์ โดยวิธีการของ Huggett และ Nixon (Huggett and Nixon, 1957)

เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (ภาคผนวก ข. 4) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

กราฟมาตรฐาน ใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ตามภาคผนวก ฉ-3

2.6.6 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โดยวิธีของ Kjeldahl (Steyermark, 1951)

ชั่งของผสมของตัวเร่งปฏิกิริยา(catalyst mixture) (ภาคผนวก ข. 5.1) ปริมาณ 7 กรัม ใส่ในขวดกลั่นขนาด 300 มิลลิลิตร เติมตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดกำมะถันเข้มข้นปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมด้วยเครื่อง Buchi 425 ในตู้ควันจนได้สารละลายใสสีเขียว ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจับแอมโมเนียมที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ข. 5.2) จำนวน 2-3 หยด กลั่นจนกระทั่งสารละลายกรดบอริกมีปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 โมลาร์กรดไฮโดคลอริก

$$\text{โดยที่ ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด} = (A-B) \times N \times 1.4$$

เมื่อ A = ปริมาตร (มล.) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง
B = ปริมาตร (มล.) ของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรทกับแบลงค์
N = ความเข้มข้น(นอร์มอล) ของกรดไฮโดรคลอริก

2.6.7 การวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ปรับปรุงจากวิธีของ อรไท สุขเจริญ(2533) และ สุภาพร พรพรหมกุล (2533)

นำตัวอย่างน้ำหมักมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 ด้วย 2 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำตัวอย่างที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างแล้วมา 3 มิลลิลิตร

เติมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) คือ พาราเซตามอลที่มีความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สกัดด้วยเอธิลอะซิเตต 5 มิลลิลิตร ในหลอดเกลียว เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องผสมนาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น แล้วจึงนำชั้นของน้ำหมัก 2 มิลลิลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 3 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) 70 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตจำนวน 4 มิลลิลิตร เขย่านาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นของเอธิลอะซิเตตมาเติมโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous) เพื่อขจัดน้ำ นำสารละลายที่ได้มา 3 มิลลิลิตร มาระเหยแห้งด้วยเครื่องระเหยแห้งภายใต้สุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator)ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำมาละลายด้วยสารละลายเมธานอล เข้มข้นร้อยละ 35 ในสารละลายกรดฟอสฟอริกพีเอช 3 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตตที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC คำนวณปริมาณ GA_3 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ฉ-4)ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ อรไท สุขเจริญ (2533)

คอลัมน์	: Spherisorb 5 C8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	: เมธานอลและสารละลายกรดฟอสฟอริกพีเอช 3 อัตราส่วน 35 ต่อ 65
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	: 1 มิลลิลิตรต่อนาที
วิเคราะห์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต	: 208 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	: 0.08 AUFS(absorbance unit full scale)
ปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์	:10 ไมโครลิตร
ความดัน	: ประมาณ 180-200 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
เวลาที่สารอยู่ในคอลัมน์ (retention time)	: ประมาณ 10 นาที