บทที่ 3

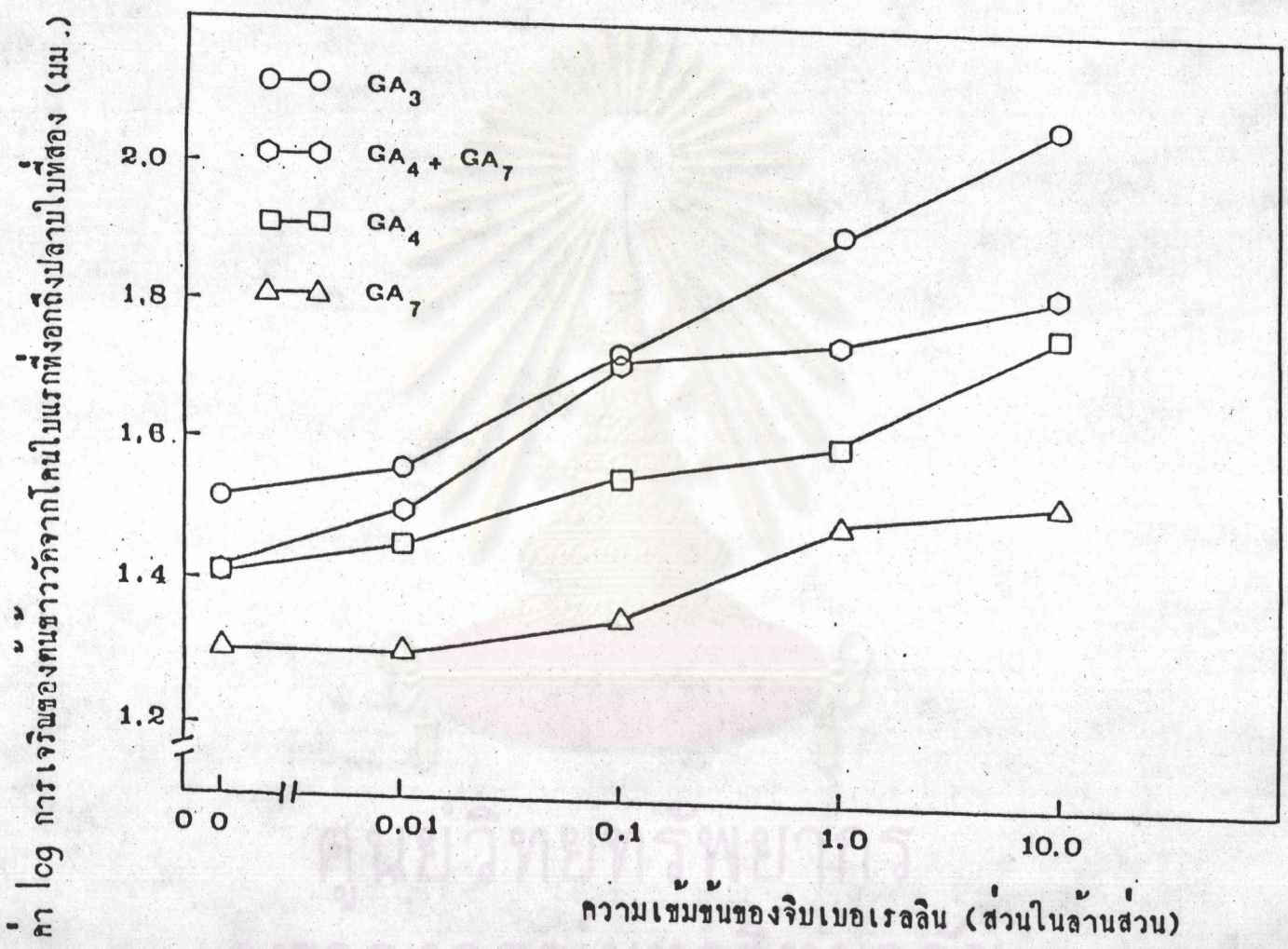
ผลการวิจัย

3.1 เปรียบเทียบวิธีตรวจสอบชนิดและปริมาณของจิบเบอเรลลิน

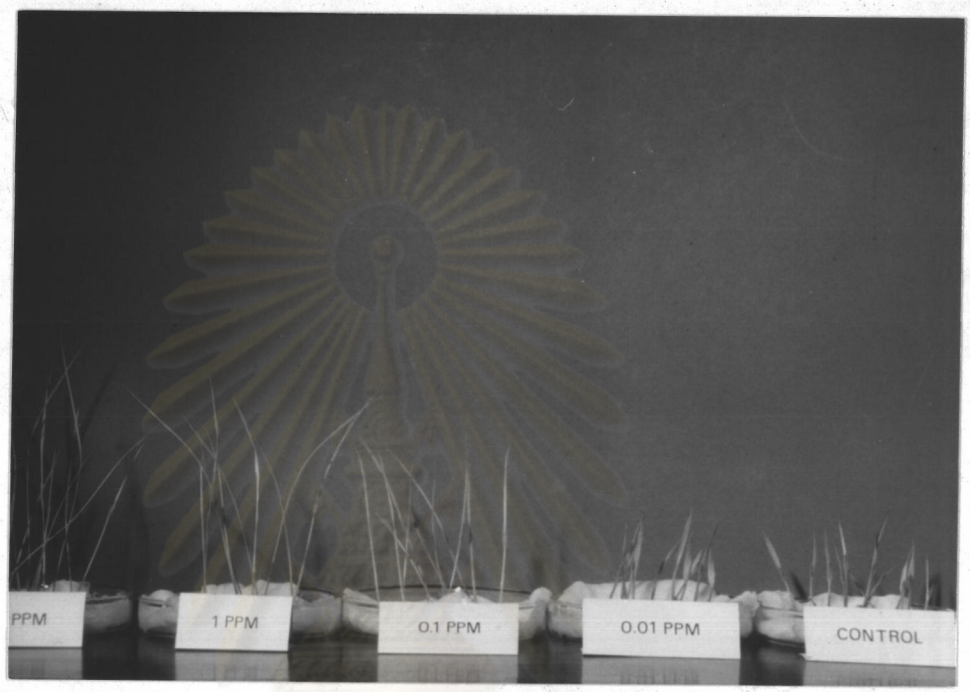
3.1.1 วิธีทางชีวภาพ (bioassay)

เตรียมเมล็ดข้าวแคระ (Tanginbozu dwarf rice seed) สำหรับการตรวจสอบโดยเพาะเลี้ยงตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.1.1 โดยใช้สารมาตรฐานจิบเบอเรลลินที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 0.01 0.1 1.0 และ 10.0 ส่วนในล้านส่วน (ppm) ตรวจสอบผลการเจริญของต้นข้าวภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน เปรียบเทียบกับปริมาณจิบเบอเรลลินที่ต้นข้าวได้รับ พบว่าผลการเจริญ (วัดตามวิธีข้อ 2.4.1.1) ของต้นข้าวมีความสัมพันธ์ในลักษณะเป็นเส้นตรงกับปริมาณของ GA เมื่อความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่าง 0.01-10.0 ppm แต่ไม่มีความสัมพันธ์ในลักษณะเป็นเส้นตรงกับปริมาณของ GA_3 หรือ GA_4 หรือสารผสมของ GA_4 + GA_7 เมื่อความเข้มข้นอยู่ในช่วงระหว่าง 0-10.0 ppm ดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6 ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสมของการตรวจสอบชนิด และปริมาณผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีทางชีวภาพแล้ว วิธีทางชีวภาพยังมีความคลาดเคลื่อนอยู่มาก ไม่สามารถบ่งชนิดและปริมาณได้อย่างแม่นยำ แต่เนื่องจากวิธีทางชีวภาพก็ยังมีความสำคัญในการตรวจยืนยันว่าสารตัวอย่างมีกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) ต่อพืชหรือไม่ จึงเลือกวิธีการตรวจสอบโดยทางชีวภาพนี้ เป็นการตรวจยืนยันสารตัวอย่างว่ามีกิจกรรมทางชีวภาพต่อต้นพืชจริง โดยจะตรวจสอบกับสารตัวอย่างที่ผ่านการตรวจสอบโดยวิธีทางเคมี (chemical assay) แล้วเท่านั้น

รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ของจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆกับการเจริญของข้าวแคระ โดยใช้สารมาตรฐาน GA_3 GA_4 GA_7 และสารผสมของ $GA_4 + GA_7$ (ในสัดส่วน 47% และ 45.5% ตามลำดับ) ความเข้มข้น 0.01-10.0 ส่วนในล้านส่วน (ppm)



รูปที่ 6 ลักษณะการเจริญของต้นข้าวเปรียบเทียบกับปริมาณ GA_3 (ส่วนในล้านส่วน) ที่ต้นข้าวได้รับ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2 วิธีทางเคมี (chemical assay)

3.1.2.1 โดยการทำโครมาโตรกราฟีบนแผ่นทินเลเยอร์ (TLC)

3.1.2.1.1 ระบบตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วย TLC

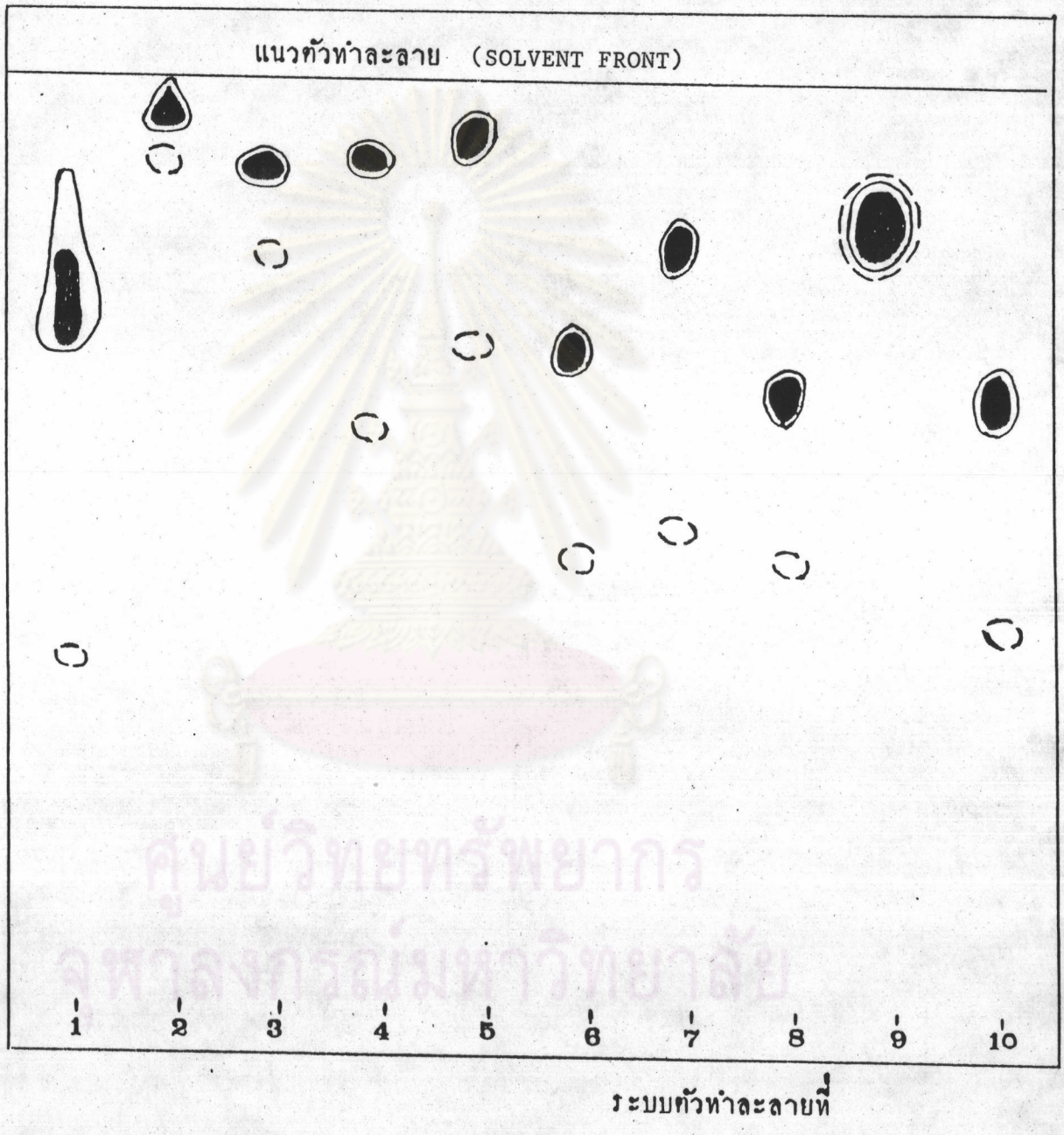
จากการทำโครมาโตกราฟีของสารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7 บนแผ่นซิลิกาตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.1.2.1 โดยใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) ที่มีชนิดและอัตราส่วนต่างๆ กัน 10 ระบบ และเปรียบเทียบค่า R_f ที่ได้ของจิบเบอเรลลินแต่ละชนิด พบว่าระบบตัวทำละลายทั้ง 10 ระบบให้การแยกของสารมาตรฐานGA_3 ออกจาก GA_4 และGA_7 แต่ไม่สามารถแยกสารมาตรฐาน GA_4 และGA_7 ออกจากกันได้ ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 7 ดังนั้นการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินด้วย TLC จึงไม่เหมาะสมโดยเฉพาะ GA_4 และ GA_7 ซึ่งแยกไม่ได้โดยวิธีนี้ แต่จากผลการทดลองนี้เราจะเลือกระบบตัวทำละลายที่ประกอบด้วยเอทธิลอะซีเตต คลอโรฟอร์ม และกรดอะซีติกในอัตราส่วน 15 5 และ 1 ส่วนตามลำดับ เป็นตัวแทนของระบบตัวทำละลายในการทดลองใช้เครื่อง High Speed TLC-Scanner อ่านค่าความเข้มของจุดสารมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลการเปรียบเทียบการใช้ระบบตัวทำละลาย (solvent system) ชนิดและอัตราส่วนต่าง ๆ ต่อการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน โดยวิธีทางทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี เมื่อใช้สารละลายมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7 ปริมาณ 10 ไมโครกรัมต่อจุด

ระบบตัวทำละลาย	อัตราส่วน	ค่า Rf		
		GA_3	GA_4	GA_7
1. คลอโรฟอร์ม : เมทานอล	3:1	0.37	0.7-0.8	0.7-0.9
2. คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : กรดอะซีติก	20:5:1	0.91	0.95	0.95
3. "	25:5:1	0.81	0.90	0.90
4. "	35:5:1	0.62	0.90	0.91
5. คลอโรฟอร์ม : เมทานอล : กรดอะซีติก : น้ำ	70:20:3:2	0.71	0.94	0.94
6. เอทธิลอะซีเตต : คลอโรฟอร์ม : กรดอะซีติก	15:5:1	0.49	0.70	0.70
7. "	4:5:1	0.51	0.82	0.82
8. "	20:8:1	0.49	0.63	0.63
9. เอทานอล : น้ำ : กรดอะซีติก	11:9:0.1	0.85	0.85	0.85
10. เบนซีน : อะซีโตน : กรดอะซีติก	13:6:1	0.41	0.67	0.67

รูปที่ 7 ลักษณะโครมาโตแกรมของการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน โดยวิธีทางทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีและใช้ระบบตัวทำละลายต่างๆ (ดังตารางที่ 6)



หมายเหตุ : หมายเลขของระบบตัวทำละลาย หมายถึง ระบบตัวทำละลายตามตารางที่ 6

○ GA_3 ● GA_4 ○ GA_7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2.1.2 <u>การอ่านค่าความเข้มของจุดสารบนแผ่นซิลิกาด้วย High Speed TLC-Scanner</u>

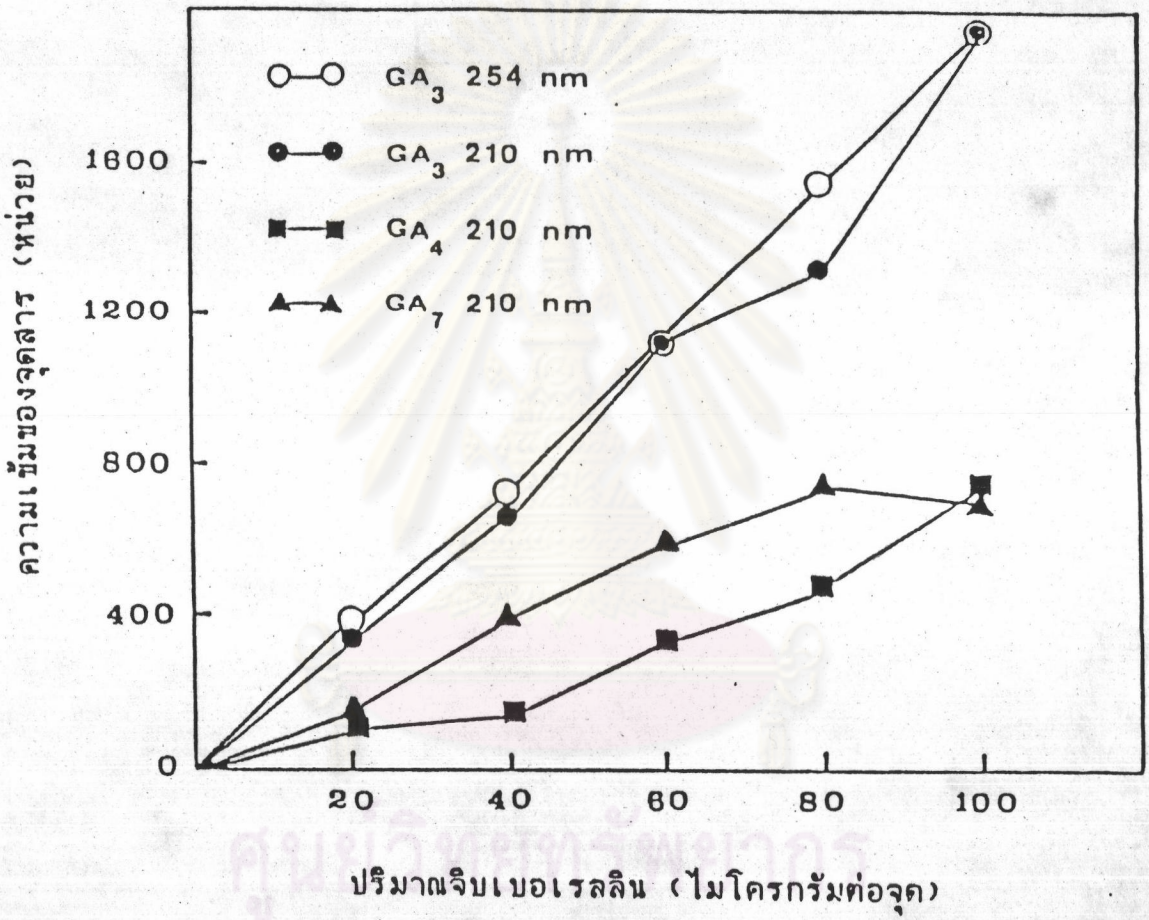
จากผลการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของจุดสารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7 บนแผ่นซิลิกาที่ผ่านการทำโครมาโตกราฟีกับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด โดยผันแปรปริมาณของสารมาตรฐานระหว่าง 20-100 ไมโครกรัมต่อจุด และใช้ระบบตัวทำละลายซึ่งประกอบด้วยเอทธิลอะซีเตต, คลอโรฟอร์ม และกรดอะซีติกในอัตราส่วน 15 5 และ 1 ส่วนตามลำดับ วัดความเข้มของสารโดยอ่านค่าดูดกลืนแสงของจุดสารมาตรฐาน GA_3 ที่ความยาวคลื่น 254 และ210 นาโนเมตรซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ GA_3 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด และอ่านค่าการดูดกลืนแสงของจุดสารมาตรฐาน GA_4 และ GA_7 ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่ GA_4 และ GA_7 ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด โดยใช้เครื่อง High Speed TLC-Scanner พบว่าค่าความเข้มของจุดสารมาตรฐาน GA_3 ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณสารมาตรฐาน แต่ค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7 ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ไม่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณสาร ดังแสดงในรูปที่ 8 ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้ของวิธีการอ่านค่าความเข้มของจุดสารด้วยเครื่อง High Speed TLC-Scanner แล้วจึงเป็นวิธีที่ไม่สามารถนำมาใช้ในการหาปริมาณของจิบเบอเรลลิน

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.1.2.1.1 และ 3.1.2.1.2 รวมกัน พอสรุปได้ว่าวิธีการทางทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีไม่เหมาะสม ในการที่จะนำมาใช้ตรวจสอบชนิดและปริมาณของจิบเบอเรลลินด้วยเหตุผล 2 ประการคือ

1. ระบบตัวทำละลายไม่สามารถแยกสารมาตรฐาน GA_4 และ GA_7 ออกจากกัน

2. ค่าความเข้มของจุดสารมาตรฐานที่อ่านด้วยเครื่อง High Speed TLC-Scanner ไม่มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับปริมาณสารมาตรฐาน

รูปที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มของจุดสารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7 กับปริมาณสารมาตรฐาน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2.2 โดยวิธีไฮเพอฟอรมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

3.1.2.2.1 วิธีการสกัดที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วย HPLC

จากการเตรียมสารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และGA_7 และสกัดตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.1.2.2.1 พบว่าการสกัด GA_3 โดยใช้เอทธิลอะซีเตต ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเอทธิลอะซีเตต เป็นสารสกัดตามลำดับ จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใช้เอทธิลอะซีเตต โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1% และเอทธิลอะซีเตตในขั้นตอนการสกัด แต่ในทางตรงข้ามพบว่าการสกัด GA_4 และGA_7 โดยใช้เอทธิลอะซีเตต โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1% และเอทธิลอะซีเตตตามลำดับ จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใช้เอทธิลอะซีเตต ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเอทธิลอะซีเตต ดังแสดงในตารางที่ 7 ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงความเหมาะสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งประสิทธิภาพการสกัดโดยส่วนรวมแล้วจึงเลือกการสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตต โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 1% และเอทธิลอะซีเตตตามลำดับ (ดังภาคผนวกที่ 3.1) เป็นวิธีการสกัด เพื่อตรวจสอบชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์จากน้ำหมักด้วย HPLC สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบวิธีการสกัดที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลิน โดยวิธีทางไฮเพอฟอรมานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) เมื่อใช้สารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7 ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมล.

วิธีการสกัด	ประสิทธิภาพการสกัด (เปอร์เซ็นต์)		
	GA_3	GA_4	GA_7
เอทธิลอะซีเตต โซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1% และเอทธิลอะซีเตตตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 3.1)	50	84	86
เอทธิลอะซีเตต ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และเอทธิลอะซีเตตตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 3.2)	76	10	11

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.2.2.2 <u>ชนิดของสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบด้วย HPLC</u>

ผลการทดลองใช้สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) 3 ชนิดคือ 5 แอลฟา-โคเลสเทน (สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน สำหรับการตรวจสอบจิบเบอเรลลินโดยก๊าซโครมาโตกราฟี ซึ่งรายงานโดย J.L.Glenn,et al.(23)) เมทธิลพาราเบน และโปรพิลพาราเบน เตรียมและสกัดตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.1.2.2.2 พบว่าไม่ปรากฏโครมาโตแกรมของ 5 แอลฟา-โคเลสเทน ภายในเวลา 25 นาที (ดังแสดงในรูปที่ 9) ดังนั้นจึงไม่สามารถนำ 5 แอลฟา-โคเลสเทนมาใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน สำหรับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย HPLC ส่วนโครมาโตรแกรมของเมทธิลพาราเบนนั้นมีค่า t_R เหมาะสมคือมีค่าเท่ากับ 4.76 นาทีซึ่งเป็นค่าที่อยู่ระหว่าง t_R ของ GA_3 และ t_R ของ GA_7 (ดังรูปที่ 10.1 และ 10.2) แต่เมื่อทำการทดลองขั้นต่อไปพบว่าในอาหารเหลวที่เพาะเลี้ยงเชื้อรา <u>G. fujikuroi</u> มีผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งมีค่า t_R ใกล้เคียงกับค่า t_R ของเมทธิลพาราเบนมากจนพื้นที่ใต้กราฟทับกันซึ่งจะทำให้การตรวจสอบปริมาณผลิตภัณฑ์คลาดเคลื่อนไป (ดังรูปที่ 10.3) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้เมทธิลพาราเบนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน ส่วนโปรพิลพาราเบนนั้นภายหลังการสกัดร่วมกับสารมาตรฐาน ลักษณะโครมาโตแกรมจะเปลี่ยนแปลงไปโดยเมื่อสกัดร่วมกับ GA โครมาโตแกรมของทั้งโปรพิลพาราเบนและ GA_3 จะให้พื้นที่ใต้กราฟและค่า t_R เปลี่ยนไปเมื่อเทียบกับโครมาโตแกรมจากการสกัดสารแต่ละชนิดตามลำพัง และเมื่อสกัดร่วมกับ GA_4 และ GA_7 โครมาโตแกรมของโปรพิลพาราเบนจะเหลื่อมซ้อนกับ GA_4 และ GA_7 ทำให้เกิดโครมาโตแกรมลักษณะที่ไม่แยกกันโดยสมบูรณ์ระหว่างสารทั้ง 3 ชนิดดังกล่าว (ดังรูปที่ 11.1-11.5) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้โปรพิลพาราเบนเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบเช่นกัน

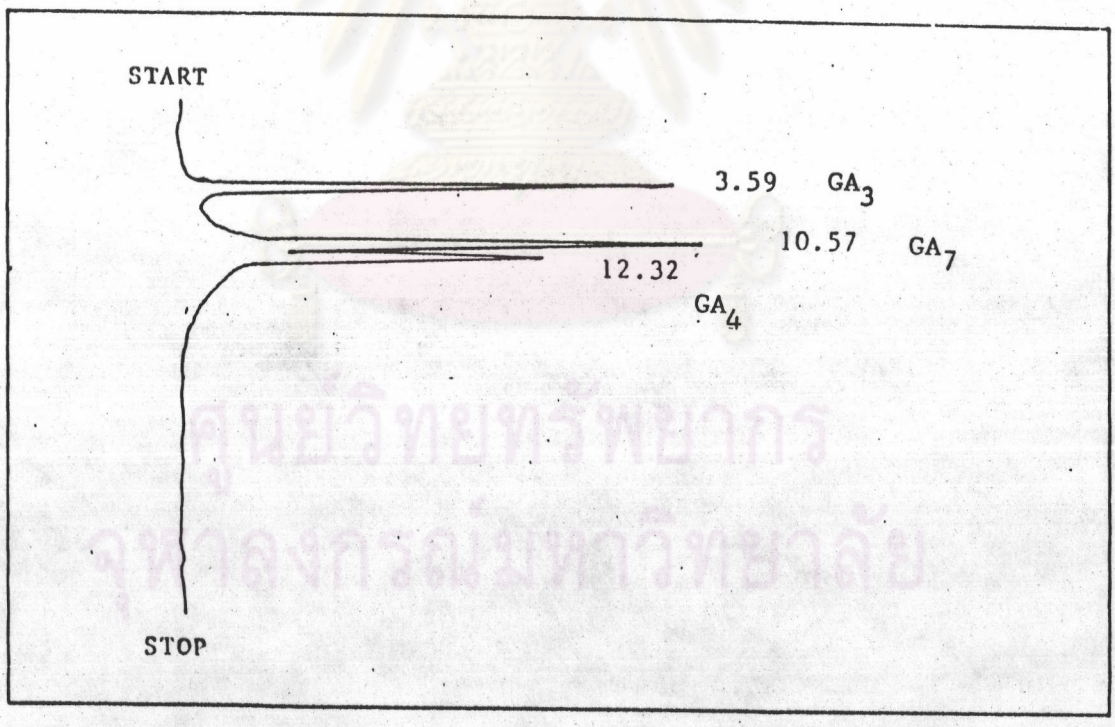
แม้จะมีรายงานการใช้จิบเบอเรลลินบางชนิดเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน ในงานวิจัยเกี่ยวกับการสังเคราะห์ทางชีวภาพ (biosynthesis) (13,14,21) แต่สำหรับงานวิจัยนี้ไม่สามารถ

เลือกใช้จิบเบอเรลลินชนิดใดเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในได้ เนื่องจากเชื้อรา Gibberella fujikuroi สามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้หลายชนิดและเนื่องจากงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาสภาวะที่ทำให้เชื้อราผลิตจิบเบอเรลลินได้มากขึ้น มิได้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาวิธีวิเคราะห์สาร ดังนั้นเมื่อประสบปัญหาในการหาสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) จึงเปลี่ยนมาใช้กราฟมาตรฐานในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินแทน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ลักษณะโครมาโตแกรมของการใช้ 5 แอลฟา-โคเลสเทน (5α-cholestane) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) สำหรับการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินด้วย HPLC โดยใช้ร่วมกับสารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7

t_R ของ GA_3 เท่ากับ 3.59 นาที
t_R ของ GA_4 เท่ากับ 12.32 นาที
t_R ของ GA_7 เท่ากับ 10.57 นาที



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T 18781581

รูปที่ 10 ลักษณะโครมาโตแกรมของการใช้เมทธิลพาราเบน (methylparaben) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) สำหรับการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินด้วย HPLC

t_R ของเมทธิลพาราเบน ระหว่าง 4.65-4.76 นาที

t_R ของ GA_3 ระหว่าง 3.39-3.5 นาที

t_R ของ GA_4 เท่ากับ 12.79 นาที

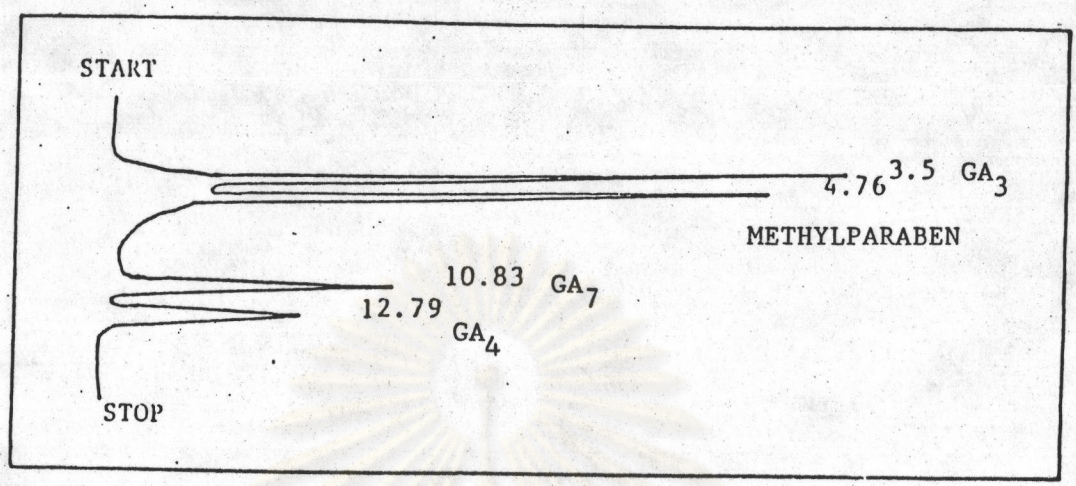
t_R ของ GA_7 เท่ากับ 10.83 นาที

10.1 เมทธิลพาราเบนร่วมกับสารมาตรฐาน GA_3 GA_4 และ GA_7

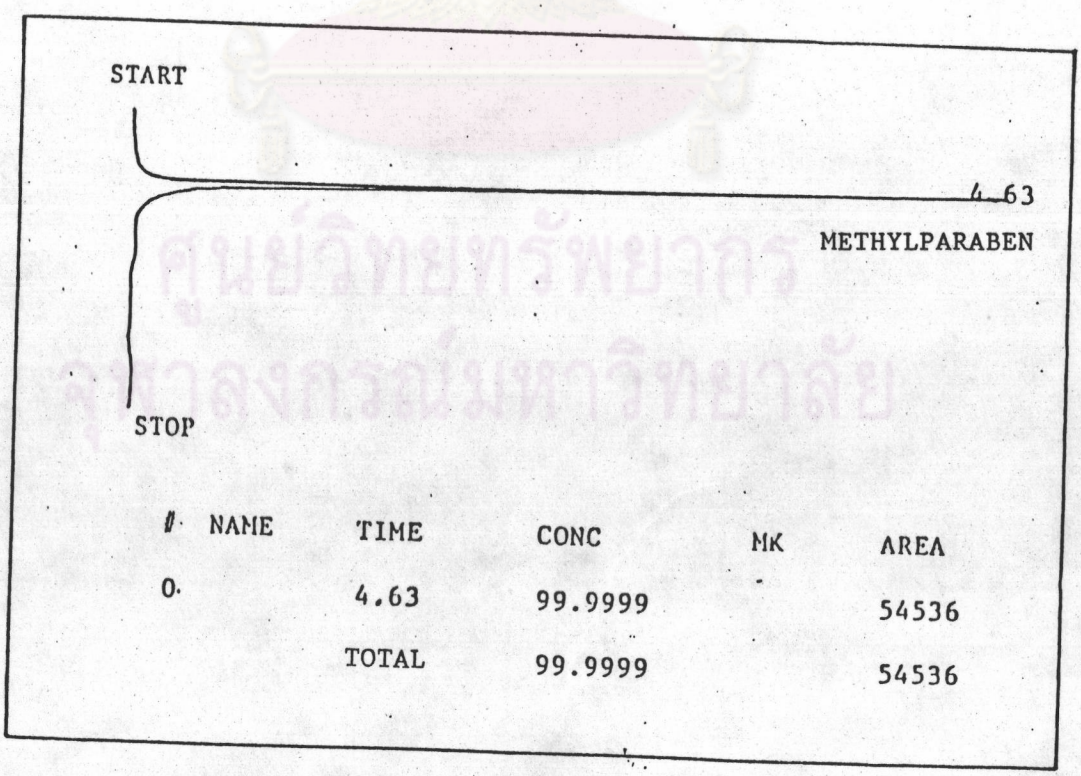
10.2 เมทธิลพาราเบนเพียงชนิดเดียว (พื้นที่ใต้กราฟของเมทธิลพาราเบน 2 ไมโครกรัม เท่ากับ 54,536)

10.3 เมทธิลพาราเบนร่วมกับน้ำหมักจากเชื้อรา G. fujikuroi (พื้นที่ใต้กราฟของเมทธิลพาราเบน 2 ไมโครกรัม เท่ากับ 193,289)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



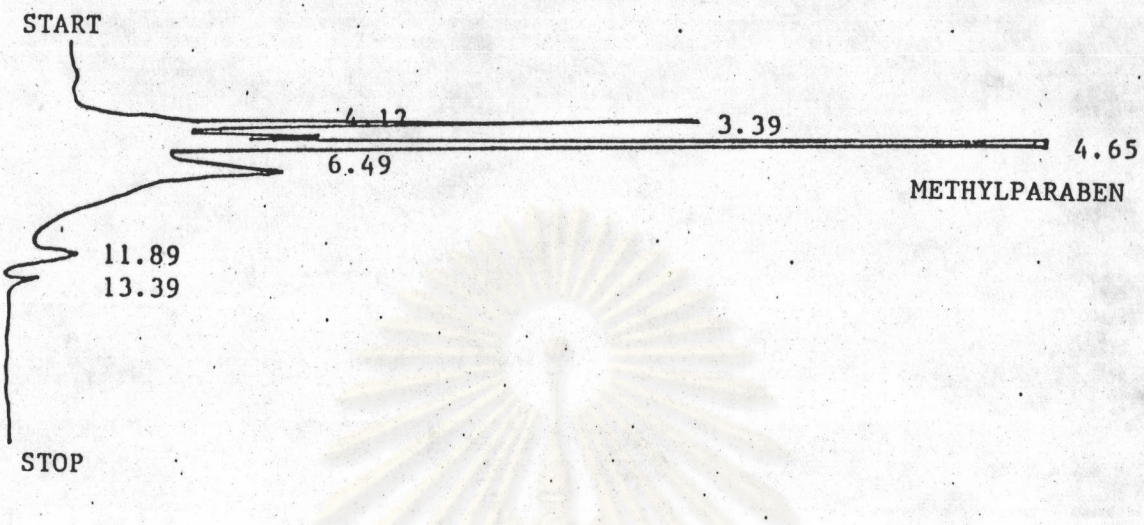
รูปที่ 10.1



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		4.63	99.9999		54536
		TOTAL	99.9999		54536

รูปที่ 10.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.39	16.8644		50562
0		4.12	3.3881		10158
0		4.65	64.469		193289
0		6.49	11.0894		33247
0		11.89	4.1888		12558
		TOTAL	99.9999		299818

รูปที่ 10.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 11 ลักษณะโครมาโตแกรมของการใช้โปรพิลพาราเบน (propylparaben) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) สำหรับการตรวจสอบชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินด้วย HPLC

t_R ของโปรพิลพาราเบน เท่ากับ 11.61 นาที

t_R ของ GA_3 เท่ากับ 3.79 นาที

t_R ของ GA_4 เท่ากับ 12.37 นาที

t_R ของ GA_7 เท่ากับ 10.64 นาที

11.1 โปรพิลพาราเบน

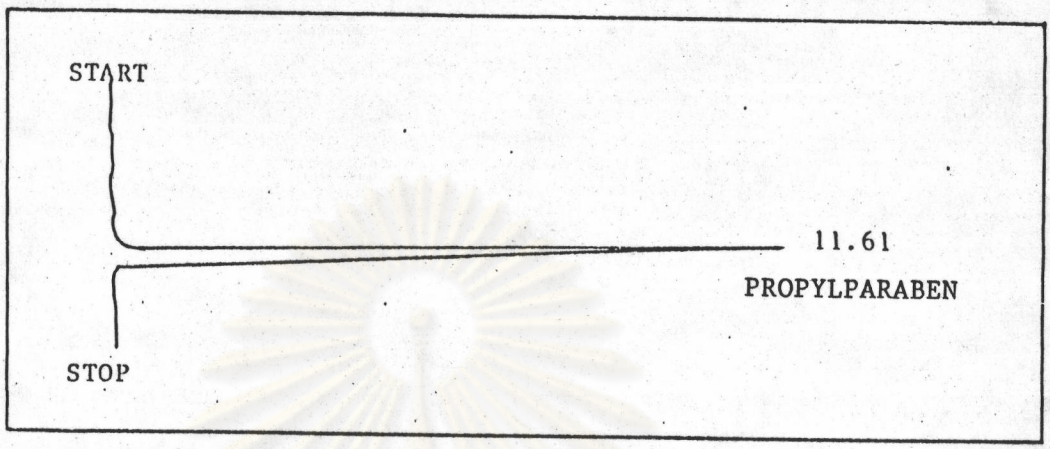
11.2 สารมาตรฐาน GA_3

11.3 สารมาตรฐาน GA_4 และ GA_7

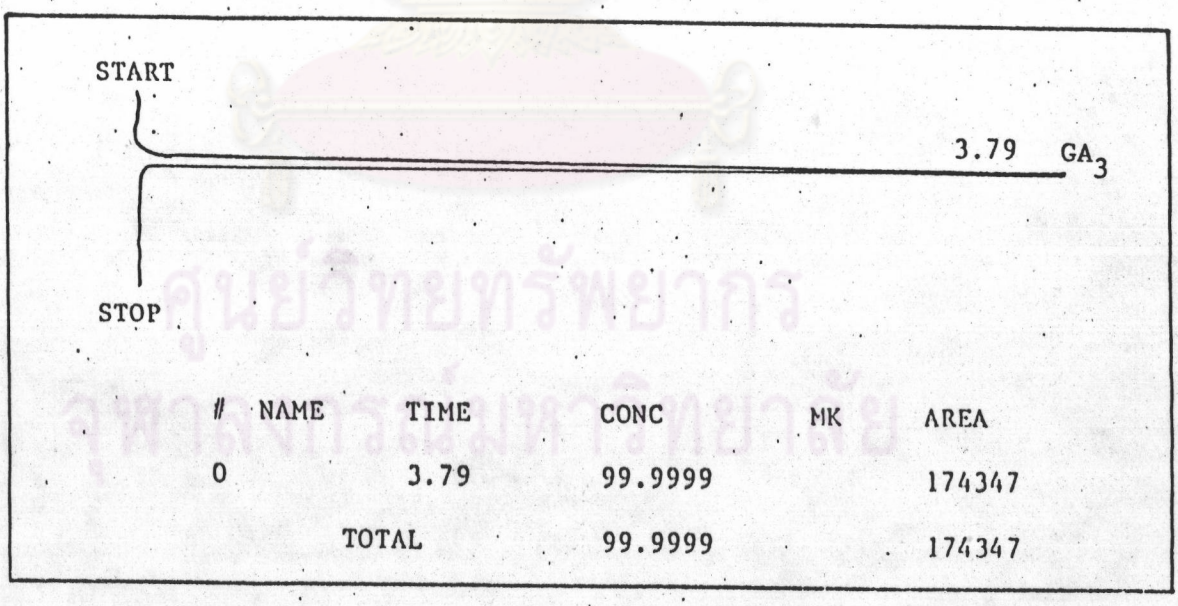
11.4 โปรพิลพาราเบนร่วมกับสารมาตรฐาน GA_3

11.5 โปรพิลพาราเบนร่วมกับสารมาตรฐาน GA_4 และ GA_7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



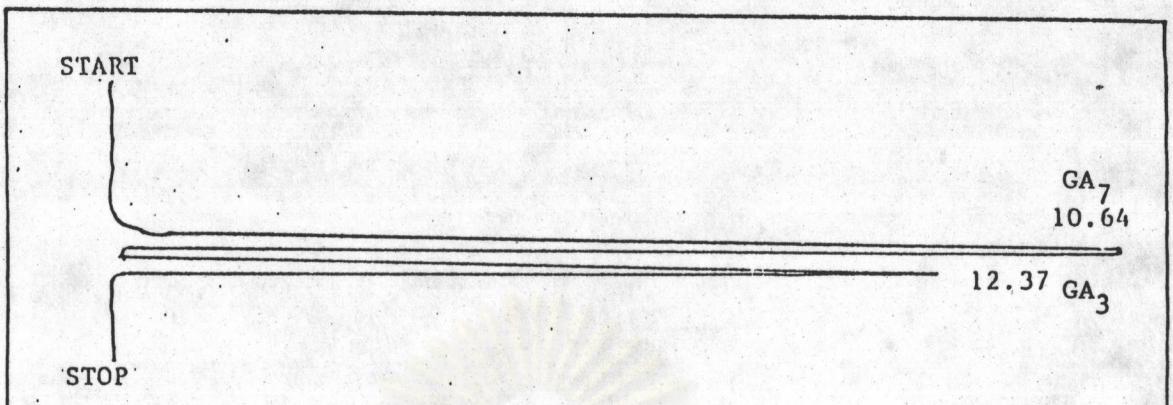
รูปที่ 11.1



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		3.79	99.9999		174347
		TOTAL	99.9999		174347

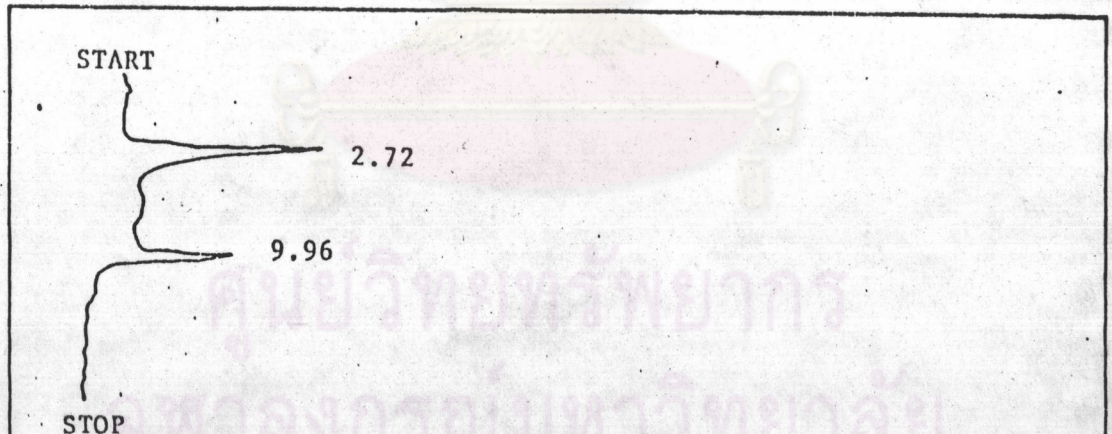
รูปที่ 11.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		10.64	60.1957		366829
0		12.37	39.8042		242564
		TOTAL	99.9999		609393

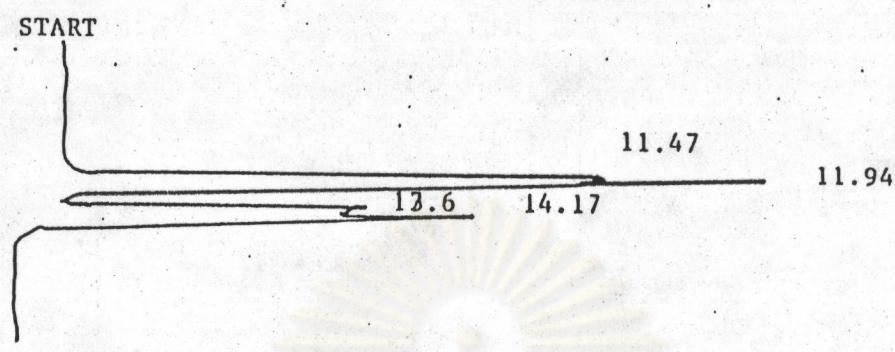
รูปที่ 11.3



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		2.72	54.6951		34400
0		9.96	45.3047		28494
		TOTAL	99.9999		62895

รูปที่ 11.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA
0		11.47	22.332		121984
0		11.94	36.2593		198059
0		13.6	15.029		82093
0		14.17	26.3795		144093
		TOTAL	99.9999		546231

รูปที่ 11.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เปรียบเทียบเชื้อรา Gibberella fujikuroi เพื่อหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน

3.2.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับการสร้างสปอร์

เลี้ยงสายใยของเชื้อ Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ ในอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.3.1 ถ่ายสายใยดังกล่าวลงในขวดแก้วทรงแบนโดยใช้สูตรอาหารต่างกัน 2 สูตร (ภาคผนวกที่ 1.2) และเพาะเลี้ยงตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.3.2 เปรียบเทียบการสร้างสปอร์ของเชื้อรา Gibberella fujikuroi ทั้ง 6 สายพันธุ์ในอาหารที่ทำการศึกษา พบว่าเชื้อรา Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ A B E และ F สามารถสร้างสปอร์ได้ทั้งในสูตรอาหารโพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ปกติ และสูตรอาหารโพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ที่เสริมด้วยแร่ธาตุเสริม (ตามภาคผนวกที่ 1.2.1 และ 1.2.2 ตามลำดับ) ส่วนสายพันธุ์ C และ D สร้างสปอร์ได้เฉพาะในสูตรอาหารโพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ที่เสริมด้วยแร่ธาตุเสริมเท่านั้น (ภาคผนวกที่ 1.2.2) ดังแสดงในตารางที่ 8 ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงจะเลือกสูตรอาหารแข็ง สำหรับการสร้างสปอร์ให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของเชื้อรา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลการศึกษาการสร้างสปอร์ของเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ ในอาหารแข็งสำหรับการสร้างสปอร์ 2 สูตร

G. fujikuroi สายพันธุ์	การสร้างสปอร์ในอาหารแข็งสูตร	
	1.2.1	1.2.2
A	+	+
B	+	+
C	-	+
D	-	+
E	+	+
F	+	+

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + หมายถึงพบการสร้างสปอร์

เครื่องหมาย - หมายถึงไม่พบการสร้างสปอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 2 สูตร

เลี้ยงสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ทำการศึกษา 2 สูตร ซึ่งมีปริมาณกลูโคสและแอมโมเนียมไนเตรตต่างกัน (ภาคผนวกที่ 1.3) วิเคราะห์ค่าการเจริญของเชื้อ พบว่าเชื้อรา Gibberella fujikuroi ทั้ง 6 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1.3.2 ให้ค่าการเจริญ (กรัมสายใยแห้งต่อลิตรอาหารเหลว) ในช่วงกลางของระยะเจริญ (Mid-Log Phase) สูงเมื่อเทียบกับอาหารเหลวสูตร 1.3.1 ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยช่วงกลางของการเจริญของเชื้อราอยู่ในช่วงการบ่มเลี้ยงเป็นเวลา 70-72 ชั่วโมง ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใช้อาหารเหลวสูตร 1.3.2 เป็นอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อและใช้หัวเชื้ออายุ 70-72 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การเจริญของเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ใน อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 2 สูตร

G. fujikuroi สายพันธุ์	ค่าการเจริญในชั่วโมงที่ 70-72 (กรัมสายใยแห้งต่อลิตรอาหารเหลว)	
	อาหารเหลวสูตร 1.3.1	อาหารเหลวสูตร 1.3.2
A	9.90	33.64
B	9.52	27.41
C	10.23	15.23
D	10.03	20.13
E	9.87	21.04
F	9.42	10.85

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 เปรียบเทียบการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ในอาหารเหลว 7 สูตร

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว 7 สูตร (ภาคผนวกที่ 1.4 อาหารเหลวสูตร 1.4.1-1.4.7) ภายหลังการหมักเชื้อเป็นเวลา 8 วัน นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองเอาเซลออกแล้วปริมาตร 2 มล.มาสกัดตามวิธีในภาคผนวกที่ 3.1 และทำการตรวจหาผลิตภัณฑ์อย่างคร่าว ๆ ด้วยวิธี TLC ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.1.2 พบว่าตรวจพบจุดสีของผลิตภัณฑ์บนแผ่นซิลิกา จากน้ำหมักเชื้อรา Gibberella fujikuroi 3 สายพันธุ์คือ B C และ D เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1.4.4 -1.4.7 ดังแสดงในตารางที่ 10 แต่เนื่องจากอาหารเหลวสูตร 1.4.4 และ 1.4.5 เป็นอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของสารอาหารอื่นๆเหมือนกัน ต่างกันเฉพาะปริมาณแอมโมเนียมไนเตรต และอาหารเหลวสูตร 1.4.6 และ 1.4.7 ก็เป็นอาหารเหลว ที่มีองค์ประกอบของสารอาหารอื่นๆเหมือนกันต่างกันเฉพาะชนิดของแร่ธาตุเสริม ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงใช้อาหารเหลวสูตร 1.4.4 และ 1.4.6 เป็นตัวแทนของอาหารเหลวเพื่อหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 การผลิตจิบเบอเรลลินของเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ในอาหารเหลวต่างกัน 7 สูตร และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ด้วย TLC

สายพันธุ์	การตรวจพบจุดสีของ GA_s บน TLC-PLATE บนอาหารเหลวสูตร						
	1.4.1	1.4.2	1.4.3	1.4.4	1.4.5	1.4.6	1.4.7
A	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	-	3	3,4+7	3,4+7	4+7
C	-	-	-	4+7	3,4+7	3	3,4+7
D	-	-	-	3	3	3,4+7	-
E	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : หมายเลข 3 หมายถึงตรวจพบจุดสีของ GA_3 บนแผ่นซิลิกา, หมายเลข 4+7 หมายถึงตรวจพบจุดสีของ GA_4 หรือ GA_7 หรือ GA_4 รวมกับ GA_7 ซึ่งแยกไม่ออก บนแผ่นซิลิกา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินของเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujukuroi 6 สายพันธุ์ในอาหารเหลว 2 สูตร (จากผลการศึกษาข้อ 3.2.3) วิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดและผลิตภัณฑ์รวมโดย HPLC ตามวิธีข้อ 2.4.1.2.2 โดยเก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 10 ของการหมัก พบว่าเชื้อรา Gibberella fujikuroi ทั้ง 6 สายพันธุ์ผลิตจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและจิบเบอเรลลินรวมในอาหารเหลวสูตร 1.4.6 สูงกว่าในอาหารเหลวสูตร 1.4.4 และเชื้อรา Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1.4.6 เป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์สูงสุดคือ GA_3 163.24 มก./ลิตร GA_4 34.44 มก./ลิตร GA_7 40.27 มก./ลิตร และรวมทั้ง 3 ชนิด 237.95 มก.ของจิบเบอเรลลินต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ดังแสดงในตารางที่ 11 และ12 ดังนั้นในการวิจัยต่อไปจึงเลือกเชื้อรา G.fujikuroi C และอาหารเหลวสูตร 1.4.6 เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ปริมาณจิบเบอเรลลินที่ผลิตโดย Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1.4.4

G. fujikuroi สายพันธุ์	เวลา(วัน)*	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
A	9	16.64	3.13	2.15	21.92
B	6	148.19	3.24	6.95	158.38
C	8	63.74	71.69	7.82	142.25
D	7	167.11	3.13	2.15	172.39
E	4	10.83	3.12	2.15	16.10
F	9	8.89	3.14	10.46	22.49

* เวลา หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ปริมาณจิบเบอเรลลินที่ผลิตโดย Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 1.4.6

G. fujikuroi สายพันธุ์	เวลา(วัน)*	ปริมาณจิบเบอเรลลิน (มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
A	5	38.10	6.54	13.34	57.98
B	6	131.10	48.66	40.32	220.08
C	6	163.24	34.44	40.27	237.95
D	7	140.19	30.33	61.81	232.33
E	7	74.55	10.12	15.31	99.98
F	7	59.87	11.83	18.36	90.06

*เวลา(วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในขวดแก้วทรงกรวย

3.3.1 องค์ประกอบของอาหาร

3.3.1.1 ชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอน

3.3.1.1.1 ปริมาณของแหล่งคาร์บอน

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.4.6 (ภาคผนวกที่ 1.4) โดยใช้แอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยผันแปรปริมาณจาก 60-200 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมโดย HPLC เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเพียงพอต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ ปริมาณของกลูโคสสูงกว่านี้ไม่ทำให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น แต่กลับจะทำให้มีกลูโคสเหลือหลังการหมักและปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 13 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณของแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร เป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อรา G. fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 ผลของการผันแปรปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

กลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลแห้ง	เวลา(วัน)*	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
60	21.93	6	92.41	67.84	19.14	179.39
80	23.78	6	119.75	60.43	29.27	209.45
100	26.73	5	182.86	11.66	38.93	233.45
120	27.42	5	138.38	7.02	42.25	187.85
140	27.57	5	113.34	51.65	27.46	192.45
160	28.63	6	108.67	18.75	38.36	165.74
180	30.82	7	76.54	47.40	33.16	157.55
200	33.75	7	92.84	3.13	21.62	117.57

เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

3.3.1.1.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5.1 (ภาคผนวกที่ 1.5) โดยใช้แอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรเป็นสารแหล่งไนโตรเจน และใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวและผสมตามตารางที่ 14 วิเคราะห์ปริมาณของจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมโดย HPLC เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส 50 กรัมร่วมกับซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์รวมสูงใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส 70 กรัมร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตรและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส 60 กรัมร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 14 แต่เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส 70 กรัมร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตรให้การผลิต GA_3 สูงกว่า ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส 70 กรัมร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตรเป็นอาหารในการเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ผลของการผันแปรชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตรและสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ	เวลา (วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
แลกโตส	100	8	49.44	34.31	13.61	97.36
กลีเซอรอล	100	7	117.79	125.11	45.36	288.26
กลูโคส/แลกโตส						
	50/50	6	125.30	35.52	27.19	188.01
	80/20	8	162.24	73.28	55.71	291.23
กลูโคส/กลีเซอรอล/แลกโตส						
	50/30/20	8	166.76	51.11	65.46	283.33
กลูโคส/กลีเซอรอล						
	50/50	7	133.67	80.31	69.52	283.55
	60/40	7	172.22	80.14	57.97	310.33
	70/30	6	150.01	86.04	78.10	314.15
	80/20	7	199.89	76.76	64.31	338.96
	90/10	7	220.22	63.34	71.52	355.08
ซูโครส	100	7	254.85	88.09	53.23	396.17

--/ต่อ

ตารางที่ 14 (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ	เวลา (วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
กลูโคส/ซูโครส						
	30/70	7	284.43	102.97	51.03	438.43
	40/60	6	291.62	105.67	80.22	477.53
	50/50	7	317.71	119.77	81.70	519.18
	60/40	5	278.43	109.91	104.10	492.44
	70/30	7	252.57	105.14	64.91	422.62
กลูโคส/แป้งมันสำปะหลัง						
	40/60	7	237.36	85.99	80.27	403.62
	50/50	7	293.45	89.53	67.27	450.25
	60/40	7	331.59	103.63	69.01	504.23
	70/30	7	376.85	79.79	58.28	513.92
	80/20	7	208.54	119.14	83.18	410.87

* เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

3.3.1.2 ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน

3.3.1.2.1 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5.2 (ภาคผนวกที่ 1.5) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 70 กรัมต่อลิตรและแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร เป็นสารแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมไนเตรต1.2 กรัมต่อลิตร เป็นสารแหล่งไนโตรเจนร่วมกับสารแหล่งไนโตรเจนอื่นอีก 4 ชนิด เพื่อทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ โดยคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรต 0.40 กรัมต่อลิตรและปริมาณไนโตรเจนจากอินทรีย์ไนโตรเจน 0.18 กรัมต่อลิตร (ปริมาณไนโตรเจนรวม 0.58 กรัมต่อลิตร) วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมโดย HPLC เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารสกัดจากยีสต์,กากถั่วเหลืองหรือสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้สารแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ และให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงใกล้เคียงกันและสูงกว่า การใช้แอมโมเนียมไนเตรตร่วมกับกากรำข้าวหรือแอมโมเนียนไนเตรตร่วมกับสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวดังแสดงในตารางที่ 15 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารแหล่งไนโตรเจนประกอบด้วยแอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบผลการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตร (โดยให้มีปริมาณไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรต 0.40 กรัมต่อลิตรและปริมาณไนโตรเจนจากอินทรีย์ไนโตรเจน 0.18 กรัมต่อลิตร) ที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา G. fujikuroi C เมื่อใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งไนโตรเจน	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
สารสกัดจากยีสต์	6	349.31	131.66	42.83	523.80
กากถั่วเหลือง	7	344.64	97.07	60.23	501.94
สารละลายย่อย	7	356.17	64.87	94.62	515.66
ด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง					
กากรำข้าว	6	213.34	12.10	23.94	249.83
สารละลายย่อย	6	243.34	30.54	43.09	316.97
ด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว					

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

เพื่อให้ทราบปริมาณไนโตรเจนรวมที่เหมาะสม ต่อการเจริญและการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในการทดลองต่อไปนี้จึงเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวที่ใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณ 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และใช้แอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับปริมาณผันแปรของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง โดยคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนจากแอมโมเนียมไนเตรต 0.40 กรัมต่อลิตร, ผันแปรปริมาณไนโตรเจนจากสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถัน 0.10-0.20 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนรวม 0.50-0.60 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมโดย HPLC เก็บน้ำหมักมาวิเคราะห์ทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตร ร่วมกับสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่มีปริมาณไนโตรเจนรวม 0.56 กรัมต่อลิตร เพียงพอต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์โดยให้ผลการสร้าง GA_3 รวมสูงใกล้เคียงกัน ปริมาณของไนโตรเจนรวมที่สูงกว่านี้ไม่ทำให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้น แต่กลับเพิ่มการเจริญของเชื้อราและทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลง แต่เนื่องจากปริมาณของไนโตรเจนรวม 0.54 กรัมต่อลิตรให้ผลการสร้าง GA_3 สูงกว่า ดังแสดงในตารางที่ 16 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนรวม 0.54 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อรา G. fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ผลการผันแปรปริมาณไนโตรเจนรวมต่อการเจริญและการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรต 1.2 กรัมต่อลิตรร่วมกับสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งคาร์บอน

ปริมาณไนโตรเจนรวม (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลแห้ง	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
0.60	35.71	7	356.69	55.88	77.95	490.52
0.58	36.02	7	361.15	48.50	113.83	523.48
0.56	34.29	7	386.66	63.56	149.58	599.80
0.54	33.81	7	396.25	3.13	184.43	583.81
0.52	31.69	7	374.90	3.13	165.86	543.89
0.50	30.61	6	300.34	45.58	167.83	513.75

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

3.3.1.2.2 ชนิดของแหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5.2 (ภาคผนวกที่ 1.5) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาชนิดของแหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยผันแปรชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจน 4 ชนิด คือกากถั่วเหลือง สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง กากรำข้าว และสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว อนินทรีย์ไนโตรเจน 4 ชนิดคือ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์และโปตัสเซียมไนเตรต โดยให้มีปริมาณไนโตรเจนแต่ละชนิด 0.54 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวม ทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่า กากถั่วเหลืองและสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงใกล้เคียงกัน และสูงกว่าเมื่อเทียบกับกากรำข้าวและสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิดให้ปริมาณผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกัน แต่แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ปริมาณ GA_3 สูงกว่าแอมโมเนียมไนเตรตและโปตัสเซียมไนเตรต ดังแสดงในตารางที่ 17 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้กากถั่วเหลืองและสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง เป็นอินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 4 ชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อรา G. fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบผลการใช้อินทรีย์ไนโตรเจนหรืออนินทรีย์ไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi c โดยให้มีปริมาณไนโตรเจนแต่ละชนิด 0.54 กรัมต่อลิตรและใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งคาร์บอน

แหล่งไนโตรเจน	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
อินทรีย์ไนโตรเจน					
กากถั่วเหลือง	7	289.58	39.73	121.94	451.25
สารละลายย่อย	6	347.93	20.50	50.58	419.01
ด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง					
กากรำข้าว	7	213.79	21.10	23.94	249.83
สารละลายย่อย	6	139.24	24.10	105.81	269.15
ด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าว					
อนินทรีย์ไนโตรเจน					
แอมโมเนียมไนเตรต	6	333.58	73.81	76.08	483.49
แอมโมเนียมซัลเฟต	7	432.67	10.25	56.76	499.68
แอมโมเนียมคลอไรด์	7	446.10	12.52	44.64	508.26
โปตัสเซียมไนเตรต	7	369.74	6.33	97.25	473.32

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

เพื่อให้ทราบชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกันอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในการทดลองต่อไปจึงเลี้ยงเชื้อรา G. fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5.2 (ภาคผนวกที่ 1.5) ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้อินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกันอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.14 และ 0.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุดคือ 831.34 มก.ต่อลิตรเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นที่ทำการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 18 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งมีปริมาณไนโตรเจน 0.14 และ 0.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ผลการผันแปรชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับอินทรีย์ไนโตรเจน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C โดยที่ให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.14 และ 0.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็น แหล่งคาร์บอน

แหล่งไนโตรเจน		เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์(มก.ต่อลิตร)			
อนินทรีย์ไนโตรเจน	อินทรีย์ไนโตรเจน		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
แอมโมเนียมไนเตรต	กากถั่วเหลือง	7	380.68	78.59	126.33	585.60
	สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง	7	408.49	74.17	111.82	594.48
แอมโมเนียมซัลเฟต	กากถั่วเหลือง	7	693.81	5.92	131.57	831.34
	สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง	7	595.82	11.69	112.49	720.00
แอมโมเนียมคลอไรด์	กากถั่วเหลือง	7	574.89	35.60	166.06	776.55
	สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง	7	558.33	17.53	173.12	748.98
โปตัสเซียมไนเตรต	กากถั่วเหลือง	7	420.80	199.41	97.33	717.54
	สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง	7	321.03	195.52	78.08	594.63

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.1.3 ชนิดและปริมาณแร่ธาตุเสริม

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5.3 (ภาคผนวกที่ 1.5) โดยใช้กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร และแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน ศึกษาผลของการใช้แร่ธาตุเสริม 2 กลุ่มคือ แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 และ 1.3 (ชนิด A) เปรียบเทียบกับการไม่ใช้แร่ธาตุเสริม วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมักพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ให้ปริมาณ GA_3 และผลิตภัณฑ์รวมสูงกว่า เมื่อเทียบกับการใช้แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3 และการไม่ใช้แร่ธาตุเสริมตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 19 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะศึกษาอิทธิพลของแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งมีต่อการผลิตผลิตภัณฑ์โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ผลของแร่ธาตุเสริมที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เมื่อใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตและกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้ว โดยให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ชนิดของแร่ธาตุเสริม	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
ไม่ใส่แร่ธาตุเสริม	7	399.24	34.03	170.35	603.62
แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2	7	671.39	18.83	137.64	827.87
แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3	6	429.82	65.50	134.75	630.07

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพื่อให้ทราบอิทธิพลของการใช้แร่ธาตุเสริมชนิดต่าง ๆ ในกลุ่มของแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในการทดลองต่อไปจึงเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5.3 (ภาคผนวกที่ 1.5) ผันแปรชนิดของแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ที่ประกอบด้วย Al_2O_3 , $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.50 0.50 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยการใช้เพียงชนิดเดียวและการใช้ 2 ชนิดร่วมกัน วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าการใช้แร่ธาตุเสริมเพียงชนิดเดียวและการใช้สองชนิดร่วมกัน ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงใกล้เคียงกัน ดังแสดงในตารางที่ 20 แต่ยังต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ทั้งสามชนิดร่วมกัน ดังแสดงไว้แล้วในตารางที่ 19 ที่ผ่านมา ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาปริมาณของแร่ธาตุเสริมทั้งสามชนิด ที่เหมาะสมต่อการผลิตผลิตภัณฑ์โดยเชื้อรา G. fujikuroi C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 ผลการใช้แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ซึ่งประกอบด้วย Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.50 0.50 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยการใช้เพียงชนิดเดียวและการใช้สองชนิดร่วมกันที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา G. fujikuroi C

ชนิดของแร่ธาตุเสริม	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
การใช้แร่ธาตุเสริมเพียงชนิดเดียว					
Al_2O_3	6	410.14	20.08	144.21	574.43
$ZnCl_2$	7	365.43	32.86	179.52	577.81
$CuSO_4$	7	332.60	19.03	134.60	486.23
การใช้แร่ธาตุเสริม 2 ชนิดร่วมกัน					
Al_2O_3+$ZnCl_2$	7	385.34	19.11	131.57	536.02
Al_2O_3+$CuSO_4$	7	374.29	12.89	105.96	493.14
$ZnCl_2$+$CuSO_4$	6	368.19	31.84	163.80	563.83

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 20 เพื่อให้ทราบปริมาณแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในการทดลองต่อไปจึงเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร 1.5.3 (ภาคผนวกที่ 1.5) โดยผันแปรปริมาณของ Al_2O_3 และ $ZnCl_2$ จาก 0.05-1.00 กรัมต่อลิตรและปริมาณของ $CuSO_4$ 0.002-0.050 กรัมต่อลิตร วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าการใช้แร่ธาตุเสริมเพียงชนิดเดียว โดยใช้ Al_2O_3 , $ZnCl_2$ หรือ $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.10 0.10 และ 0.005 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ให้ปริมาณจิบเบอเรลลินสูงกว่าเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 21 และการใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณ GA_3 644.59 มก.ต่อลิตร และปริมาณจิบเบอเรลลินรวม 864.62 มก.ต่อลิตร ซึ่งสูงใกล้เคียงกับการใช้แร่ธาตุเสริมทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน(แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2) ตามผลการทดลองดังแสดงไว้แล้วในตารางที่ 19 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.10 0.10 และ 0.005 กรัมต่อลิตรตามลำดับ มาศึกษาถึงผลการใช้แร่ธาตุเสริมโดยใช้ร่วมกัน 2 ชนิด และ 3 ชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 ผลของความเข้มข้นของแร่ธาตุเสริมได้แก่ Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา *Gibberella fujikuroi* C

ชนิดของแร่ธาตุเสริม	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์ (มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
Al_2O_3	0.05	6	67.13	248.18	51.14	366.89
	0.10	7	644.59	117.84	102.19	864.62
	0.20	7	544.38	91.98	101.58	737.94
	0.50	6	400.19	22.03	148.11	570.28
	1.00	7	335.99	43.84	71.83	451.66
$ZnCl_2$	0.05	7	400.57	3.13	89.84	325.00
	0.10	7	615.06	120.73	150.33	886.12
	0.20	6	493.37	26.29	56.53	576.19
	0.50	7	374.12	35.66	172.74	582.52
	1.00	7	314.64	97.07	60.23	471.94
$CuSO_4$	0.002	7	436.92	55.49	70.27	565.78
	0.005	7	542.72	66.71	129.18	738.61
	0.008	7	463.11	39.87	80.24	583.21
	0.010	7	330.51	14.08	144.00	488.59
	0.050	7	297.76	43.93	83.00	424.69

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 21 เพื่อให้ทราบผลของการใช้แร่ธาตุเสริม 3 ชนิดคือ Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.10 0.10 และ0.005 กรัมต่อลิตรตามลำดับโดยการใช้ร่วมกัน 2 ชนิด และ 3 ชนิด เพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในการทดลองต่อไปจึงเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร 1.5.3 (ภาคผนวกที่ 1.5) โดยผันแปรการใช้แร่ธาตุทั้ง 3 ชนิด โดยการใช้ร่วมกัน 2 ชนิดและใช้ร่วมกัน 3 ชนิด วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมทุก 24 ชั่วโมง โดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่า การใช้แร่ธาตุเสริมที่ประกอบด้วย $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.10 และ 0.005 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ให้ปริมาณ GA_3 สูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้แร่ธาตุอื่นๆในการทดลองนี้คือ 623.42 มก.ต่อลิตรแต่ให้ปริมาณจิบเบอเรลลินรวม 716.74 มก.ต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้แร่ธาตุเสริมที่ประกอบด้วย Al_2O_3 และ $ZnCl_2$ ความเข้มข้น 0.10 และ 0.10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และแม้ว่าจะใช้แร่ธาตุเสริมทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน ก็พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและจิบเบอเรลลินรวมขึ้นแต่อย่างใด ดังแสดงในตารางที่ 22 และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองดังแสดงไว้ในตารางที่ 19-22 พบว่าการใช้แร่ธาตุเสริมชนิดเดียวคือ Al_2O_3 $ZnCl_2$ หรือ $CuSO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.50 0.50 และ 0.10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ให้ปริมาณจิบเบอเรลลินสูงใกล้เคียงกันและสูงกว่าแร่ธาตุเสริมกลุ่มอื่น ๆ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาผลของการใช้แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3 ร่วมกับ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

ตารางที่ 22 ผลการใช้แร่ธาตุเสริมซึ่งประกอบด้วย Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.10 0.10 และ 0.005 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยการใช้ร่วมกัน 2 ชนิดและ 3 ชนิด ที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

ชนิดของแร่ธาตุเสริม	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์(มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
Al_2O_3 + $ZnCl_2$	7	554.84	209.67	100.00	864.51
Al_2O_3 + $CuSO_4$	8	504.99	104.01	90.27	699.27
$ZnCl_2$ + $CuSO_4$	7	623.42	9.90	83.42	716.74
Al_2O_3 + $ZnCl_2$ + $CuSO_4$	7	568.25	56.45	69.59	694.29

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 19-22 เพื่อให้ทราบผลของการใช้แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3 ร่วมกับ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในการทดลองต่อไปจึงบ่มเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวสูตร 1.5.3 (ภาคผนวกที่ 1.5) โดยผันแปรการใช้แร่ธาตุเสริมดังนี้คือใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรเพียงชนิดเดียว ใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3 และใช้แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ซึ่งประกอบด้วย Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.50 0.50 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าการใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรเพียงชนิดเดียวและการใช้แร่ธาตุเสริมทั้ง 3 ชนิดร่วมกันตามภาคผนวกที่ 1.2 ให้ปริมาณจิบเบอเรลลินใกล้เคียงกันเช่นเดียวกับที่ได้แสดงไว้แล้วในตารางที่ 19 และ 21 โดยให้ปริมาณจิบเบอเรลลินสูงกว่าการใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3 ดังแสดงในตารางที่ 23 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรและแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 เป็นแหล่งแร่ธาตุเสริมในการเลี้ยงเชื้อรา G. fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 ผลการใช้แร่ธาตุเสริมซึ่งประกอบด้วย Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรร่วมกับแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3 และแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

ชนิดของแร่ธาตุเสริม	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์(มก.ต่อลิตร)			
		GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
Al_2O_3 0.10	7	654.02	97.84	120.11	871.97
Al_2O_3 0.10 + แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3	7	357.34	147.75	93.65	598.74
แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2	7	685.84	16.57	132.17	834.53

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.1.4 ความเป็นกรด-ด่าง(พีเอช)เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

บ่มเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5:4 (ภาคผนวกที่ 1.5) โดยใช้แร่ธาตุเสริม 2 กลุ่มคือ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรและแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ประกอบด้วย Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.50 0.50 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ผันแปรพีเอชเริ่มต้นของสูตรอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อจาก 4.0 ถึง 8.0 วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวมทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แร่ธาตุเสริมทั้ง 2 กลุ่มที่พีเอชเริ่มต้นก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเท่ากับ 7.0 ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์รวมสูงใกล้เคียงกันและสูงกว่าเมื่อเทียบกับพีเอชเริ่มต้นค่าอื่นๆ โดยเมื่อใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรจะให้ GA_3 635.24 มก.ต่อลิตร GA_4 124.56 มกต่อลิตร GA_7 114.50 มก.ต่อ ลิตรและปริมาณรวม 878.30 มก.ต่อลิตร และเมื่อใช้แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 จะให้ GA_3 693.32 มกต่อลิตร GA_4 29.56 มก.ต่อลิตร GA_7 125.30 มก.ต่อลิตรและปริมาณรวม 848.18 มก.ต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 24 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทำการศึกษาผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 ผลการผันแปรพีเอชเริ่มต้นของสูตรอาหารเมื่อใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรและ แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C

ชนิดของแร่ธาตุเสริม	พีเอชเริ่มต้นของสูตรอาหาร	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์(มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
Al_2O_3						
	4.0	7	302.85	102.51	115.54	520.90
	5.0	7	435.47	52.07	111.17	598.71
	6.0	7	473.85	22.81	107.57	604.23
	7.0	7	635.24	124.56	114.50	874.30
	8.0	7	484.26	116.41	174.47	775.14
แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2						
	4.0	7	347.06	87.37	65.63	500.06
	5.0	7	416.19	42.72	50.95	509.86
	6.0	7	511.01	29.02	25.99	566.02
	7.0	7	693.32	29.56	125.30	848.18
	8.0	7	505.30	47.98	240.60	793.88

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

3.3.1.5 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเหลวสูตร 1.5.5 (ภาคผนวกที่ 1.5) โดยใช้แร่ธาตุเสริม 2 กลุ่มคือ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรและแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 พีเอชเริ่มต้นของอาหารก่อนนึ่งฆ่าเชื้อเท่ากับ 7.0 ผันแปรอุณหภูมิในการบ่มเลี้ยงเชื้อจาก 25 °ซ ถึง 40 °ซ ศึกษาผลของอุณหภูมิดังกล่าวต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ วิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลินแต่ละชนิดและปริมาณรวม ทุก 24 ชั่วโมงโดยเริ่มจากวันที่ 4 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา G. fujikuroi C ในอาหารเหลวที่เสริมด้วยแร่ธาตุเสริมทั้ง 2 กลุ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ ให้ผลการผลิตผลิตภัณฑ์ทำนองเดียวกับผลการทดลองดังตารางที่ 23 และ 24 กล่าวคือเมื่อใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร จะให้ผลการผลิตผลิตภัณฑ์รวมสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ซึ่งให้ผลการผลิต GA_3 สูงกว่าแต่ผลการผลิตผลิตภัณฑ์รวมต่ำกว่า และการบ่มเลี้ยงในสูตรอาหารที่เสริมด้วยแร่ธาตุเสริมทั้ง 2 กลุ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ ให้ผลการผลิต GA_3 และผลิตภัณฑ์รวมสูงกว่าเมื่อเทียบกับการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง ดังแสดงในตารางที่ 25 โดยที่การบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซในอาหารที่เสริมด้วย Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2 ให้ผลการผลิตคิดเป็นสัดส่วนของ GA_4/GA_3 สูงกว่าการบ่มเลี้ยงที่ 25 °ซในอาหารเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 25 ผลการผันแปรอุณหภูมิในการบ่มเลี้ยงเชื้อซึ่งมีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi Cเมื่อใช้อาหารที่เสริมด้วย Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรและแร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2

ชนิดของแร่ธาตุเสริม	อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ(°ซ)	เวลา(วัน)	ปริมาณผลิตภัณฑ์(มก.ต่อลิตร)			
			GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม
Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร						
	25	7	621.98	126.26	140.25	888.49
	30	7	447.95	214.79	126.75	789.49
	35	7	359.67	65.12	113.87	538.66
	40	7	181.13	6.25	12.45	199.83
แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2						
	25	7	683.90	27.49	122.65	834.04
	30	7	440.01	229.84	146.17	816.02
	35	7	263.34	93.22	6.24	362.80
	40	7	57.60	30.01	25.60	113.21

*เวลา (วัน) หมายถึง ระยะเวลาของการหมักที่ให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูงสุด (วัน)

3.4 <u>การตรวจสอบกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) ของจิบเบอเรลลินที่สกัดได้จากน้ำหมักเชื้อรา Gibberella fujikuroi C</u>

นำจิบเบอเรลลินที่สกัดได้จากน้ำหมักในการทดลองที่ 3.3.1.5 จำนวน 4 ตัวอย่างคือจากการเลี้ยงเชื้อราที่ 25 °ซ จำนวน 2 ตัวอย่าง และที่ 30 °ซ จำนวน 2 ตัวอย่าง มาตรวจสอบกิจกรรมทางชีวภาพ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.4.1.1 โดยเจือจางสารตัวอย่างจิบเบอเรลลินด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อก่อนเติมลงในจานที่เพาะเลี้ยงต้นข้าว เปรียบเทียบผลการเจริญของต้นข้าวกับต้นข้าวที่ปลูกโดยไม่เติมจิบเบอเรลลิน (ชุดควบคุม) พบว่าจิบเบอเรลลินที่สกัดมาจากน้ำหมัก มีกิจกรรมทางชีวภาพกับเมล็ดข้าวมาตราฐานอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 26

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 26 ผลการตรวจยืนยันกิจกรรมทางชีวภาพ(biological activity) ของสารตัวอย่างจากการหมักเชื้อรา G.fujikuroi C

สารตัวอย่าง	ปริมาณจิบเบอเรลลินในตัวอย่าง				ค่าการเจริญ	
	GA_3	GA_4	GA_7	ผลรวม	มิลลิเมตร	ค่า log การเจริญ
ชุดควบคุม	0	0	0	0	33.5	1.525
1	6.2	1.3	1.4	8.9	105.2	2.022
2	6.8	0.3	1.2	8.3	106.2	2.026
3	4.5	2.1	1.3	7.9	98.2	1.992
4	4.4	2.3	1.5	8.2	97.7	1.990

หมายเหตุ

1 : น้ำหมักจากการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ

แร่ธาตุเสริม Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร

2 : " 25 °ซ

แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2

3 : " 30 °ซ

แร่ธาตุเสริม Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร

4 : " 30 °ซ

แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.2

ปริมาณจิบเบอเรลลินในสารตัวอย่าง หน่วยเป็นส่วนในล้านส่วน

บทที่ 4

อภิปรายผลการวิจัยและสรุป

จากการเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบชนิดและปริมาณของจิบเบอเรลลิน โดยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) และวิธีทางเคมี (chemical assay) พบว่าวิธีที่เหมาะสมคือการตรวจสอบโดยวิธีทางเคมีด้วยไฮเพอฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) โดยที่การตรวจสอบด้วยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) กับเมล็ดข้าวมาตรฐาน (Tanginbozu dwarf rice seed) เหมาะสำหรับการตรวจสอบเพื่อยืนยันกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) ของผลิตภัณฑ์มากกว่าการตรวจสอบชนิดและปริมาณ เพราะการตรวจสอบโดยวิธีทางชีวภาพไม่สามารถบ่งชนิดและปริมาณได้ ส่วนการตรวจสอบโดยวิธีทางเคมีด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (TLC) มีข้อจำกัดอยู่ที่ไม่สามารถหาระบบตัวทำละลายที่แยก GA_4 และ GA_7 ออกจากกันได้ รวมทั้งไม่สามารถวิเคราะห์หาปริมาณของสารในแต่ละจุด ในขณะที่การตรวจสอบโดยวิธีทางเคมีด้วยก๊าซโครมาโตกราฟี (GC) ซึ่งมีรายงานการศึกษาอยู่บ้างนั้น (25-27) เป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากยุ่งยากกว่ากล่าวคือปฏิกิริยาการเตรียมสารละลายไดอะโซมีเทน (diazomethane) สำหรับการเติมหมู่เมทธิล (methylation) แก่สารตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC นั้น เป็นปฏิกิริยาที่เกิดรุนแรงต้องการอุปกรณ์ในการเตรียมโดยเฉพาะซึ่งเป็นกระบวนการที่ยุ่งยากและเสียเวลา ไม่เหมาะกับงานที่มีตัวอย่างวิเคราะห์จำนวนมาก นอกจากนี้ไดอะโซมีเทนทั้งในสถานะก๊าซและสารละลาย มีคุณสมบัติเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็ง (carcinogen) (28) ดังนั้นการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โดยวิธีการดังกล่าวนี้จึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็น การตรวจสอบที่ต้องกระทำเป็นประจำและติดต่อกันเป็นเวลานาน

จากการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลินของเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตจิบเบอเรลลินได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นภายใต้สภาวะเดียวกันคือสามารถผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 รวมได้ 237.95 มก.ต่อลิตรของอาหารเหลว ดังนั้นจึงเลือกเชื้อรา G. fujikuroi C มาใช้

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินต่อไป

เนื่องจากมีรายงานการใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวและแหล่งคาร์บอนหลายชนิดร่วมกันเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน (10-17) จึงทำการทดลอง หาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยใช้แหล่งคาร์บอนบางชนิดทั้งที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวและแหล่งคาร์บอนร่วม จากการทดลองพบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน ประกอบด้วยกลูโคส 70 กรัมต่อลิตรร่วมกับแป้งมันสำปะหลัง 30 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 รวม 513.92 มก. ต่อลิตรของอาหารเหลว เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรร่วมกับซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 รวม 519.18 มก.ต่อลิตรของอาหารเหลว จะเห็นว่าการเลี้ยงเชื้อในแหล่งคาร์บอนร่วมทั้ง 2 กลุ่มสามารถผลิตจิบเบอเรลลินรวมได้สูงใกล้เคียงกัน แต่แหล่งคาร์บอนที่ประกอบด้วยกลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับมีข้อได้เปรียบกว่าโดยสามารถผลิต GA_3 ได้สูงกว่าประมาณ 60 มก.ต่อลิตร อีกประการหนึ่งจากผลการทดลองนี้การใช้กลีเซอรอล 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวในการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถผลิต GA_4 ได้สูงกว่า GA_3 1.06 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นซึ่งสามารถผลิต GA_4 ได้ต่ำกว่า GA_3 เสมอ จากข้อมูลที่กล่าวมาน่าจะเป็นไปได้ว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนมีความสัมพันธ์ต่อชนิดของจิบเบอเรลลินที่เชื้อราผลิตได้

จากรายงานการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน มีรายงานว่ามีการใช้อินทรีย์ไนโตรเจนและอินทรีย์ไนโตรเจนบางชนิดทั้งที่ใช้เดี่ยว ๆ และใช้ร่วมกัน (10-17) และจากการทดลองพบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลิน ประกอบด้วยอนินทรีย์ไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับอินทรีย์ไนโตรเจนคือกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้ว โดยให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับ การใช้แหล่งไนโตรเจนดังกล่าวทำให้เชื้อราสามารถผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 รวม 831.34 มก.ต่อลิตรของอาหารเหลว เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนเดิมซึ่งประกอบด้วยแอมโมเนียมไนเตรตร่วม

กับสารสกัดจากยีสต์โดยให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.42 และ 0.44 กรัมต่อลิตรตามลำดับแล้ว จะเห็นได้ว่าสารแหล่งไนโตรเจนใหม่นี้มีข้อได้เปรียบกว่าโดยสามารถผลิต GA_3 และจิบเบอเรลลินรวมสูงกว่าการใช้สารแหล่งไนโตรเจนเดิมประมาณ 1.8 และ 1.6 เท่าตามลำดับ และยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกกว่าและหาได้ง่ายในประเทศ

เนื่องจากมีรายงานว่าแร่ธาตุเสริม (trace element) บางชนิดที่ปะปนอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งที่อยู่ในรูปของสิ่งปนเปื้อน (impurity) และโดยการเสริมลงไป มีผลต่อการเจริญและการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi (29-30) จึงทำการทดลองโดยเสริมแร่ธาตุบางชนิดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเปรียบเทียบกับการไม่เสริมด้วยแร่ธาตุ พบว่าการเสริมด้วยแร่ธาตุซึ่งประกอบด้วย Al_2O_3 $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.50 0.50 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 1.2) สามารถสร้างจิบเบอเรลลินได้สูงใกล้เคียงกับการเสริมด้วย Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรเพียงชนิดเดียว และสูงกว่าการเสริมด้วยแร่ธาตุเสริมชนิดอื่น ๆ แม้ว่า Borrow และคณะ(29) และ Cross (31) ได้รายงานไว้ว่าเชื้อรา Gibberella fujikuroi ต้องการแร่ธาตุเสริมพวกเหล็ก ทองแดง สังกะสี แมงกานีส และ โมลิบดินัม ในการผลิตจิบเบอเรลลิน แต่จากผลการศึกษาพบว่าการเสริมด้วยแร่ธาตุเสริมตามการศึกษาของ Borrow และคณะ และ Cross (แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3) และการเสริมร่วมกับ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลในการเพิ่มการผลิตจิบเบอเรลลิน แต่กลับทำให้การผลิตจิบเบอเรลลินต่ำกว่าใช้ Al_2O_3 เพียงชนิดเดียว ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากในกรณีของเชื้อรา Gibberella fujikuroi C แร่ธาตุเสริมตามภาคผนวกที่ 1.3 ซึ่งประกอบด้วย $FeSO_4$ $CuSO_4$ $ZnSO_4$ $MnSO_4$ และ $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ ความเข้มข้น 0.002 0.0003 0.003 0.0002 และ 0.0002 กรัมต่อลิตรตามลำดับ อาจมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตจิบเบอเรลลิน หรือวัตถุดิบที่นำมาประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ มีแร่ธาตุต่างๆที่จำเป็น (นอกเหนือจาก Al_2O_3) เพียงพออยู่แล้ว การเพิ่มแร่ธาตุบางชนิดเข้าไปอาจทำให้มีปริมาณมากเกินไปจนมีผลทำให้มีการผลิตลดลง

จากการทดลองพบว่า พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเหลว(ก่อนนึ่ง

ฆ่าเชื้อ) เท่ากับ 7.0 ซึ่งเป็นพีเอชเดียวกับที่รายงานไว้ใน J.P.Pat 58,152,499 (16) ที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่า 7.0 การผลิตจิบเบอเรลลินลดลงอย่างชัดเจน พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินอาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา เพราะจากการศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินจากเชื้อรา G.fujikuroi ATC 216 โดย Marroquin (12) พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0-5.8 ซึ่งต่างจากผลการทดลองดังรายงานฉบับนี้ ทั้งนี้ผู้รายงานมิได้บ่งชัดว่าเป็นพีเอชก่อนหรือหลังการนึ่งฆ่าเชื้อ

สำหรับผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญและผลิตจิบเบอเรลลินนั้นมีรายงานไว้ว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินตั้งแต่ 25 ถึง 34 °ซ (10-17 และ 20) จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 25 °ซ ให้ผลการผลิต GA_3 และผลิตภัณฑ์รวมสูงกว่าการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ และการบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซให้ผลการผลิตคิดเป็นสัดส่วนของ GA_4/GA_3 สูงกว่า การบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซในอาหารเดียวกัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kyowa Hakko Kogyo Co.,LTD (16) และ Weaver (20) ที่รายงานไว้ว่าการหมักเชื้อรา G.fujikuroi ในอาหารเหลวเพื่อผลิต GA_3 กระทำที่อุณหภูมิ 24-26 °ซ ในขณะที่การหมักเพื่อผลิต GA_4 และ GA_7 กระทำที่อุณหภูมิ 30-34 °ซ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์จิบเบอเรลลินแต่ละชนิดของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ ต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานต่างกัน ในกรณีของ G. fujikuroi C การหมักเพื่อผลิต GA_3 มีสภาวะที่เหมาะสมคือการหมักในอาหารที่เสริมด้วย Al_2O_3 และ $ZnCl_2$ ความเข้มข้น 0.50 กรัมต่อลิตรร่วมกับ $CuSO_4$ ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อลิตร และอุณหภูมิในการหมัก 25 °ซ และการหมักเพื่อผลิต GA_4 มีสภาวะที่เหมาะสมคือการหมักในอาหารที่เสริมด้วย Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรและอุณหภูมิในการหมัก 30 °ซ

การตรวจสอบกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) โดยวิธีทางชีวภาพ (bioassay) ของน้ำหมักที่ได้จากเชื้อรา G. fujikuroi C เปรียบเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าจิบเบอเรลลินที่สกัดได้จากน้ำหมักเชื้อรามีกิจกรรมทางชีวภาพต่อต้นพืชอย่างชัดเจน การเจริญของต้นข้าวที่เพิ่มขึ้น

มีความสัมพันธ์กับปริมาณจิบเบอเรลลินที่ต้นข้าวได้รับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานจิบเบอเรลลิน และรายงานการศึกษาของ Weaver (20) ที่ศึกษากับสารมาตรฐาน GA_3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi ในระดับขวดเขย่าพบว่า

1. การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi 6 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อรา G. fujikuroi C เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ผลิตจิบเบอเรลลินได้สูงสุดและจิบเบอเรลลินที่ผลิตได้คือ GA_3 GA_4 และ GA_7

2. การศึกษาแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C พบว่าแหล่งคาร์บอนร่วมที่ประกอบด้วยกลูโคสร่วมกับแป้งมันสำปะหลังในปริมาณ 70 และ 30 กรัมต่อลิตรตามลำดับและกลูโคสร่วมกับซูโครสในปริมาณ 50 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สามารถผลิต GA_3 ได้สูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ส่วนการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเดี่ยวสามารถให้การผลิตคิดเป็นสัดส่วนของ GA_4/GA_3 สูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเดี่ยวและแหล่งคาร์บอนร่วมอื่นๆ ข้อมูลจากการวิจัยที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า ชนิดของแหล่งคาร์บอนมีผลต่อสัดส่วนของจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆที่เชื้อราผลิตได้

3. แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือแหล่งไนโตรเจนร่วมที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.14 และ 0.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ การใช้แหล่งไนโตรเจนร่วมดังกล่าวนี้สามารถให้ผลการผลิต GA_3 สูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนเดี่ยวและแหล่งไนโตรเจนร่วมชนิดอื่นๆและยังพบว่าสามารถใช้กากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทดแทนสารสกัดจากยีสต์ได้ดีซึ่งจะทำให้ลดต้นทุนการผลิตด้วย

4. จากการศึกษาชนิดและปริมาณของแร่ธาตุเสริมที่เหมาะสม พบว่าขึ้นกับชนิดของจิบเบอเรลลินที่ต้องการ โดยที่การใช้ Al_2O_3 ร่วมกับ $ZnCl_2$

และ $CuSO_4$ ในปริมาณ 0.50 0.50 และ 0.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับและการใช้ Al_2O_3 0.10 กรัมต่อลิตรเพียงชนิดเดียวให้ผลการผลิตจิบเบอเรลลินรวมคือ GA_3 GA_4 และ GA_7 สูงกว่าการใช้แร่ธาตุเสริมอื่นๆ โดยที่การใช้ Al_2O_3 ร่วมกับ $ZnCl_2$ และ $CuSO_4$ ให้ผลการผลิต GA_3 สูงกว่าการใช้ Al_2O_3 ชนิดเดียว แต่การใช้ Al_2O_3 ให้ผลการผลิต GA_4 สูงกว่าการใช้แร่ธาตุร่วม 3 ชนิดดังกล่าว ข้อมูลจากการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าแร่ธาตุบางชนิดมีผลต่อสัดส่วนของจิบเบอเรลลินชนิดต่างๆที่เชื้อราผลิตขึ้น

5. ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่านี้การผลิตจิบเบอเรลลินจะต่ำลง

6. อุณหภูมิในการหมักขึ้นกับชนิดของจิบเบอเรลลินที่ต้องการ ที่อุณหภูมิ 25 °ซ เชื้อราจะผลิต GA_3 ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ แต่ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เชื้อราจะผลิต GA_4 ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 °ซ ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะต้องคำนึงถึงชนิดของจิบเบอเรลลินที่ต้องการผลิตด้วย

7. เมื่อเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการวิจัยนี้ เชื้อราสามารถผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 เพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงก่อนการปรับสภาวะเป็น 4.2 6.2 และ 3.2 เท่าตามลำดับ และจิบเบอเรลลินที่ผลิตได้มีกิจกรรมทางชีวภาพ (biological activity) กับต้นข้าวแคระอย่างชัดเจน

8. จากการศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินในวิทยานิพนธ์นี้ น่าจะมีการศึกษาต่อไปเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยการศึกษาการผลิตจิบเบอเรลลินในถังหมักซึ่งสามารถปรับสภาวะต่างๆได้ดีกว่าในขวดเขย่า เช่น การเติมสารอาหารหรือสารตั้งต้นอย่างต่อเนื่อง การควบคุมความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมักและการเติมอากาศในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งอาจมีผลในการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้น่าจะมีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราโดยการกลายพันธุ์และการคัดเลือก (mutation and selection) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อราด้วย