บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์การทดลอง

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Psycrotherm Incubator Shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., N.J., U.S.A.

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

หลอดแสงอุลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร TL20W/80 F20 T12 BLB บริษัท Philips, Holland.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) รุ่น MC-15A ของบริษัท Tomy Seiko Co.,Ltd., Tokyo,Japan.

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

เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer) Laboratory Hot Plate PC-101 Corning Glass works, Corning, N.Y. 14830, U.S.A.

เครื่องเขย่า (Vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 ของบริษัท Scientific Industries, Inc.,U.S.A.

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

กล้องจุลทรรศน์ (Optiphot) Nikon UFX-IIA. Japan.

ตู้อบแห้ง ของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ของบริษัท Radiometer Copenhagen, Denmark.

ถังหมักขนาด 5 ลิตร รุ่น MD-300 พร้อมใบพัดแบบเทอร์ไบน์ (Turbine Impeller) และชุดควบคุมสภาวะ ของบริษัท Marubishi,Tokyo,Japan.

เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography) Shimadzu LC-6A ของบริษัท Shimadzu Co.Ltd., Japan.

เครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (Rotary vacuum evaporator) EYELA บริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan.

1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. จิบเบอเรลลิน (GA_3)	Sigma Chemical Co.Ltd.,U.S.A.
2. จิบเบอเรลลิน (GA_3)	จากประเทศจีน (เกรดการค้า)
3. TLC aluminum sheets silica gel $60F_{254}$	Merck, Germany.
4. พาราเซทามอล	Atlantic laboratories
5. เมทานอล	บริษัท เจที เบเกอร์ เคมิคอล จำกัด
6. เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical Co.Ltd.,Japan
7. พี.จี.โอ.เอนไซม์	Sigma Chemical Co.,U.S.A.
8. NTG	Sigma Chemical Co.,U.S.A.

สารเคมีอื่นที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจาก บริษัท Merck ประเทศเยอรมันนี

1.3 สารอาหาร

วุ้นผง กลูโคส ซูโครส น้ำมันถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้ว ที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้เกรดทางการค้า (commercial grade)

2. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เชื้อราสายพันธุ์ตั้งต้น คือ Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้มีการคัดเลือกแล้ว โดยศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจิบเบอเรลลินทั้งในระดับขวดเขย่าโดยวันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (16) และในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยอรไท สุขเจริญ(17)

3. วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เขี่ยสายใยของเชื้อ Gibberella fujikuroi โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากบนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โพเตโตเด็กซ์โครสเสริมแร่ธาตุ (potato dextrose agar PDA ภาคผนวกที่ 1.1) ที่อยู่ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ.

4. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

4.1 การเตรียมสปอร์

เขี่ยเส้นใยลงบนอาหารแข็งเอียงเปปโตน*(peptone agar slant)(ภาคผนวกที่ 1.2) ในหลอดทดลอง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°ซ ภายใต้หลอดไฟความเข้มแสง 9840 ลักซ์ เป็นเวลา 7-10 วัน ล้างสปอร์ด้วยสารละลายที่มีทวีน-80 ร้อยละ 0.1 (v/v) ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ให้กระจายทั่ว เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) กรองสปอร์แขวนลอยที่ได้ผ่านผ้าขาวบางที่ซ้อนทับกันหนา 5 ชั้น นับจำนวนสปอร์แขวนลอย โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ในกรณีที่ใช้เชื้อที่เก็บในอุณหภูมิต่ำ (4°ซ) มาเลี้ยงเพื่อเตรียมสปอร์ จะต้องนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PDA เสริมแร่ธาตุ (ภาคผนวกที่ 1.1) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 5 วัน

เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มที่ จึงจะนำมาใช้เตรียมสปอร์ตามวิธีข้างต้น

* ยกเว้นการทดลองที่ 3.1 เตรียมสปอร์โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เสริมแร่ธาตุ

4.2 การเตรียมหัวเชื้อ

นำสปอร์แขวนลอยจากข้อ 4.1 จำนวน 10^6 สปอร์ ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ (ภาคผนวกที่ 1.3) ปริมาณ 50 มล. ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 25° ซ ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 70-72 ชม.

4.3 การผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อจากข้อ 4.2 ปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลวสูตรที่ใช้สำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.4) ปริมาตร 50 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า ควบคุมอุณหภูมิที่ 25° ซ. ด้วยความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

4.4 การผลิตจิบเบอเรลลิน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 4.2 ให้ได้ปริมาตรรวม 350 มล. ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (ภาคผนวกที่ 1.4) ปริมาตร 3150 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 25°ซ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที ให้ค่าความเป็นกรดด่างแปรผันตามสภาวะการเลี้ยงเชื้อ (ไม่ควบคุม) ตามวิธีของอรไท สุขเจริญ (17) และใช้ adecanol เป็นสารต่อต้านการเกิดฟอง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ครั้งละ 25 มล. ตั้งแต่เริ่มการหมัก และทุก 24 ชั่วโมง จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน

5. วิธีการวิเคราะห์

5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 โดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (TLC)

นำน้ำหมักที่ปรับความเป็นกรดด่างจนมีค่าพีเอช 3 ด้วย 5 เปอร์เซนต์กรดไฮโดร

คลอริก สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตท ในอัตราส่วนน้ำหมักต่อเอทธิลอะซิเตทเป็น 1:2 เขย่าด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) อย่างแรงเป็นเวลา 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น นำชั้นเอทธิลอะซิเอทจำนวน 6 ไมโครลิตร ค่อยๆจุด (spot) ลงบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี (แผ่น TLC)ขนาด 10x20 เซนติเมตร ห่างกันจุดละ 1 เซนติเมตร วางในถังแก้วที่มีระบบตัวทำละลายอิ่มตัวที่ประกอบด้วย ตัวทำละลายที่ 1 คือ benzene : propionic acid : น้ำ ในอัตราส่วน 6:3:1 ปริมาตร 12 มล. ผสมกับ ตัวทำละลายที่ 2 คือ ethyl acetate ปริมาตร 8 มล. เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้ 10 เซนติเมตร (นานประมาณ 30 นาที) นำแผ่น TLC ออกมาเป่าให้แห้ง พ่นด้วย 5% กรดซัลฟูริกในเอทธานอล จากนั้นไปอบที่อุณหภูมิ 100° ซ เป็นเวลา 10 นาที เปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่และความเข้มกับจุดสารมาตรฐานตามวิธีของ Saucedo และคณะ (40)

5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC)

นำตัวอย่างน้ำหมัก 3 มล.เติมสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน(paracetamol) เขย่าและปรับความเป็นกรดด่างของสารละลายให้มีพีเอชเป็น 7 (วัดด้วยกระดาษวัดพีเอช)ด้วย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ สกัดของผสมทั้งหมดด้วยเอทธิลอะซิเตทจำนวน 5 มล.ในหลอดเกลียว เขย่าอย่างแรงด้วยเครื่องเขย่านาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น แล้วจึงนำชั้นของน้ำหมักจำนวน 2 มล. มาปรับความเป็นกรดด่างให้มีพีเอชเป็น 3 ด้วย 5 เปอร์เซนต์ กรดไฮโดรคลอริก สกัดด้วยเอทธิลอะซิเตทจำนวน 4 มล. เขย่านาน 4 นาที ทิ้งให้แยกชั้น ดามวิธีการสกัดแยก GA_3 ของสุภาพร พรพรหมกุล (42) นำชั้นของเอทธิลอะซิเตทมาขจัดน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous) นำสารละลายนี้ปริมาตร 3 มล. มาระเหยแห้งภายใต้สูญญากาศ ด้วยเครื่องระเหยแห้งแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) ที่อุณหภูมิ 30°ซ แล้วนำมาละลายด้วย 35% เมทานอลในกรดฟอสฟอริก ปริมาตร 3 มล. กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอน ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC คำนวนปริมาณ GA_3 เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวกที่ 3) ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีของ อรไท สุขเจริญ

คอลัมน์	:	Spherisorb 5 C8 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.6 มม. ยาว 250 มม.
สารละลายตัวพา (mobile phase)	:	เมธานอลและสารละลายกรดฟอสฟอริก พีเอช 3 อัตราส่วน 35 ต่อ 65 คงที่ตลอดการทดลอง (isocratic system)
อัตราการไหลของสารละลายตัวพา	:	1 มล. ต่อ นาที
ตรวจวิเคราะห์ด้วย UV	:	208 นาโนเมตร
ความไวของเครื่องตรวจวัด	:	0.08 AUFS (absorbance unit full scale)
ปริมาตรที่ใช้วิเคราะห์	:	10 ไมโครลิตร
ความดัน	:	198-220 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
เวลาที่เหมาะสมของสารที่อยู่ในคอลัมน์ (retention time)	:	8.9-10.0 นาที

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 การหาน้ำหนักเซลแห้ง

นำน้ำหมักปริมาตร 25 มล. มากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนัก ล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่น นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80°ซ จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักและหักลบน้ำหนักกระดาษจะได้น้ำหนักเส้นใยเชื้อรา

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) โดยวิธีของ Bernfeld (43)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวกที่ 2.2) 1 มล.ลงในตัวอย่าง 1 มล. ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มล. เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เข้มข้น 0.1-1.0 มก.ต่อมล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง

5.5 การวิเคราะห์ปริมาณซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

เติมสารละลายอินเวอร์เทสในอะซิเตตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 4 ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มล. ลงในตัวอย่างปริมาตร 0.5 มล. ในหลอดทดลอง นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 20°ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ด้วยวิธีตามข้อ 5.4 นำปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 5.5 ลบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 5.4 จะได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดจากซูโครสในตัวอย่าง ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้ซูโครสมาตรฐานเข้มข้น 0.1-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณซูโครสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

5.6 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสโดยใช้ พีจีโอ เอนไซม์ ตามวิธีของ Huggelt และ Nixon (44)

เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ (P.G.O. Enzyme ภาคผนวกที่ 2.3) 2.5 มล. ลงในตัวอย่าง 0.25 มล. โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขย่าให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร ทำ

กราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเทียบ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคส กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

5.7 การวิเคราะห์ปริมาณฟรักโตส

นำปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากข้อ 5.4 ลบกับปริมาณกลูโคสที่ได้จากข้อ 5.6 จะเป็นปริมาณฟรักโตสที่มีในตัวอย่าง

6. การกลายพันธุ์ Gibberella fujikuroi ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

6.1 การกลายพันธุ์ด้วยสายพันธุ์ C แสงอุลตร้าไวโอเลต

เตรียมสปอร์แขวนลอยตามข้อ 4.1 ปรับสปอร์แขวนลอยให้มีความหนาแน่น 10^5 สปอร์ต่อมล. นำสปอร์แขวนลอยใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้วพร้อมคริปเสียบกระดาษที่ตัดเป็นรูปตัว S เพื่อใช้เป็นอุปกรณ์กวน ดังแสดงในรูปที่ 4 วางบนเครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic

รูปที่ 4 แสดงอุปกรณ์การกวนที่ดัดแปลงสำหรับการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต

stirrer) ฉายแสงอุลตร้าไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 20 วัตต์ ระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสง 20 ซม. โดยมีการกวนตลอดเวลา เก็บตัวอย่างที่เวลาการฉายแสง 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125 และ 130 วินาที ตามลำดับ ทดลองในที่มืดเพื่อป้องกันการเกิด photoreactivation ตรวจสอบจำนวนสปอร์ที่อยู่รอด (viable count) เพื่อหาเปอร์เซนต์การอยู่รอดของสปอร์ โดยเจือจาง (dilution) สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงแล้วให้ได้จำนวนสปอร์ที่เหมาะสม จากนั้นกระจายสปอร์แขวนลอยปริมาตร 0.1 มล. ลงบนอาหารแข็งโพเตโตเด็กซ์โตรส บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25°ซ นับจำนวนโคโลนีที่เจริญ (สปอร์ที่รอด) คำนวนเป็นเปอร์เซนต์การรอดที่เวลาต่างๆ แบ่งกลุ่มสายพันธุ์ตามลักษณะภายนอก เก็บโคโลนีแบบสุ่มจากกลุ่มสายพันธุ์ดังกล่าวในช่วงเปอร์เซนต์การรอดตายของสปอร์ต่ำกว่า 5 เปอร์เซนต์ นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและตรวจสอบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 เพื่อคัดเชื้อที่ผลิต GA_3 สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งต้นขั้นปฐมภูมิด้วย TLC และขั้นทุติยภูมิด้วย HPLC หลังจากนั้นนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะเดียวกัน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 กับสายพันธุ์ดั้งต้น คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงสุด รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก (morphological change) กับประสิทธิภาพการผลิต GA_3 ของสายพันธุ์กลายพันธุ์สายพันธุ์ต่างๆ

6.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG

6.2.1 หาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการบ่มสปอร์ (preincubation) ของ ๆ)
Gibberella fujikuroi ก่อนการกลายพันธุ์ด้วย NTG

นำสปอร์แขวนลอยที่เตรียมได้ตามวิธีในข้อ 4.1 ใส่ในอาหารเหลว (nutrient broth)(ภาคผนวกที่ 1.5) ให้ได้ความหนาแน่นเป็น 10^6 สปอร์ต่อมล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25° ซ เพื่อกระตุ้นให้สปอร์งอกตามวิธีของ Avalos (34) เก็บตัวอย่างสปอร์ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ จำนวน 1 มล. มาปั่นและทำให้แขวนลอยอีกครั้งใน 0.5 โมลาร์ Tris-maleic acid พีเอช 8 แบ่งเป็นสองส่วน เติม NTG 2 ความเข้มข้น คือ 0.5 และ 0.7 มิลลิโมลาร์ ลงในแต่ละส่วน บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาของ NTG โดยการล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 2 ครั้ง ตรวจหาอัตราการอยู่รอดของสปอร์ที่มีระยะเวลาการงอกต่างๆกัน

6.2.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG

นำสปอร์จากสายพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นมาเตรียมสปอร์ให้มีระยะการงอก 3 ชั่วโมงตามวิธีในข้อ 6.2.1 นำมาปั่นและทำให้แขวนลอยอีกครั้งใน 0.5 โมลาร์ Tris-maleic acid พีเอช 8 เติมสารละลาย NTG ลงใน 0.5 มล. ของสปอร์แขวนลอยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 และ 0.9 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ โดยปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มล. ด้วย 0.5 โมลาร์ Tris-maleic acid พีเอช 8 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37° ซ เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาของ NTG โดยการล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง เจือจางสปอร์ให้มีความหนาแน่นที่เหมาะสม ตรวจสอบสปอร์ที่อยู่รอดโดยกระจาย 0.1 มล. ของสปอร์ที่ได้ ลงบนอาหารแข็ง PDA เสริมแร่ธาตุ บ่มที่อุณหภูมิ 25° ซ นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารแข็ง คำนวนเปอร์เซนต์การรอดที่ความเข้มข้นของ NTG ต่างๆ เก็บโคโลนีที่อยู่รอดแบบสุ่ม นำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นขั้นปฐมภูมิด้วย TLC และขั้นทุติยภูมิด้วย HPLC หลังจากนั้นนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่สภาวะเดียวกัน เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิต GA_3 กับสายพันธุ์ตั้งต้นเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิต GA_3 สูงสุด รวมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่าง (morphological change) และการเจริญของสายพันธุ์กลายพันธุ์สายพันธุ์ต่างๆ

7. การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิต GA_3 สูงขึ้น

7.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ (Primary screening)

เตรียมสปอร์แขวนลอยของสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ตามวิธีในข้อ 6.1 และ 6.2.2 นำสปอร์จำนวน 10^6 สปอร์ เติมลงในอาหารเหลวเพื่อเตรียมหัวเชื้อตามวิธีข้อ 4.2 ถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสูตรสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน ตามวิธีในข้อ 4.3 เก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง นำไปตรวจหาและวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 ขั้นปฐมภูมิ ด้วยทินเลเยอร์โครมาโตกราฟฟี ตามวิธีในข้อ 5.1 โดยเปรียบเทียบความเข้มของจุด GA_3 ของสายพันธุ์กลายพันธุ์สายพันธุ์ต่างๆกับความเข้มของจุด GA_3 ของสายพันธุ์ตั้งต้นด้วยตาเปล่า กำหนดให้ความเข้มของจุดสาร GA_3 ที่ปรากฏบนแผ่น TLC มี 4 ระดับคือ

ระดับที่ 0 หมายถึง ไม่ปรากฏจุดสาร GA_3 บนแผ่น TLC

ระดับที่ 1-2 หมายถึง ความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

ระดับที่ 3 หมายถึง ความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC เท่ากับสายพันธุ์ตั้งต้น

ระดับ 4-5 หมายถึง ความเข้มของจุด GA_3 บนแผ่น TLC สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ให้จุดสารจิบเบอเรลลินบนแผ่น TLCมีความเข้มสูงกว่าจุดสารจิบเบอเรลลินของสายพันธุ์ตั้งต้น

7.2 การคัดเลือกชั้นทุติยภูมิ (Secondary screening)

นำน้ำหมักของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7.1 มาวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 5.2 คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

7.3 การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงสุด

เพาะเลี้ยงสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 7.2 ในอาหารเหลวสูตรสำหรับการผลิต GA_3 (ภาคผนวกที่ 1.4) ตามวิธีข้อ 4.2 และ 4.3 เก็บตัวอย่างน้ำหมักในวันที่ 7 10 และ 13 ของการเพาะเลี้ยง มาวิเคราะห์หาปริมาณ GA_3 ในหน่วยมิลลิกรัมต่อลิตร ด้วย HPLC ตามวิธีในข้อ 5.2 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วหาปริมาณ GA_3 เฉลี่ยเปรียบเทียบปริมาณ GA_3 ที่สายพันธุ์ต่างๆผลิตได้กับสายพันธุ์ตั้งต้น คัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิต GA_3 สูงสุด เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ตั้งต้นสำหรับชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อไป