เอกสารอ้างอิง

1. Grove,J.F. Gibberellins. Plant Growth Substance in Agriculture San francisco : W.H. Freeman and Company, 1972.
2. Tahashi,N., Yamaguchi,I., and Yamane,H. Gibberellins. Chemistry of Plant Hormone pp.57-151, 1984.
3. พีรเดช ทองอาไพ. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย กรุงเทพมหานคร : ไดนามิกส์การพิมพ์, 2529.
4. Lonsane, B.K., and Kumar, P.K.R. Fungal Plant Growth Regulators. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology In Demain,A.L. and Solomon,N.A.(eds.), pp. 565-573, Washington, D.C.: American Society for Microbilogy, 1986.
5. Corey,E.J., and Danheiser,R.L. Stereospecific Total Synthesis of Gibberellic Acid. J. Am. CHEM. Soc. (1978):8034.
6. Yabuta,T., Sumiki,Y., Katayama,E., and Motoyama,K. J. Agri. Chem. Soc. 16(1940):1157.
7. Stodola, F.H., and Raper, K.B. The Microbiological Production of Gibberellin A and X. Arch. Biochem. Biophys. 54(1955):240.
8. Borrow,A., Brian,P.W., and Curyis,V.E. J. Sci Food Agric. 6(1955) :340.
9. Darken,M.A., Jensen,A.L., and Shu,P. Production of Gibberellic Acid by Fermentation. Appl. Microbiol. 7(1959):301-303.
10. Cross,B.E., Galt,R.H.B. and Hanson,J.R. Fermentation Process for The Production of Gibberellic Acid. Brit. Pat 957,634, 15(January 1959).
11. Borrow, A., Jeffery, E.G., and Nixon, I.S. Process of Producing Gibberellic Acid by Cultivation of Gibberella fujikuroi.

U.S.Pat. 2,906,671, 29(September 1959).

12. Brich, A.J., Nixon, I.S., and Grove, J.F. Process of Producing Gibberellic Acid. U.S.Pat. 2,977,285, 28(Mar 1961).

13. Kumar, P.K.R., and Lonsane, B.K. Gibberellic Acid by Solid State Fermentation : Consistent and Improve Yields. Biotechnol Bio eng. 30(1987):267-271.

14. Kumar,P.K.R., and Lonsane,B.K. Solid State Fermentation :Physical and Nutritional Factors Influencing Gibberellic Acid Production. Appl. Microbiol. Biotechnal. 34(1990):145-148.

15. Bruckner,B. and Blechschmidt,D. Nitrogen Regulation of Gibberellin Biosynthesis in Gibberella fujikuroi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35(1991):646-650.

16. วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา จิบเบอเรลลา ฟูจิคุรอย ซี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.

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

18. Baltz, R., Strain Improvement. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology In Demain, A.L. and Solomon,N.A. (eds.), pp.154-169, 1986.

19. Crueger, U. and Crueger, A. Strain Development. Biotechnology chap 3, pp.9-15, New York: Academic press, 1987.

20. Davies,O.L. Screening for Improve Mutants in Antibiotic Research. Biometrics 20(1964):576-591.

21. Queen, S.W., and baltz, R.H. Genetic of Industrial Microorganism. Annual Report on Fermentation Processes vol 3, New York:

Academic Press, 1979.

22. Fatini, A.A. Strain Development. Method in Enzymology Vol 43, pp.24-41, New York : Academic Press, 1965.

23. Sikyta, B. Genetics of Industrial Microorganism . Method in Industrial Microbiology chap 7, pp.214-239, 1983.

24. Hopwood, D.A. The Isolation of Mutants. Method in Microbiology In Norris, J.R. and Ribbons, D.W. (eds.), chap 6, vol 3A, pp.36-430, New York : Academic Press, 1970.

25. Brock, T.D. Biology of Microorganisms 6ed. pp.240-243 Prentice-Hall international, 1991.

26. Rosa, R.V., and Cerda-Olmedo, E. An E. coli Mutant Refractory to Nitrosoguanidine in Mutagenesis. Biochem. Biophys. Acta. 269(1972): 276-286.

27. Cruger,W., and Crueger,A. Strain Development. Biotechnology In Brock,D. (ed.), chap 3, pp.9-15, USA : Science Tech, 1984.

28. Sussmuth,R., Haerlin,R. and Lingen,F. The Mode of Action of N-Methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine in Mutagenisis. Biochem. Biophys. Acta. 269(1972): 276-286.

29. Calam,C.T. Improvement of Microorganisms by Mutation, Hybridization and Selection. Method in Microbiology In Norris, J.R. and N.W. Ribbon. (eds.), vol 3A, pp.435-459, New York: Academic Press, 1970.

30. Mandell,J.D. and Greenberg,F. A New Chemical Mutagen for Bacteria, 1-Methyl-3-Nitro-1-Nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. Com. 3(6)(1960): 575-577.

31. Erokhina,L.I. Some Characteristics of Mutants Fusarium moniliforme. Genetika 11(1969): 147.

32. Erokhina,L.I. Biochemical Mutant of Fusarium moniliforme. Genetika 8(1972): 168-172.

33. Imshenetskii, A.A. and Ul'yanova, O.M. Biochemical Activity of Fusarium moniliforme Sheld. Mutants. Microbiologia No.5 31(1962):832-837.

34. Avalos,J., Casadesus,J. and Cerda-olemedo,E. Gibberella fujikuroi Mutants Obtained with UV Radiation and N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine. App. Envir. Micro. (Jan 1985):187-191.

35. Koelblin,R., Brueckner,B., Blechschmidt,D., and Fisher,W. Activity of Mutagens in The Fungus Gibberella fujikuroi. J. Basic. Microbio. 30(9)(1990): 675-7.

36. Crozier,A., Kuo,C.C., Durley,R.C., and Pharis,R.P. The Biological Activities of 26 Gibberellins in Nine Plant Bioassays. Can. J. of Bot. 48(1970): 867-877.

37. Kumar,P.K.R., and Lonsane,B.K. Microbial Production of Gibberellins :State of The Art. Advances in Applied Microbiology vol 34, pp.31-37, New York: Academic Press , 1985.

38. Kumar, P.K.R., and Lonsane, B.K. Spectrofluorodensitometric Estimation in Thin-Layer Chromatography of Gibberellic Acid by Solid-State Fermentation. J. Chrom. 369(1986): 222-226.

39. Cavell,B.D., MacMillan,J., Pryce,R.J., and Sheppared,A.C. Thin-Layer and Gas-Liquid Chromatography of The Gibberellins, Direct Identification of The Gibberellins in A Crude Plant Extract by Gas-Liquid Chromatography. Phytochemistry 6(1967):867-874.

40. Saucedo,J.E.N., Barbotin,J.N. and Thomas,D. Continuous Production

of Gibberellic Acid in Fix-Bed Reactor by Immobilized Mycelia of Gibberella fujikuroi in Calcium Alginate Beeds. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30(1989): 226-233.

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

42. สุภาพร พรพรหมกุล. การสกัดแยก และการตกผลึกกรดจิบเบอเรลลิกจากน้ำหมักของเชื้อ Gibberella fujikuroi. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2534.

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

44. Huggett,A., and Nixon,D.A. Enzymatic Determination of Blood Glucose. J. Biochem. 66(1957):12.

45. Cerda-Olmedo,E., Hanawalt,P.C., and Guerola,N. Mutagenesis of The Replication Point by Nitrosoguanidine : Map and Pattern of Replication of The Escherichia coli Chromosome. J. Mol. Biol. 33(1968):705-719.

46. Saito,H. and Hori,M. A Technique for Obtaining Alarge Amont of Macroconidia of The Pathogen. (1985): 1-19.

47. Tien,W. Isolation of Penicillium chrysogenum Mutants by Mutation and Selection Technique. Proc. Natl. Sci.Counc. ROC(A), No.4, 5(1981): 256-261.

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมเชื้อราเพื่อกระตุ้นการสร้างสปอร์

โพเตโตเด็กซ์โตรสอาการ์ (potato dextrose agar,PDA)เสริมแร่ธาตุ(16) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	300	กรัม
(ต้มให้เดือดแล้วกรองเอาเฉพาะน้ำใส)		
เด็กซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.5	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	0.5	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	0.01	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารแข็งสำหรับกระตุ้นการสร้างสปอร์ (peptone agar medium) (46)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.75	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.35	กรัม
โพลีเปปโตน	0.25	กรัม
เด็กซ์โตรส	0.5	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีพีเอช 6.5-7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 **สูตรอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ** (minimum medium)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วบดละเอียด (defatted soybean meal)	1.9	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1	กรัม
อลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.1	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้มีพีเอช 7.0 อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 **สูตรอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน** (production medium)(17)

ใช้อาหารสูตรเดียวกับข้อ 1.3 แต่เพิ่มน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 (v/v)

1.5 Nutrient broth (34)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

yeast extract	4	กรัม
peptone	8	กรัม

อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2.1 **การเตรียม NTG**

เตรียม NTG (น้ำหนักโมเลกุล 147.1) เข้มข้น 1 mg/l หรือ 6.7980 mM. ละลายใน 0.5 โมลาร์ Tris-maleic acid พีเอช 8 นำไปใช้ทันที การเตรียม NTG เตรียมในแต่ละครั้งของการทดลอง ต้องชั่งในที่ลมสงบ ใส่ถุงมือและผ้าปิดปากและจมูก วางกระดาษรอง

ระหว่างเครื่องชั่งกับภาชนะบรรจุป้องกันการปนเปื้อนสารเคมี NTG ในห้องปฏิบัติการ วัสดุอุปกรณ์การทดลองที่ปนเปื้อน NTG ให้นำมาแช่ในสารละลาย 1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ภายในตู้ควันที่ดูดอากาศออกนาน 6-8 ชั่วโมง

2.2 **การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก** (dinitrosalicylic acid)

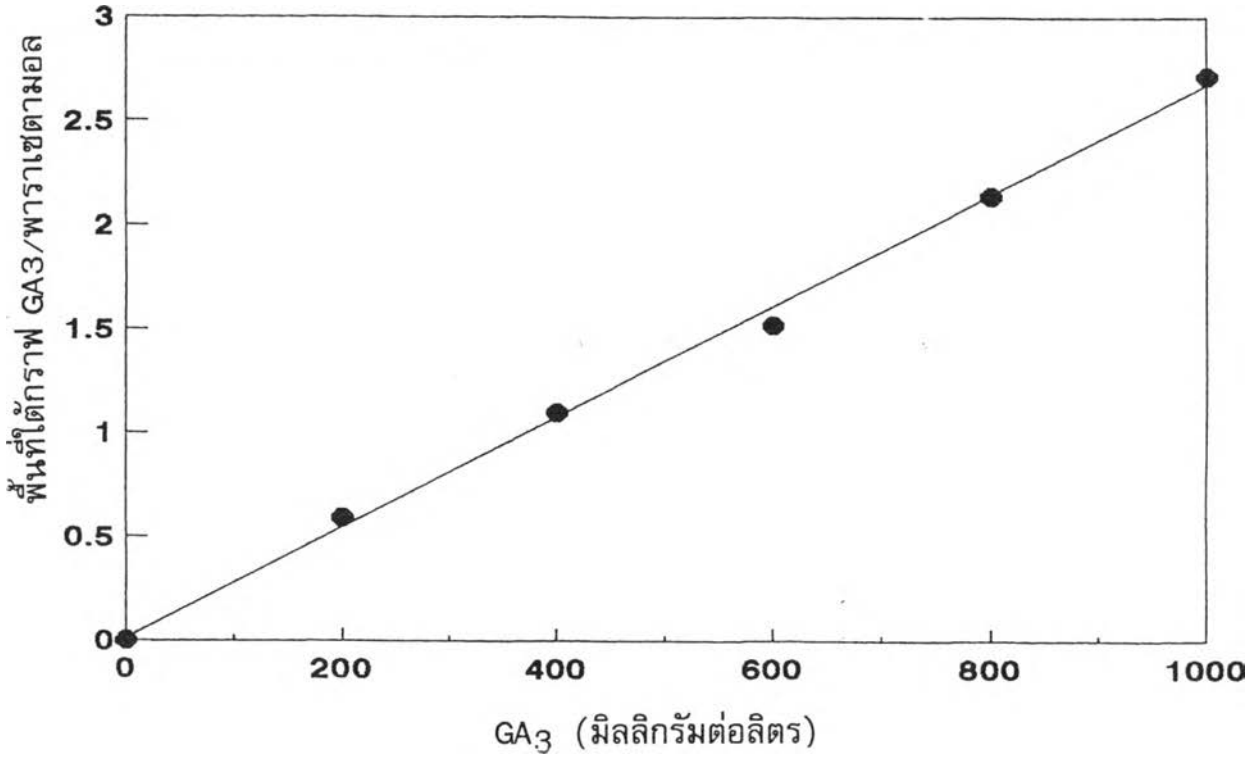
ละลาย 1 กรัม ของกรดไดไนโตรซาลิไซลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ 20 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มล. เติมโปแตสเซียมทาเตรท 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

2.3 **การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส**

นำพีจีโอเอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วย มาละลายในสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 จำนวน 60 มล. เติมสารละลายของโอไดอะนิซิดีน (o-dianisidine) ร้อยละ 1 ในเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 0.5 มล. ทำให้เป็น 100 มล. ด้วยสารละลายโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7

3. กราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPLC มีพาราเซตามอล เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน

เตรียม GA_3 มาตรฐาน เข้มข้น 3 มก.ต่อลิตร โดยชั่ง GA_3 มาตรฐาน ความบริสุทธิ์ 97.5 เปอร์เซนต์ จำนวน 0.0768 กรัม ละลายใน 35% เมทานอลในกรดฟอสฟอริก พีเอช 3 ภายใน volumetric flask ขนาด 25 มล. เจือจางสารมาตรฐาน GA_3 ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1.0 มก.ต่อมล. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ นำสารมาตรฐานที่เตรียมได้ ความเข้มข้นละ 3 มล. มาสกัดตามวิธีในข้อ 5.2



รูปที่ 13 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 โดยวิธี HPLC ในน้ำหมักที่ผ่านการสกัดแล้ว

จากรูปที่ 15 ได้สมการเป็น $Y = 2.66X + 0.01$

มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) เป็น 0.998

โดย Y คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ GA_3 ต่อ พาราเซตามอล

X คือ ปริมาณ GA_3 ในหน่วย มิลลิกรัมต่อลิตร

รูปที่ 14 ลักษณะโครมาโตแกรมของ GA_3 ที่ผลิตโดย Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ N9-34 เมื่อใช้พาราเซตามอลเป็นสารมาตรฐานมาตรฐานเปรียบเทียบภายในวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง

t_R ของ GA_3 เท่ากับ 9.91

t_R ของ พาราเซตามอล เท่ากับ 4.56

ประวัติผู้เขียน

นางสาว จันทร์ธิรา สัภยพร เกิดวันที่ 20 กรกฎาคม 2508 ในจังหวัดกรุงเทพมหานคร ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2530