รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ขวัญฤทัย อินสวน. 2539. การกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ *Gibberella fujikuroi* เพื่อผลิตจิบเบอเรลลินที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประยูรศรี วัฒนโกศล. 2537. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Gibberella fujikuroi*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์. 2532. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อรา จิบเบอเรลลา ฟูจิคูรอย ซี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภชัย สมั่ปปิโต. 2537. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน โดย *Gibberella fujikuroi* N9-34. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สันติ เหมศรี. 2539. การขยายส่วนการผลิตจิบเบอเรลลินโดย *G. fujikuroi* N9-34. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

อัครวิทย์ กาญจนโอภาษ. 2536. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลิน โดย *Gibberella fujikuroi* F4W-6(9) ในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุษามาส วังชัยสุนทร. 2538. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตจิบเบอเรลลินของ *Gibberella fujikuroi* N9-34 โดยการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Avalos, J.,Casadesus and Cerda-Olmedo, E. 1985. *Gibberella fujikuroi* mutants obtained with UV radiation and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine.Applied and Environmental Microbiology. Jan, pp. 187-191.

Ayukawa, T. 1985. Hairtonic composition. U. S. Patent No. 4,508,707

Baltz, R. 1986. Strain improvement. in Manual of Microbiology and Biotechnology. Demain, A. l., and Solomom, N. A. (eds). Washington D.C. : American Society for Microbiology. pp. 154-169.

Bernfeld, P. 1955. Amylase and Method in Enzymology (Colowick, P. S. and Kaplan, O. N. eds.) vol. 1, New York : Academic Press Inc., Publishers, pp. 149.

Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium sp*. , London : Easten press, pp. 237.

Borrow, A., Brian, P. W., Chester, V. E., Curtis, P. J., Hemming, H. G., Henchan,C, Jefferys, E. G. Lloyd, P. B., Nixon, I. S., Norris, G. L. F., and, and Radley, M. 1955 Gibberellic acid, a metabolic product of the fungus *G. fujikuroi* : Some observation on its production and isolation. J. Sci. Food. Arg. 6 : 340-348.

Borrow, A., Sheila Brown, Jeffery, E. G., Kessel, R. H. J., Lloyd, E. C., Lloyd, P. B., Rothwell, A., Rothwell, B., and Swait, J. C. 1964. The effect of varied temperature on the kinetics of metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture.Canadian Journal of Microbiology. vol. 10, pp. 445-466.

Bruckner, B. and Blechschmidt, D., Sembder, G., and Schneider, G. 1989. Fungal gibberellin production, in Biotechnology of Vitamins, Pigment and Growth Factors, Vandamme, E. J., Ed. pp. 385-401.

Bruckner, B. and Blechschmidt, D. 1991a. The gibberellin fermentation.Critical Reviews in Biotechnology, 11 : 163-192.

Bruckner, B., and Blechschmidt, D. 1991b. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*.Applied Microbiology Biotechnology, 35 : 646-650.

Bulock, J. D., Detroy, R. W., Hostalek, Z. and Monin-Al-Shakarchi, A. 1974. Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Trans. Br. Mycol. Soc. 62 : 377-389.

Burnett, J. H. 1970. Fundamentals of mycology. London : Edward Arnold (Publishers) Ltd. pp. 298-308.

Candau, R., Avalos, J. and Cerda-Olmedo, E. 1992. Regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Plant Physiol. 100 : 1184-1188.

Coley, E. J., Danheiser, R. L., Chandraeharan, S. Kech, G. E., Golbalan, B., Larsen, S. D., Siret, P., and Gras, J. L. 1978. Steriospecific total synthesis of gibberellic acid. J. Am. Chem. Soc. 100 : 8034-8036.

Cross, B. E. 1957. Gibberellic acid. Part I. J. Am. Chem. Soc. : 4670-4676.

Cross, B. E., Grove, J. F., and Morrison , A. 1961. Gibberellic acid. Part XVIII. Some rearrangements of ring A. J. Chem. Soc.,Perkin Trans. I : 2498-2516.

Curtis, P. J., Cross, B. E. 1954. Gibberellic acid,a new metabolite from culture filtrates of Gibberella fujikuroi . Chem. Ind. : 1066.

Darken, M. A., Jenson, A. L., and Shu , P. 1959. Production of gibberellic acid by fermentation. Applied Microbiology, 7 : 301-303.

Demain, A. L. 1986. Regulation of secondary metabolism in fungi. Pure and Applied. Chemistry. 58(2) : 219-226.

Elander, R. P. 1989. Bioprocess technology in industrial fungi. in Fermentation process development of industrial organism. edit by Neway, J. O., Mercel dekker, inc. pp. 169-219 New York and Basel.

Fuska, J., Kuhr, I., Podojil, M. and Sercik, V. 1961. The influence of nitrogen source and the production of gibberellic acid in submerge cultivation of *Gibberella fujikuroi*. Folia Microbiology. vol. 6 : 18-21.

Gancheva, V. and Dimova, T. 1984. Biosysnthesis of gibberellin. Ⅱ Influence of the quantity and age of inoculum on the biosynthesis of gibberellin from the strain Fusarium IM-11. Atca Microbiol. Bulgarica. 14 : 74-79.

Garraway, M.O., and Evans, R. C. 1984. Fungal nutrition and physiology. New York : John Wiley & Sons. ,pp. 401.

Geissman, T. A., Verbiscar, A. J. Phinney, B. O., and Cragg, G. 1966. Studied on the biosynthesis of gibberellin from(-)kaureonic acid in culture of *Gibberella fujikuroi*. Phytochemistry. 5 : 933-947.

Graebe, J. F. 1987. Gibberellin biosynthesis and control.Ann. Rev. Plant. Physiol. 38 : 419-465.

Grove, J. F. 1961. The gibberellins.Quart. rev.(Chem. Soc. London) 15 : 46-70

Hanson,J. R. 1983. Aspects of diterpenoid and gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. Biochemical Society Transaction. 11 : 522-528.

Hedden, P., MacMillan, J. and Phinney, B. O. 1978. The metabolism of the gibberellins.Ann. Rev. Plant. Physiol. 29 : 149-92.

Hedden, P. 1983. In vitro metabolism of gibberellins in The biochemistry and physiology of gibberellin, Vol. 1, New York : Crozier. pp. 99-150.

Hanson, J. R. 1990. The chemistry of the gibberellins. Natural Product Reports. 7 : 41-59.

Huggett, A. and Nixon. D. A. 1957. Enzymatic determination of blood glucose. J.Biochem. 66 : 1-12.

Jeffery, E. G. 1970. The gibberellin fermentation. Adv. Appl. Biol. 13 : 283-316

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

Kumar, P. K. R. and Lonsane, B. K. 1989. Microbial production of gibberellin : State of the art. Advanced in Applied Microbiology, 34 : 56-75.

Lonsane, B. K., Kumar, P. K. R. 1991. Fungal plant growth regulator.In Arora, P. K., Elender, R. P. and Merkerji, K.G. (eds), Handbook of applied mycology fungal biotechnology, vol. 4 : 565-576.

MaInnes, A. G., Smith, D. G., Durley, R. C., Pharis, R. P., Arsenault, G. P., Gaskin, P. and Vining, L. C. 1977. Biosynthesis of gibberellin in *Gibberella fujikuroi* . GA_{47}. Can. J. Biochem. vol. 55 : 728-735.

Owen, D. J., Mander, L. N., Storey, J. M., Huntley, R. P., Gaskin, P., Lenton, J. R., Gage, D. A., and Zeevaart, J. A. 1998. Synthesis and confirmation of structure for a new gibberellin'2 beta-hydroxy-GA_{12} (GA_{110}) from spinach and oil palm. Phytochemistry, Feb 47(3) : 331-337.

Pakinson, W. R. 1985. Cosmetic preparation. U. S. Patent No. 4,518,614

Pearce, D. W., Koshioka, M., and Pharis, R. P. 1994. Chromatography of gibberellins. Journal of Chromatography. 658 : 91-122.

Perez, F. J., Vecchiola, A., Pinto, M. Agosin, E. 1996. Gibberellic acid decomposition and its loss of biological activity in aqueous solution. Phytochemistry. 41(3) : 507-514.

Pryce, R. J. 1973. Decomposition of aqueous solution of gibberellic acid on autocaving. Phytochemistry, 12 : 507-514.

Pryce, R. J. 1974. New intermediates in the aqueous decomposition of gibberellic acid.J. Chem. Soc. Perkin Trans. I : 1179-1184.

Ressell, S. 1975. In gibberellins and plant growth. (Hrishnamoorth,H. N. Ed.) New dehli : Wiley Eastern Ltd., pp.1-34.

Riley, J. M. 1987. Gibberellic acid for fruit set and seed germination.CRFG Journal vol. 19 : 10-12.

Rybakov, Y. A., and Bourd, G. I. 1991. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis enzyme complex in Fusarium moniliforme. Journal of Biotechnology, 21 : 219-228.

Sanches-Marroquin, A. 1963. Microbiological production of gibberellic acid in glucose media. Applied. Microbiol. vol. 11 : 523-528.

Sanchez-Fernandez, R., Avalos, J., and Cerda-Olmedo, E. 1997.Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in Gibberella fujikuroi. FEBS Letters. 413 : 35-39.

Shechter, I. and West, C. A. 1969. Biosynthesis of gibberellin : Biosynthesis of cyclic diterpenes from trans-geranyl pyrophosphate. J. Biol. Chem. 224 : 3200-3209.

Sponsel, V. M. 1995. The biosynthesis and metabolism of gibberellin in higher plants in Plant Hormones,Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, edited by Davies, P. J. , London : Kluwer Academic Publishers, pp. 39-66.

Stanbury, P. F., and Whitaker, A. 1989. Principle of Fermentation Technology. Oxford : Pergamon Press, pp. 425.

Stodola, F.H., and Raper, K. B. 1955. The microbiological production of gibberellin A and X. Arch. Biochem. Biosphys. 54 : 240.

Stowe, B.B., and Yamaki, T. 1957. The history and the physiological action of gibberellin. Annual Review Plant Physiology 8 : 181-216.

Takahashi, N., Yamaguchi, I., Yamane, H., 1986. Gibberellin,Chemistry of plant hormone. CRC Press Inc, pp. 57-67.

Turner-John, V. Bell and Russsel, A. 1985. Process for making gibberellins, US Patent No. 4,532,334

Vass , R. C. and Jeffery, E. G. 1979. Gibberellic acid ,in Economic Microbiology. Vol. 3 , Florida : Acardemic Press, pp. 425.

Windholz, M. 1983. Merck Index. 10th ed. Merck & Co., Inc. Rahway ,N. J., U.S.A

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้ในงานวิจัย

1. สูตรอาหารเหลวสำหรับผลิตจิบเบอเรลลิน (Production medium)

1.1 สูตรอาหารแข็งโพเทโทเดกซ์โทรสสำหรับการเก็บรักษาเชื้อรา (Potato Dextrose Agar, PDA) เสริมแร่ธาตุในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

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

ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้เท่ากับ 5.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารแข็งแอซีเทตสำหรับกระตุ้นการสร้างสปอร์ (Acetate agar) ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

แอมโมเนียมไนเตรต(NH_4NO_3)	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)	1.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
โซเดียมแอซีเทต($CH_3COONa.3H_2O$)	0.6	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum medium) ตามสูตรของศุภชัย สมัปปิโต (2537) ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำตาลซูโครส($C_{12}H_{22}O_{11}$)	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$)	2.39	กรัม
สารละลายกากเมล็ดฝ้าย (cotton seed hydrolysate)	1.14	กรัมไนโตรเจน
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2 PO_4$)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$)	0.5	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์ (Al_2O_3)	0.1	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้เท่ากับ 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 สูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (Production medium) ตามสูตรของศุภชัย สมัปปิโต (2537) ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

น้ำตาลซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$)	1.89	กรัม
กากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted soybean meals)	5.90	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1.0	กรัม
อะลูมิเนียมออกไซด์(Al_2O_3)	0.1	กรัม
น้ำมันถั่วเหลือง	2.0	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้เป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 สูตรอาหารสำหรับหาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4 แต่แปรผันปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วเป็น 1.24, 2.49, 3.73, 4.97, 5.9, 6.22, และ 7.46 ตามลำดับ และแปรผันสารละลายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง และกากเมล็ดฝ้าย ที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.64, 1.14, 1.64, และ 2.14 กรัมต่อลิตร

1.6 สูตรอาหารสำหรับหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4 แต่ใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.90 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.47 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน แต่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0, 0.47, 0.94, 1.42, 1.89, 2.36, 2.84, และ 3.31 กรัมต่อลิตร

1.7 สูตรอาหารสำหรับหาปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4 แต่ใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.90 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 1.42 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณซูโครสเป็น 80, 100, 120 และ 140 กรัมต่อลิตร

1.8 สูตรอาหารสำหรับหาปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.4 แต่ใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.90 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 1.42 กรัมต่อลิตร ปริมาณซูโครส 120 กรัมต่อลิตร และแปรผันน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 0, 1, 2, 3, 5, 7 และ 9 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

1.9 สูตรอาหารสำหรับหาปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.7 แต่ใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมันถั่วเหลือง 2 มิลลิลิตร แต่แปรผันปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 กรัมต่อลิตร

1.10 สูตรอาหารสำหรับหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.9 และใช้ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.0 กรัมต่อลิตร แต่แปรผันปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเป็น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร

1.11 สูตรอาหารสำหรับหาปริมาณอะลูมิเนียมออกไซด์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.9 แต่แปรผันปริมาณอะลูมิเนียมออกไซด์เป็น 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 กรัมต่อลิตร

1.12 สูตรอาหารสำหรับหาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.8 แต่แปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น เป็น 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 ตามลำดับ

1.13 สูตรอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหาร 1 ลิตร มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.12 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษานี้ และตามสูตรของศุภชัย สมัปปิโต(2539) อัตราการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที ปริมาตรอากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosallcylic acid: DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติมโพแทสเซียมทาเทรต (potassium sodiumtatrate ; $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำขจัดไอออนแล้วเก็บในขวดสีชา

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลซูโครส

2.1 สารละลายแอซีเทตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมแอซีเทต ($CH_3COONa . 3H_2O$) 11.628 กรัม และปิเปตต์สารละลายกรดแอซีติก ปริมาตร 0.86 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 4 ด้วยสารละลายกรดแอซีติก

2.2 สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตต์สารละลายแอซีเทตบัฟเฟอร์ จากข้อ 2.1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียมสารละลายของเอนไซม์ พี.จี.โอ

ละลายเอนไซม์พี.จี.โอ. 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วย และเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วย ในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (potassium phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง 7 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมสารละลายออโท-ไดอะนิซิดีน (o-dianisidine) เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอทานอล(น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7

4. การเตรียมสารละลายที่ย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดฝ้าย

ชั่งกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้ว หรือกากเมล็ดฝ้าย ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด ปริมาณ 200 กรัม เติมสารละลายกรดกำมะถันเข้มข้น 0.50 นอร์มอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปย่อยในตู้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร กรองแยกกากออกด้วยผ้าขาวบาง แล้วนำน้ำที่กรองได้ไปปรับค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ แล้วจึงแบ่งสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าสารละลายที่ได้มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดประมาณร้อยละ 0.30-0.40 (น้ำหนักต่อปริมาตร)จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้มาเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์ไนโตรเจน

5.1 เกลือผสม (salt mixture) ประกอบด้วย โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 95 กรัมและคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 5 กรัม ปั่นของผสมด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด

5.2 อินดิเคเตอร์ผสม ประกอบด้วยสารละลายเมทิลเรด และเมทิลีนบลู อย่างละ 0.1 กรัม ในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

5.3 สารละลายกรดบอริก (boric acid) เตรียมโดยละลายกรดบอริก 4 กรัม ในน้ำที่ขจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

5.4 สารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล

6. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กรดจิบเบอเรลลิก โดยวิธี HPLC

6.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก

ชั่งสารมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก (ความบริสุทธิ์อย่างต่ำ 90) 0.0833 กรัม ละลายในเมทานอลเข้มข้นร้อยละ 35 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก เข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ(production medium) เพื่อทำกราฟมาตรฐาน แสดงไว้ในตารางที่ ข - 1

6.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard)

สารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่ใช้ได้แก่ ยาพาราเซทามอล (paracetamol) ชนิดฉีดของบริษัท T.P. DRUG LABORATORIES ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้น 6.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3 สกัดสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิกที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 และนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.6.7 นำค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก และสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายในแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของกรดจิบเบอเรลลิกและค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟดังแสดงในภาคผนวก ค - 4 และลักษณะโครมาโทแกรมที่ได้แสดงดังภาคผนวก ง-1

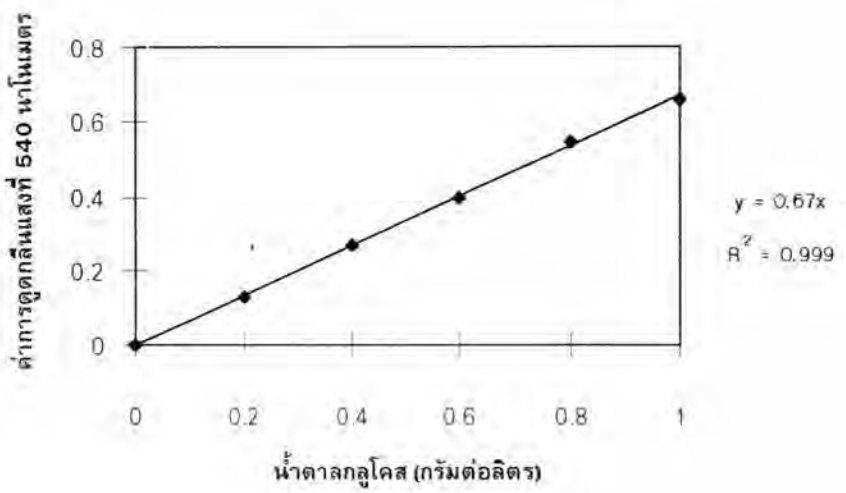
ตาราง ข-1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

ความเข้มข้นของ GA_3 (มิลลิกรัมต่อลิตร)	สารละลายมาตรฐาน GA_3 ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (มิลลิลิตร)	อาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต GA_3 (มิลลิลิตร)
0	0	3.0
200	0.2	2.8
400	0.4	2.6
600	0.6	2.4
800	0.8	2.2
1000	1.0	2.0

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

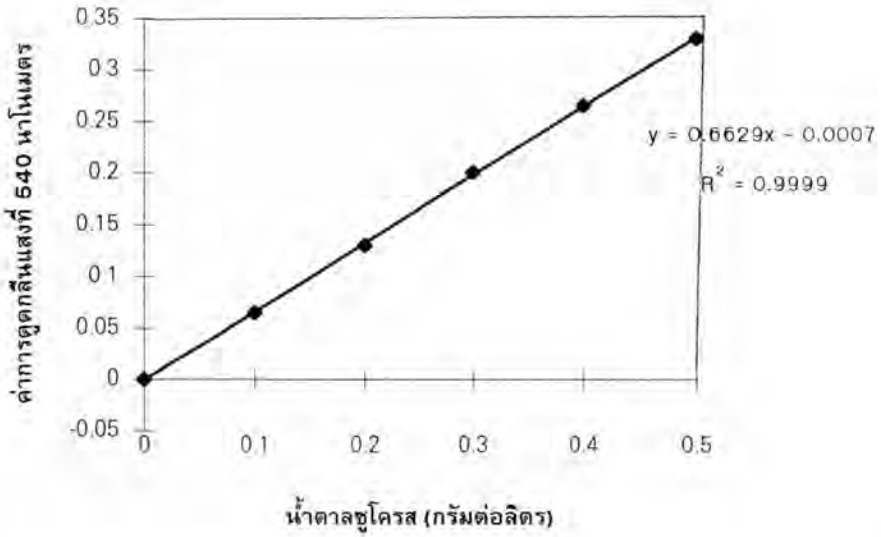
1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก ตามวิธีการของ **Bernfeld (1955)**



รูปที่ ค - 1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0 - 1.0 กรัมต่อลิตร

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร x 1/ ความชัน x ความเจือจาง

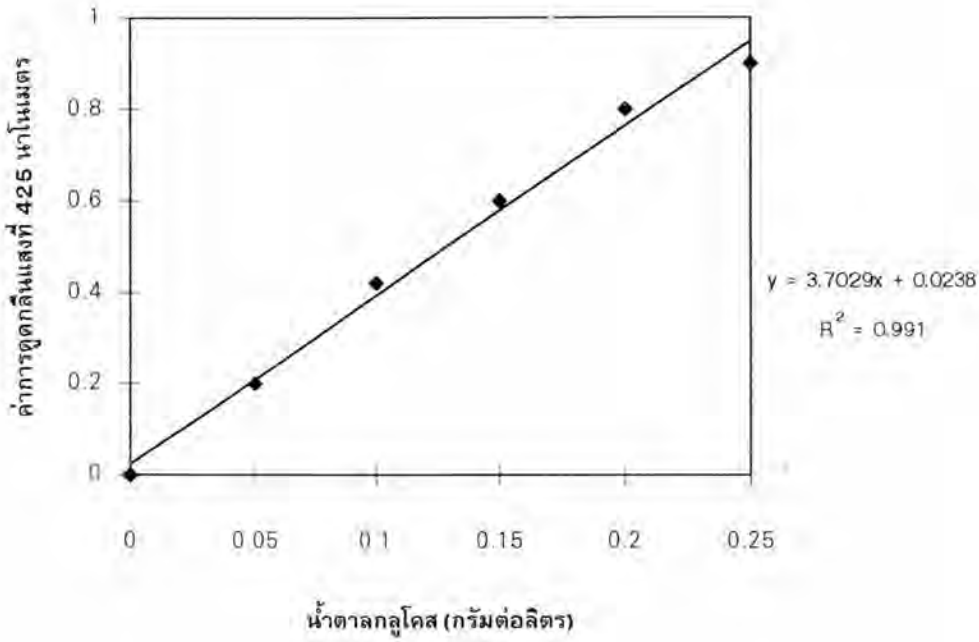
2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส



รูปที่ ค - 2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0 – 0.5 กรัมต่อลิตร

ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร x 1/ ความชัน x ความเจือจาง x2

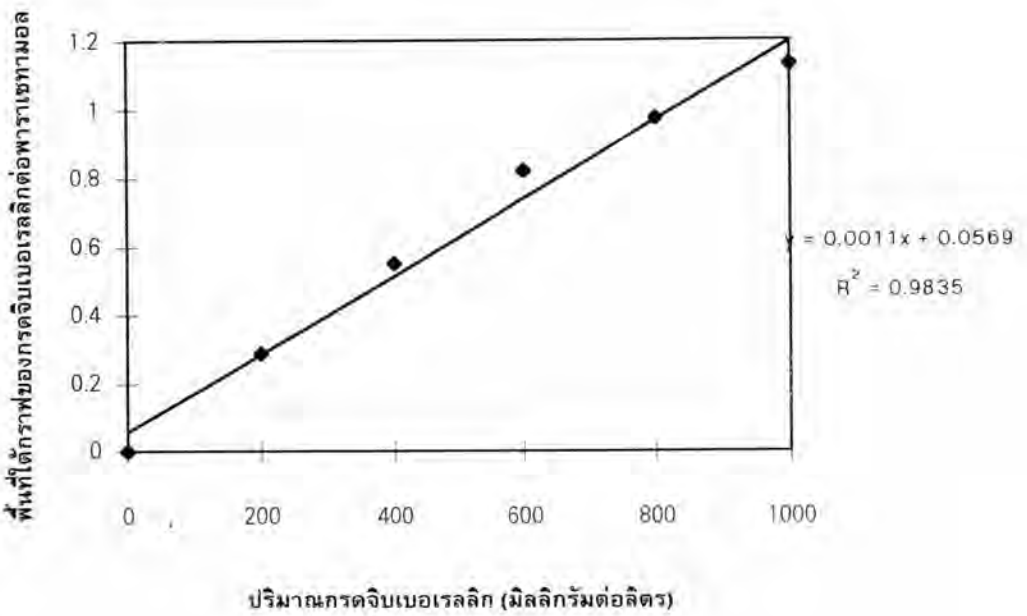
3. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ พี.จี.โอ ตามวิธีการของ **Huggett** และ **Nixon** (1957)



รูปที่ ค - 3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0 - 0.25 กรัมต่อลิตร

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร x 1/ ความชัน x ความเจือจาง

4. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกด้วยวิธี HPLC



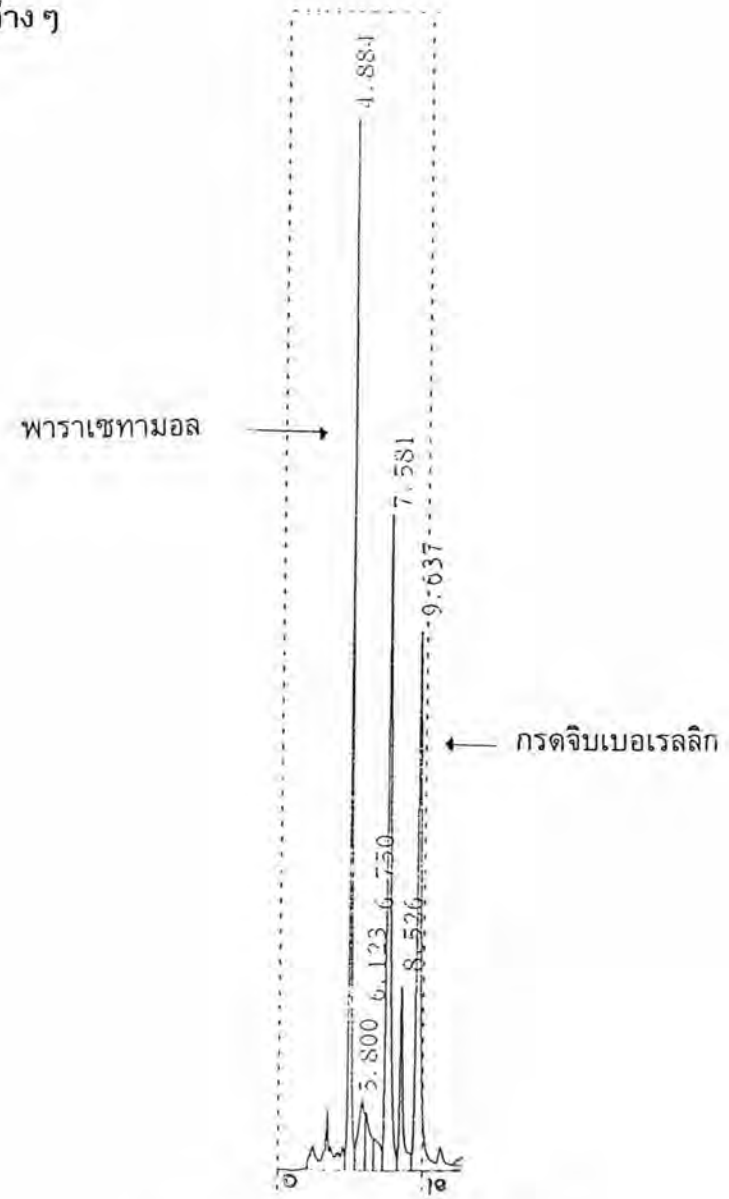
รูปที่ ค - 4 กราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิกในช่วงความเข้มข้น 0 - 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร

ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) = พื้นที่ใต้กราฟของกรดจิบเบอเรลลิกต่อพาราเซทามอล x 1/ ความชัน x ความเจือจาง

ภาคผนวก ง

โครมาโทแกรมและการคำนวณปริมาณไนโตรเจน

1. โครมาโทแกรมของตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานกรดจิบเบอเรลลิก ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



ลักษณะโครมาโทแกรมของตัวอย่าง

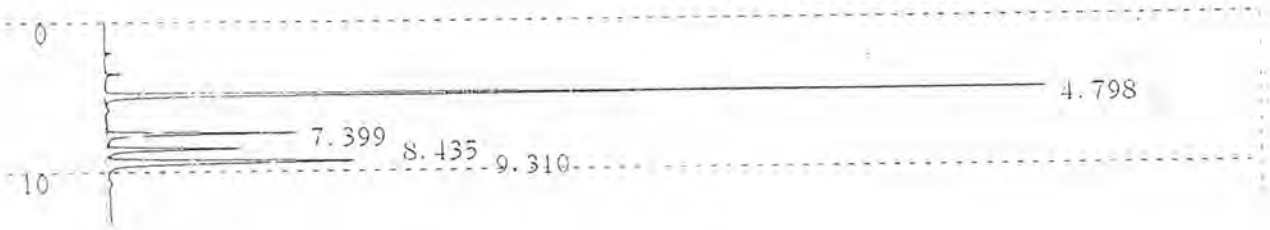
NO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
7	4.734	120747	13811			76.6917	
9	7.359	14910	1353			9.4696	
11	8.341	21788	1733	V		13.8387	
	TOTAL	157445	16897			100	

1) GA_3 มาตรฐานเข้มข้น 0 (มก./ล.)

NO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
5	4.745	111220	12704			59.9617	
8	7.34	19941	1789			10.7507	
10	8.331	21065	1695	V		11.3565	
11	9.133	33259	2029	V		17.931	
	TOTAL	185484	18217			100	

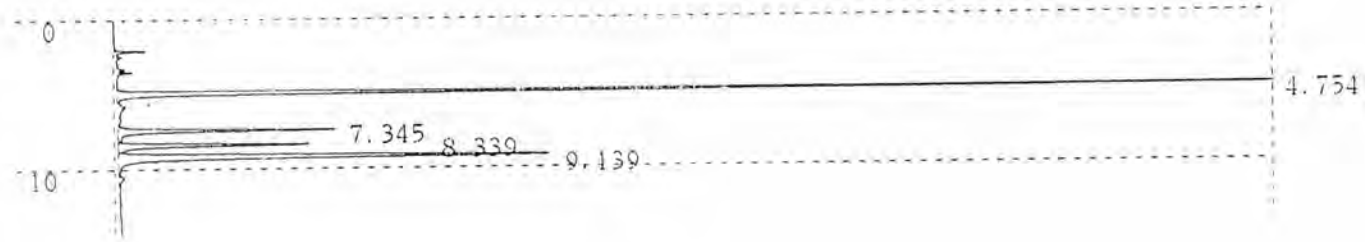
2) GA_3 มาตรฐานเข้มข้น 200 (มก./ล.)

3) GA_3 มาตรฐานเข้มข้น 400 (มก./ล.)



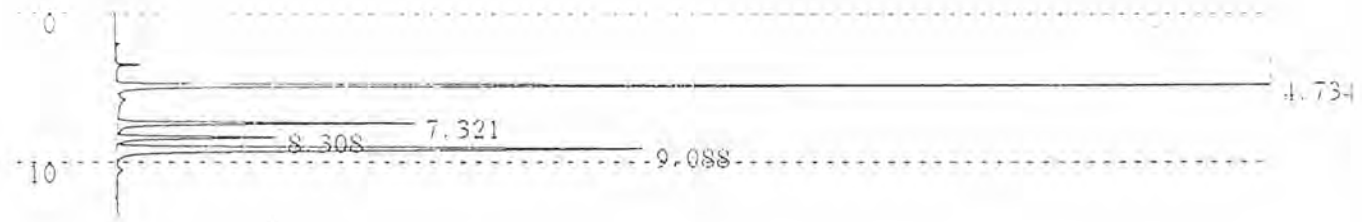
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
6	4.798	113913	13005			51.2033	
9	7.399	29307	2607			13.1731	
10	8.435	22767	1832	V		10.2337	
11	9.31	56485	3397	V		25.3898	
	TOTAL	222472	20841			100	

4) GA_3 มาตรฐานเข้มข้น 600 (มก./ล.)



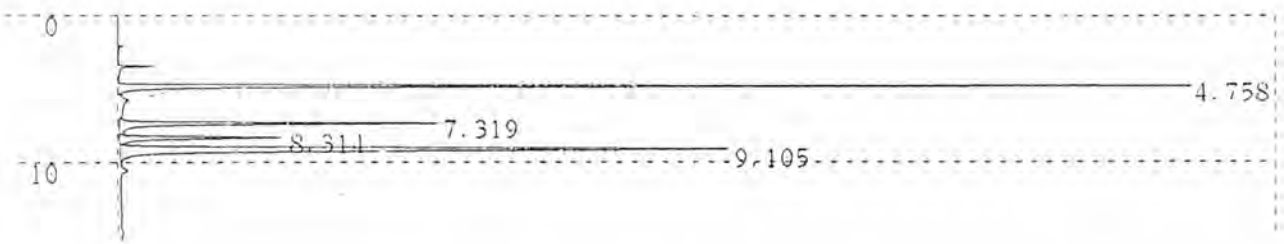
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
9	4.754	150044	17147			47.4049	
14	7.345	35381	2992	SV		11.1781	
16	8.339	32913	2634	V		10.3986	
17	9.139	98178	5933	SV		31.0183	
	TOTAL	316515	28706			100	

5) GA_3 มาตรฐานเข้มข้น 800 (มก./ล.)



PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
7	4.734	137879	15909			41.7824	
10	7.321	46212	4094			14.0039	
11	8.308	26684	2181	V		8.0863	
12	9.088	119218	7265	V		36.1274	
	TOTAL	329994	29449			100	

6) GA_3 มาตรฐานเข้มข้น 1000 (มก./ล.)



PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
3	4.758	127511	14822			37.3267	
7	7.319	50312	4397	V		14.7279	
8	8.314	27175	2216	V		7.9549	
9	9.105	136611	8381	V		39.9905	
	TOTAL	341609	29815			100	

2. การคำนวณปริมาณไนโตรเจน

กากถั่วเหลือง (กรัม)	ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริก 0.1013 M			ไนโตรเจน (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย	
0.25	14.15	14.20	14.175	8.041

ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับ = {(A-B) x N x1.4 }/ ปริมาตรตัวอย่าง

เมื่อ A : ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก (มิลลิลิตร) ที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง
B : ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริก (มิลลิลิตร) ที่ใช้ในการไทเทรตกับแบลงค์
N : ความเข้มข้น (นอร์มอล) ของกรดไฮโดรคลอริก

แทนที่ ร้อยละของไนโตรเจน = (1.4 x 14.175 x 0.1013) / 0.25
= 8.041

ดังนั้น ในกากถั่วเหลือง 1 กรัม มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 0.08041 กรัม ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 0.1 กรัมต่อลิตร ต้องใช้กากถั่วเหลือง 1.2436 กรัมต่อลิตร

ประวัติผู้เขียน

นางสาวรัตนา พิรกิตติวรกุล เกิดวันที่ 24 มิถุนายน พ.ศ. 2515 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2537 และเข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2538