การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

T033520

นายกิตติศักดิ์ แซ่จิว

นางสาวแคทลียา เสนีย์วงศ์ ณ อยุธยา

นายทัศนัย พินิจขจรเดช

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....33520

วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gibberellic Acid Production by Solid-State Fermentation Using *Gibberella fujikuroi*

Mr. Kittisak Saejew

Miss Cataleeya Seneewong Na Ayuthaya

Mr. Tadsanai Phinijkhajorndech

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

For the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut 's Institute of Technology Ladkrabang

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

โดย นายกิตติศักดิ์ แซ่จิว
นางสาวแคทลียา เสนีย์วงศ์ ณ อยุธยา
นายทัศนัย พินิจขจรเดช

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ
(รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

---------- กรรมการ
(ผศ. อรไท สุขเจริญ)

---------- กรรมการ
(อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

โดย นายกิตติศักดิ์ แซ่จิว

นางสาวแคทลียา เสนีย์วงศ์ ณ อยุธยา

นายทัศนัย พินิจขจรเดช

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อรไท สุขเจริญ

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

ศึกษาแนวทางการนำรำข้าว กากปาล์ม และกากมะพร้าวมาผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกคือ อาหารที่มีสัดส่วนระหว่างรำข้าวกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 40 ต่อ 60 ความชื้นและพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์และ 4 ตามลำดับ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงระหว่าง 28 – 35 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้ 2.52 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง หลังจากการเลี้ยง 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Tittle : Gibberellic Acid Production by Solid-State Fermentation Using *Gibberella fujikuroi*

Name : Mr. Kittisak Saejew
Miss Cataleeya Seneewong Na Ayuthaya
Mr. Tadsanai Phinijkhajorndech

Department : Applied Biology

Special Project Advisor : Assistant Professor Oratai Sukcharoen

Academic Year : 1998

Abstract

Gibberellic acid (GA_3) production in solid-state fermentation system by ***Gibberella fujikuroi*** using rice bran , palm kernel and coconut kernel were compared . The result showed that rice bran and cassava flour in a proportion of 40 : 60 was the best medium for GA_3 production . The optimal initial moisture content and pH were 70 % and 4 , respectively . The temperature of cultivation was 28 – 35 °C . These conditions caused a production of 2.52 mg of GA_3 per g of dry solid medium was obtained at 7 days of solid-state cultivation .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตและสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ได้ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาและให้คำแนะนำในด้านต่างๆ ในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และ อ. มงคล เพ็ญสายใจ กรรมการสอบโครงงานพิเศษ และได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาด้วย รวมทั้งคุณพยอม เกียรติกำจร คุณวิทยา เขียวเขิน คุณประเสริฐวิทย์ แพงคำ เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับทำการทดลอง

สุดท้ายคณะผู้จัดทำขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ให้ยืมอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งเพื่อนๆ นักศึกษาที่ช่วยเหลือในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	22
บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	30
ภาคผนวก	31
เอกสารอ้างอิง	35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษาและควบคุมการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***	10
ตารางที่ 2	แสดงค่า R_f ของจิบเบอเรลลินจากเชื้อรา	11
ตารางที่ 3	แสดงตัวอย่างของกระบวนการหมักในอาหารแข็ง	14
ตารางที่ 4	แสดงคุณสมบัติต่างๆ ของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
รูปที่ 1	แสดงโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน	4
รูปที่ 2	แสดงโครงสร้างของ mevalonic acid และ ββ - dimethyllacrylic acid	5
รูปที่ 3	แสดงชีวสังเคราะห์ของกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***	8
รูปที่ 4	แสดงชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	23
รูปที่ 5	แสดงสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่มีในวัตถุดิบต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	24
รูปที่ 6	แสดงผลของปริมาณความชื้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง	25
รูปที่ 7	แสดงผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง	26
รูปที่ 8	แสดงผลของระดับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง	28
รูปที่ 9	แสดงผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง	29
รูปที่ 10	แสดงกราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาล	32
รูปที่ 11	แสดงกราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิก	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยนั้นเป็นประเทศเกษตรกรรม ในแต่ละปีนั้นจะมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ เช่น ฟางข้าว รำข้าว กากปาล์ม กากมะพร้าวและอื่นๆ เหลืออยู่มากมาย ดังนั้นการหาแนวทางในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้กลับมาใช้ใหม่จึงมีความจำเป็นอย่างมากในเศรษฐกิจของประเทศไทย

ปัจจุบันการแสดงแนวทางการอนุรักษ์การใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างประหยัดและให้คุ้มค่าที่สุดเกิดขึ้นอย่างมากมาย เนื่องจากประชากรในโลกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นพร้อมๆ กับความต้องการปัจจัยต่างๆ ที่มากขึ้นด้วย ในขณะที่วัตถุดิบส่วนใหญ่มาจากทรัพยากรธรรมชาติซึ่งมีอัตราการเพิ่มที่เกิดขึ้นช้ากว่าอัตราการเพิ่มของประชากร ดังนั้นกระแสการนำวัสดุที่เหลือใช้กลับมาใช้ใหม่เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดและคุ้มค่ากับการลงทุนจึงมีมากขึ้นในทุกขณะ ทั้งนี้เพื่อเป็นการรักษาทรัพยากรธรรมชาติให้คงอยู่อันจะนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ ต่อไป

แนวทางการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลับมาใช้ใหม่นี้มีได้หลายทางด้วยกัน เช่น การใช้เป็นอาหารสัตว์ ใช้ในงานก่อสร้าง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการหาแนวทางในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเช่น รำข้าว กากปาล์ม และกากมะพร้าวมาแปรเปลี่ยนเป็นสารอื่นที่มีราคาและประโยชน์ในด้านอื่นๆ โดยจะศึกษาถึงแนวทางในการนำมาเป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักในอาหารแข็งเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

กรดจิบเบอเรลลิก (Gibberellic acid) หรือจิบเบอเรลลินเอ 3 (Gibberellin A_3) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ซับซ้อนผลิตโดยพืช เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญคือเป็นฮอร์โมนพืช เมื่อใส่สารประกอบนี้ลงในพืชจะช่วยให้พืชเจริญทั้งทางขยายใหญ่และการแบ่งเซลล์รวมทั้งการขยายของปล้องตามลำต้น กระตุ้นการงอกของเมล็ด และเร่งการเกิดดอก ใช้ทำองุ่นไม่มีเมล็ดและยังใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ในทางการค้ากรดจิบเบอเรลลิกจะถูกผลิตโดยใช้กระบวนการหมักแบบ Submerge โดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างไยรา (Darken et al., 1959) (Sanchez – Marroquin , 1963) ในปัจจุบันนี้มีรายงานการทดลองเกี่ยวกับกระบวนการหมักในอาหารแข็งเพิ่มมากขึ้น (Kumer and Lonase , 1987) จึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ซึ่งข้อดีของการหมักในอาหารแข็งคือ ใช้พลังงานน้อย ผลิตผลที่ได้สูงและค่อนข้างคงที่ เมื่อพิจารณาในด้านสิ่งแวดล้อม การหมักในอาหารแข็งจะเกิดน้ำเสียน้อย และยังช่วยกำจัดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วย เช่น รำข้าว กากมะพร้าว กากปาล์ม เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักในอาหารแข็งก็คือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ ซึ่งมีอยู่มากมายในประเทศไทย ทำให้หาได้ง่ายและมีราคาถูก เมื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยการหมักในอาหารแข็งจึงเป็นการลดต้นทุนการผลิตและยังเป็นการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์สูงสุดอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาถึงสภาวะบางอย่างได้แก่ ความชื้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิและพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***
2. ศึกษาถึงวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะจะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาถึงสภาวะบางอย่างได้แก่ ความชื้น ปริมาณเชื้อเริ่มต้น อุณหภูมิ พีเอชเริ่มต้นของอาหาร และชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การทดลองผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม
2. เป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด
3. ได้สภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

จิบเบอเรลลินเป็นฮอร์โมนพืชหรือสารกระตุ้นการเจริญของพืช (plant growth stimulators) ที่ส่งเสริมการเจริญของพืชโดยเพิ่มขนาดเซลล์ตามยาว และเพิ่มการแบ่งเซลล์ ในการนำจิบเบอเรลลินไปใช้ประโยชน์นั้นพบว่าจิบเบอเรลลินปริมาณเพียงเล็กน้อยจะสามารถทำให้เกิดการขยายของปล้องตามลำต้น เร่งการเจริญของเมล็ด เร่งการออกดอกได้ จึงนับว่าเป็นสารที่มีประโยชน์มากทางด้านการเกษตร ชนิดของจิบเบอเรลลินที่รู้จักกันดีคือกรดจิบเบอเรลลิกหรือจิบเบอเรลลินเอ 3 ชื่อนี้ได้จากชื่อของเชื้อราที่ผลิตสารนี้ได้เป็นครั้งแรก ปัจจุบันสารนี้ยังมีราคาแพงมากจึงนิยมใช้เฉพาะกับต้นไม้ที่ราคาแพง เช่น กล้วยไม้ ไม้ประดับ เป็นต้น เท่าที่ทราบจิบเบอเรลลิน A_1 A_3 A_4 และ A_7 แยกได้จากเชื้อราและพืชชั้นสูง ส่วนจิบเบอเรลลิน A_2 A_{9-15} และ A_{24-25} แยกได้จากเชื้อราเท่านั้น โดยโครงสร้างของจิบเบอเรลลินจะประกอบด้วยแกนที่เรียกว่า teracarbocyclicgibbane แสดงได้ดังรูปที่ 1 จิบเบอเรลลินชนิดที่ได้รับความสนใจกันมากและมีการผลิตเป็นการค้าแล้ว คือ กรดกรดจิบเบอเรลลิกหรือจิบเบอเรลลินเอ 3 (Gibberellin A_3) จิบเบอเรลลิน A_4 และ A_7 และส่วนผสมของจิบเบอเรลลิน A_4 และ A_7

การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง

จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์กรดจิบเบอเรลลิกที่ได้รับความสนใจในการผลิตเป็นการค้า คือ

Fusarium heterosporum

Fusarium moniliforme เชื้อนี้เป็น imperfect stage ของ ***Gibberella fujikuroi***

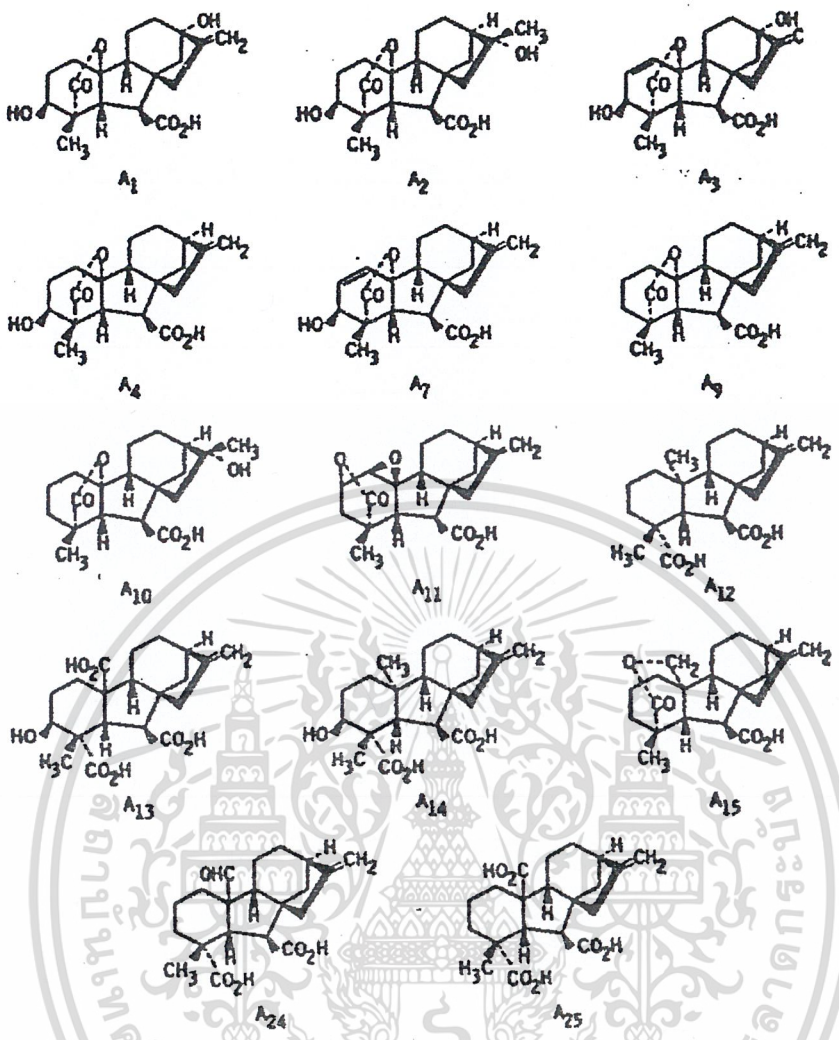
Fusarium oxysporum

Gibberella fujikuroi เป็นตัวที่ใช้ผลิตเป็นการค้า

Gibberella moniliformis

ในการปรับปรุงสายพันธุ์ของ ***Gibberella fujikuroi*** เพื่อเพิ่มการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกนั้นมักทำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยการใช้รังสี UV และ γ – ray เป็นต้น โดยสายพันธุ์ที่ผ่าเหล่าสามารถที่จะสร้างเส้นใยที่ไม่มีสปอร์ได้ การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** เป็นการค้านั้นสามารถทำได้ทั้งแบบ Surface culture และ Submerge culture ในกรณีของ Surface culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 โครงสร้างของจิบเบอเรลลิน

อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีแหล่งของคาร์บอนคือ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส หรือกลีเซอรอลแทนก็ได้ แหล่งของไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมไนเตรทหรือเปปโตน และมีเกลือแร่พวกฟอสเฟต แมกนีเซียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี แมงกานีส โมลิบดีนัม โดยลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกคือ อาหารที่มีการจำกัดปริมาณไนโตรเจน สำหรับสูตรอาหารที่ให้ผลดีของ Yalbut et al. (1939) ต้องประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นต่ำ (มักใช้กลีเซอรอล 1–3 เปอร์เซ็นต์) แอมโมเนียมคลอไรด์ (0.3 เปอร์เซ็นต์) และโพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต (0.3 เปอร์เซ็นต์) และใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอลิกปรับพีเอชให้มีค่าเท่ากับ 3 – 4 หลังจากเลี้ยงไว้ประมาณ 30 – 40 วัน จะได้กรดจิบเบอเรลลิก 60 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ถ้าใช้อาหารของ Raulin – Thom ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสหรือซูโครส 2.5 เปอร์เซ็นต์

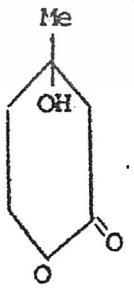
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.0 จะผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 15 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส

ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยใช้ Shake culture พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลีเซอรอล 2.0 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ แลคโตส 2 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้ 880 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลาประมาณ 170 – 200 ชั่วโมง ที่ 28 องศาเซลเซียส

การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้มีการปรับปรุงนำเอาถังหมักมาใช้ พร้อมกับมีการหมุนเวียนของอากาศ ในประเทศอังกฤษ ICI British Patent ได้ศึกษาไว้อย่างมากตั้งแต่ปี 1954 มาเรื่อยๆ ซึ่งในสิทธิบัตรได้กล่าวไว้ว่า สูตรอาหารประกอบด้วยคาร์บอน (2–30 เปอร์เซ็นต์) ไนโตรเจน (0.01 – 0.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ 0.08 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนที่เหมาะที่สุด) แมกนีเซียมซัลเฟต (0.05 เปอร์เซ็นต์) โพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต (0.05 - 0.5 เปอร์เซ็นต์) และแร่ธาตุ แมกนีเซียม เหล็ก ทองแดง สังกะสี แมงกานีส โมลิบดีนัม ในปริมาณ 1 – 10 พีพีเอ็ม และปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 3.5 – 4.5 ซึ่งกรดจิบเบอเรลลิกจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณคาร์บอนที่เพิ่มขึ้นและปริมาณไนโตรเจนที่เป็นสารอาหารที่ถูกจำกัด

นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงกระบวนการหมักได้หลายวิธีเพื่อให้ได้กรดจิบเบอเรลลิกในปริมาณสูง เช่น การเติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผสมลงไปในอากาศที่ใช้โดยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผสมลงไปนั้นไม่ควรมีปริมาณเกินร้อยละ 10 ของปริมาณอากาศที่ใช้ หรือการปรับปรุงกระบวนการหมักเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกเลี้ยงเพื่อให้มีการเจริญของเชื้อรา ส่วนขั้นตอนที่สองจะเป็นการควบคุมปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในบางครั้งอาจจะมีการเติมสารตัวกลางประเภทเทอร์พีนอยด์ เช่น กรดเมวาโลนิก แลคโตนหรือกรดไดเมธิลอะคลิลิก เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก



mevalenic acid lactone

$Me_2C = CH.CO_2H$

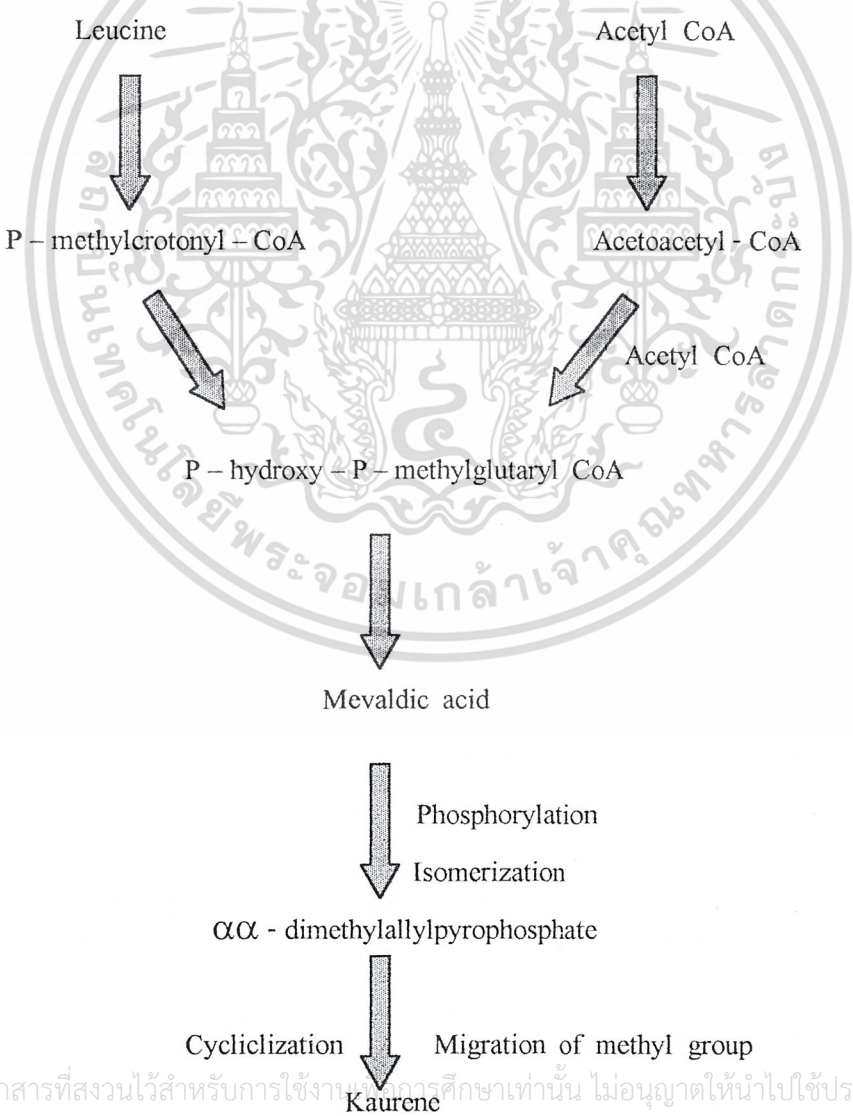
ββ - dimethylacrylic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

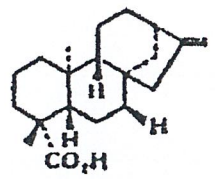
รูปที่ 2 โครงสร้างของ mevalonic acid และ ββ- dimethyllacrylic acid

ชีวสังเคราะห์ของกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

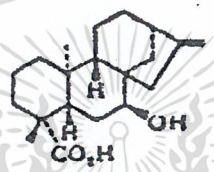
กระบวนการสังเคราะห์กรดจิบเบอเรลลิกค่อนข้างจะสลับซับซ้อน เพราะเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่เป็นทั้งวงแหวนเบนซีนและวงแหวนเฟอฟูรัล อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์กรดจิบเบอเรลลิกจะเริ่มต้นจากโครงสร้างของ Acetate คือ Acetyl – CoA สองโมเลกุล จะรวมกัน (Condense) ได้ Acetoacetyl – CoA และทำปฏิกิริยากับ Acetyl – CoA โมเลกุลที่สามทำให้เกิด P – hydroxy – P – methylglutaryl – CoA ซึ่งเมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นต่อ จะได้กรดเมวาดิค (mevaldic acid) นอกจากนี้อาจจะได้จาก Leucine โดยผ่าน P – methylcrotonyl – CoA และเกิด Carboxylation ต่อ และหลังจากเกิด Phosphorylation และ Isomerization ก็จะเกิดการเติม αα - dimeyhylallypyrophosphate จากนั้นจะเกิด Cycliclization และการเติม Cation ทำให้เกิดการเปลี่ยนตำแหน่งของ Methyl group ในที่สุดเกิดได้ Kaurene และแปรเปลี่ยนเป็นกรดจิบเบอเรลลิกดังแสดงในรูปที่ 3



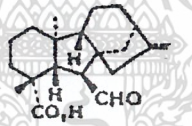
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



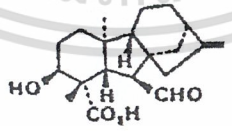
ent – Kaurenoic acid



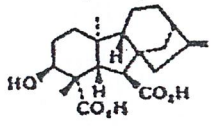
ent - 7α - Hydroxykaurenoic acid



GA_{12} Aldehyde

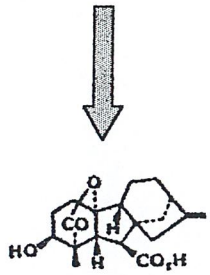


GA_{14} Aldehyde

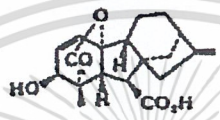


GA_{14}

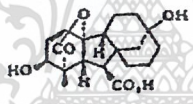
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



GA_4



GA_7



Gibberellic acid (GA_3)

รูปที่ 3 ชีวสังเคราะห์ของกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

โดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรดจิบเบอเรลลิกของเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** มี 6 ขั้นตอนตั้งแต่เริ่มเลี้ยงจนผลิตกรดจิบเบอเรลลิกออกมา ดังนี้

1. Lag phase

อาหารที่ใช้เลี้ยงคือแอมโมเนียมอะซีเตตเริ่มต้นด้วยกลูโคสปริมาณสูง (มากกว่า 30 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Balance phase

เป็นระยะเทียบเท่ากับช่วงต้นถึงช่วงกลาง Log phase เป็นขั้นตอนที่เชื้อราเจริญอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีอาหารครบทุกชนิด การเพิ่มขึ้นของเส้นใยจะเป็นสัดส่วนกับสารอาหารที่ใช้คือ กลูโคส ไนโตรเจน ฟอสเฟต แมกนีเซียม และโพแทสเซียม รูปร่างของเส้นใยจะคงที่เช่นเดียวกับส่วนประกอบของเส้นใยแห้ง ซึ่งมีไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 16 เปอร์เซ็นต์ และสารประกอบฟอสเฟต 13 เปอร์เซ็นต์ ช่วงนี้จะดำเนินการต่อไปจนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนหมด

3. Transition phase

ช่วงนี้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตของเส้นใยจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่อาหารที่มีแมกนีเซียมในปริมาณที่จำกัด ปริมาณไขมันที่มีในเส้นใยจะเพิ่มขึ้นด้วย ในกรณีนี้จะมีการใช้ฟอสเฟตที่สะสมไว้แทน

4. Storage phase

ระยะนี้เป็นระยะเทียบเท่ากับช่วงปลาย Log phase ซึ่งเชื้อจะใช้ไนโตรเจนหมด ในช่วงนี้มักมีการเติมกลูโคสลงไป ซึ่งจะทำให้ชีวมวลมีปริมาณเพิ่มขึ้นและทำให้มีปริมาณไขมันและคาร์โบไฮเดรตสูงสุดเป็น 45 และ 32 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ

5. Maintenance phase

ระยะนี้เป็นระยะเทียบเท่ากับ Stationary phase กลูโคสที่เติมลงในช่วงของ Storage phase จะเริ่มถูกใช้หมดไป ในช่วงนี้ส่วนประกอบของเส้นใยยังคงที่อยู่ แต่ปริมาณของไขมันเริ่มถูกนำมาใช้

6. Terminal phase

ช่วงนี้ไขมันที่สะสมไว้ถูกใช้หมด เส้นใยจะแตกออก น้ำหนักแห้งของเส้นใยจะลดลงและส่วนประกอบของเส้นใยจะปะปนอยู่ในอาหาร

วิธีการวิเคราะห์ สกัดและทำให้บริสุทธิ์

การวิเคราะห์ตรวจสอบ (Detection) ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกทางชีวภาพหรือ Bioassay ตรวจสอบได้โดยการเติมกรดจิบเบอเรลลิกลงไปในเมล็ดพืชและศึกษาการงอกของเมล็ดพืช ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในสมัยก่อนๆ โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจสอบกรดจิบเบอเรลลิกได้ในปริมาณถึง 0.01 ไมโครกรัม และในข้าวโพดพันธุ์ผ่าเหล่าสามารถจะตรวจสอบได้ถึง 0.001 ไมโครกรัม แต่วิธีนี้ไม่สามารถนำมาตรวจสอบปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกในกระบวนการหมักได้เพราะเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ดังนั้นจึงนิยมวิธีการทางเคมีในการตรวจสอบอย่างเช่นวิธีการ Calorimetric method มีการใช้ Reagent พวก Folin วิธีนี้ถ้ามีสารอื่นปะปนจะต้องกำจัดออกและทำให้กรดจิบเบอเรลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บริสุทธิ์เสียก่อน มิฉะนั้นจะมีการรบกวนการอ่านผล นอกจากนี้ก็มีวิธีอื่นๆ อีกที่ใช้ตรวจสอบว่าสารนั้นเป็นกรดจิบเบอเรลลิกหรือไม่ ดูตารางที่ 1 ในการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ทำได้โดยการใช้โครมาโตกราฟฟี่ นิยมใช้ GLC (Gas Liquid Chromatography) TLC (Thin–Layer Chromatography) HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Paper Chromatography และ Column Chromatography

ตารางที่ 1 วิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษาและควบคุมการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของเชื้อ ***Gibberella fujikuroi***

IR methods	
Carbonyl – syretching – on extracts	Borrow et al., 1964a
Absorbance at 12.86 and 10.85 μ	Washburn et al., 1959
UV methods	
Conversion to gibberellic acid (measure at 25.4 mμ)	Holbrook et al., 1961
Fluorescence methods	
Cold H_2SO_4 on extracts in solvent	Kavanagh and Kuzel , 1958 , Theriault et al., 1961 , Borrow et al., 1964a
Gas chromatography	
As methyl esters	Ikekawa et al., 1963
As methyl and trimethylsilyl esters	Cavell et al., 1967
Paper chromatography	
$KMnO_4$ spray	Bird and Pugh , 1958
Thin–layer chromatography / UV fluorescence	
No pretreatment	Ikekawa et al., 1963 , Kagawa et al., 1963
After treatmint with H_2SO_4	Aseeva , 1963 , Ikekawa et al., 1963 , Kagawa et al., 1963
H_2SO_4 / methyl alcohol	Podojil and Sevcik , 1960
H_2SO_4 / ethyl alcohol	Cavell et al.,1967 , MacMillan and Suter , 1963
Tracer techniques	
Mass isotope dilution	Arison et al., 1958
Derivative labelling	Baumgartner et al., 1959
Tritialted derivatives	Baumgartner et al., 1963

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการตรวจโดยการใช้ Paper Chromatography และใช้ Solvent System สามารถแยกชนิดของกรดจิบเบอเรลลิกได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อใช้ระบบสารละลายที่ 1 กรดจิบเบอเรลลิกทุกชนิด (ยกเว้นจิบเบอเรลลินเอ 2) จะให้จุดสีเหลืองเมื่อใช้สารละลายของโพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ พ่นบนกระดาษตัวอย่างของ Chromatograph ส่วนจิบเบอเรลลินเอ 2 สามารถที่จะตรวจสอบได้โดยใช้สารที่พ่นคือ โบรโมฟีนอลบลู นอกจากนี้แล้วจุดของกรดจิบเบอเรลลิกและจิบเบอเรลลินเอ 7 ถ้าถูกพ่นด้วยกรดซัลฟูลิค และทำอุณหภูมิสูงขึ้น 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 – 3 นาที แล้วนำไปส่องดูด้วยแสงอุลตราไวโอเลท จะเห็นจุดจิบเบอเรลลินเรืองแสงได้ ส่วนจิบเบอเรลลินตัวอื่นๆ จะเห็นจุดเรืองแสงจางมาก

ตารางที่ 2 ค่า R_f ของกรดจิบเบอเรลลิกจากเชื้อรา

ระบบสารละลาย (Solvent system)	1[XX]	2[XX]	3[XXX]	4[XX]
กรดจิบเบอเรลลิก	0.31	0	0.48	0.40
จิบเบอเรลลิน	0.31	0	0.49	0.40
จิบเบอเรลลิน	0.32			
จิบเบอเรลลิน	0.58	0.74	0.72	0.57
จิบเบอเรลลิน	0.61		0.71	0.57
จิบเบอเรลลิน	0.73		0.78	

X ใช้กระดาษ Whatman No.1

XX วิธี Descending

XXX วิธี Descending

ระบบสารละลาย 1 = n – Butanol : 1.5 N Ammonium hydroxide (3 : 1)

ระบบสารละลาย 2 = Benzene : Acetic acid : Water (4 : 1 : 2)

ระบบสารละลาย 3 = Isopropanol : 7 N Ammonium hydroxide (5 : 1)

ระบบสารละลาย 4 = n – Butanol : t – Amyl alcohol : Acetone : Ammonium hydroxide : Water (5 : 5 : 5 : 2 : 3)

สำหรับการตรวจสอบโดยการใช้ Column Chromatography โดยใช้สารพวก Celite Charcoal–celite หรือ Silica–celite เมื่อนำกรดจิบเบอเรลลินมาเติมกรดซัลฟูลิคเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดจิบเบอเรลลิกจะให้สารละลายสีขาวแดง และเรืองแสงสีน้ำเงิน โดยอาศัยหลักการนี้จึงจะนำมาตรวจสอบ และหาค่าโดยใช้การวัดการเรืองแสง ส่วนจิบเบอเรลลินเอ 7 จะให้สีน้ำตาลอมส้ม

การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์

1. เริ่มแรกจะแยกกรดจิบเบอเรลลิกออกมาโดยผงถ่านดูดซับ ตามด้วยการชะล้างด้วยตัวทำละลาย (Solvent) โดยทั่วไปใช้อะซีโตนและทำในสภาพอากาศที่แห้ง (ความชื้น 20-30 เปอร์เซ็นต์) ถ้าในผงถ่านมีน้ำบ้างเล็กน้อยจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด

2. ใช้ Ion - Exchange Resin Process โดยวิธีนี้สารประกอบที่ไม่ใช่กรดจิบเบอเรลลิกจะถูกสกัดออกก่อนโดยใช้ Alkaline earth metal hydroxide ตามด้วยการใช้ Anionic resin แล้วชะล้างด้วยแอมโมเนียหรือสารละลายบัฟเฟอร์ของ Alkaline earth metal salt โดยวิธีนี้จะได้กรดจิบเบอเรลลิกที่บริสุทธิ์ 89 – 100 เปอร์เซ็นต์

3. ใช้ Ion – Exchange Process โดยใช้ Strongly basic resin เช่นในรูปคลอไรด์ของ Dowex 1-X2 และ Amberlite IRA 401 จะทำให้ได้กรดจิบเบอเรลลิกที่มีความบริสุทธิ์ 94 และ 98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อชะล้างด้วยเมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอลิก แต่ถ้าชะล้างด้วย เมทานอลที่ทำให้เป็นกรดด้วยกรดซัลฟูริก จะได้กรดจิบเบอเรลลิกที่มีความบริสุทธิ์ 87 – 93 เปอร์เซ็นต์

การหมักในอาหารแข็ง (Solid state fermentation) (ดุษณี , 2537)

การหมักในอาหารแข็งเป็นกระบวนการหมักที่ใช้อาหารแข็ง ซึ่งไม่มีน้ำอิสระเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ น้ำที่อยู่ในระบบการหมักแบบนี้จะอยู่ในสภาพความชื้นที่ถูกดูดซับอยู่กับอาหารแข็ง ซึ่งปฏิกิริยาของจุลินทรีย์จะหยุดชะงักลง ถ้าปริมาณความชื้นของอาหารมีประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ การหมักในอาหารแข็งนี้ไม่รวมถึงการหมักในอาหารเหลวที่มีของแข็งที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูงหรือการหมักของแข็งที่อยู่ในอาหารเหลว วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักแบบนี้ได้แก่ เมล็ดธัญพืช (เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และถั่วเหลือง) รำข้าวสาลี วัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส (เช่น ไม้ ฟางข้าว) รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร) วัตถุดิบเหล่านี้มีโมเลกุลใหญ่ไม่ละลายน้ำหรือละลายน้ำได้น้อย มีอยู่เป็นจำนวนมาก หาได้ง่าย มีราคาถูก และมีสารอาหารในปริมาณมาก

การใช้อาหารแข็งในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นกรรมวิธีที่เก่าแก่ที่สุด โดยจะพบกระบวนการหมักชนิดนี้ในแถบตะวันออกไกลเป็นเวลานานหลายร้อยปีในขณะที่กระบวนการนี้เพิ่งเริ่มมีไม่นานในแถบตะวันตก กระบวนการหมักที่ใช้อาหารแข็งได้แก่ การผลิตเทมเป้ ซีอิ้ว อองจอม (ontjom) เนยแข็ง การเพาะเห็ด การผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ การทำปุ๋ยหมักและการกำจัดน้ำเสีย (ตารางที่ 3) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถผลิตได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็ง แต่การใช้อาหารแข็งในกระบวนการผลิตมีข้อจำกัดเนื่องจากเสียค่าใช้จ่ายมากกว่าการผลิตโดยใช้อาหารเหลว

การหมักในอาหารแข็งส่วนใหญ่จะใช้กับเชื้อราที่สร้างใยรา ยีสต์บางชนิด แบคทีเรียบางชนิด เช่น พวก Actinomycetes เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในอาหารเหลวหรืออย่างน้อยอาหารนั้นจะต้องมีน้ำอยู่ในรูปอิสระ ด้วยเหตุนี้กระบวนการหมักของเชื้อแบคทีเรียทั่วๆ ไปจึงใช้อาหารเหลวหรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว ซึ่งต่างจากเชื้อราที่สามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็งที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เช่น ท่อนไม้ ราก ลำต้น ใบและเมล็ดของพืช และบริเวณที่แห้งของสัตว์ เช่น หนัง กระดูก และมูลสัตว์ที่มีความชื้นต่ำ ตัวอย่างเช่น ***Eurotium halophilicum*** จะเจริญได้บนข้าวสาลีที่มีความชื้นเพียง 13 – 14 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารแข็งแต่มีจุลินทรีย์เพียงบางชนิดเท่านั้นที่นำมาใช้ในการผลิตเพื่อเป็นการค้าตัวอย่างเช่น การหมักอาหารในแถบตะวันออกไกล จะใช้เชื้อราพวก ***Mucor*** , ***Rhizopus*** , ***Amylomyces*** , ***Aspergillus*** , ***Monascus*** และ ***Neurospora*** การผลิตเนยแข็งจะใช้เชื้อต่างๆ เป็นตัวให้กลิ่นรสในระหว่างการบ่มเนยแข็ง การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ให้ได้ปริมาณมากโดยการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสของเชื้อ ***Phanerochaete*** , ***Trichoderma*** และ ***Chaetomium*** และการผลิตเห็ดโดยเชื้อ ***Agaricus*** , ***Lentinus*** และ ***Bolbariella***

แบคทีเรียและยีสต์จะมีบทบาทสำคัญในการหมักโดยใช้อาหารแข็งบางชนิด เช่น ยีสต์พวก ***Saccharomyces*** , ***Saccharomycopsis*** และ ***Candida*** (***Torulopsis***) หรือแบคทีเรียพวก ***Pediococcus*** , ***Leuconostoc*** , ***Lactobacillus*** และ ***Bacillus*** เหล่านี้จะมีบทบาทสำคัญในการหมักอาหารต่างๆ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักในอาหารแข็งอาจเป็นจุลินทรีย์ 1 หรือ 2 ชนิด หรือหลายชนิดผสมกัน (Mixed culture) ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ การหมักในอาหารแข็งบางชนิดจะเจาะจงใช้จุลินทรีย์หลายชนิดผสมกันเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น การใช้เชื้อผสมของ ***Chaetomium cellulolyticum*** และ ***Candida lipolytica*** ในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์โดยใช้ฟางข้าวแทนการใช้เชื้อราตัวเดียวในการย่อยสลายฟางข้าว

เฮสเซลไทน์แบ่งการหมักในอาหารแข็งตามลักษณะของอาหารแข็งที่ใช้เป็น 2 ประเภท คือ

1. อาหารแข็งที่มีความชื้นต่ำจะนำมาใช้ในการหมักแบบไม่มีการกระเพื่อมให้อากาศ เช่น เทมเป้ และถั่วเน่า (natto) หรือมีการกวนเป็นครั้งคราว เช่น มิโส (miso) และซีอิ้ว หรือมีการกวนอย่างต่อเนื่อง เช่น อฟลาทอกซิน (aflatoxin)
2. ของแข็งที่เป็นสารแขวนลอย จะนำมาใช้ในการหมักโดยบรรจุในคอลัมน์ที่มีของเหลวไหลผ่าน เช่น การทำไวน์จากข้าว การทำเบียร์ Kaffir

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของกระบวนการหมักในอาหารแข็ง

ตัวอย่าง	วัตถุดิบ	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง
การผลิตเห็ด	ฟางข้าว มูลสัตว์ ไม้	*Agaricus bisporus*
		Lentinus edodes
		Volvariella volvaceae
ซีอิ้ว	ข้าวสาลีและถั่วเหลือง	*Aspergillus oryzae*
เทมเป้ (tempeh)	ถั่วเหลือง	*Rhizopus* sp.
อองจอม (ontjom)	กากถั่วลิสงที่สกัดน้ำมันออกแล้ว	*Neurospora sitophils*
เนยแข็ง	นม	*Penicillium roqueforti*
การชะล้างโลหะ	แร่กรดต่ำ	*Thiobacillus* sp.
กรดอินทรีย์	น้ำตาลทราย กากน้ำตาล	*Aspergillus niger*
เอนไซม์	รำข้าวสาลี อื่นๆ	*Aspergillus niger*
ปุ๋ยหมัก	อินทรีย์วัตถุต่างๆ	รา แบคทีเรีย Actinomycetes
การกำจัดของเสีย	ส่วนประกอบต่างๆ ของของเสีย	แบคทีเรีย รา และโปรโตซัว

ข้อดีและข้อเสียของกระบวนการหมักในอาหารแข็ง (ดุษณี , 2537)

เมื่อเปรียบเทียบการหมักในอาหารแข็งและอาหารเหลว เฮสเซลไทน์ได้เสนอแนะข้อดีข้อเสียของกระบวนการหมักในอาหารแข็งไว้ ดังนี้

ข้อดีของการหมักในอาหารแข็ง

1. อาหารแข็งส่วนใหญ่จะต้องเติมเพียงน้ำลงไปเท่านั้น แต่อาจมีการเติมสารอาหารอื่นๆ ลงไปด้วยก็ได้
2. ปริมาตรของถังหมักที่ใช้มีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตผลที่ได้จากกระบวนการ เนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อย และมีสารอาหารอยู่ในปริมาณเข้มข้น
3. การเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อในถังหมัก (seed tank) ไม่มีความจำเป็น โดยสามารถใช้ปริมาณของเชื้อเริ่มต้นในรูปของสปอร์ได้
4. อาหารแข็งมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นต่ำช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สภาพแวดล้อมของการเจริญของเชื้อราในอาหารแข็งค่อนข้างคล้ายคลึงกับสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ
6. การเขย่าอาหารแข็ง จะช่วยยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เชื้อราจะเจริญในรูปของใยรา ซึ่งเป็นการลดการเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อราในห้องปฏิบัติการ
7. อากาศสามารถแพร่ไประหว่างช่องว่างของอนุภาคอาหารและอนุภาคจุลินทรีย์ได้อย่างสะดวก
8. ผลิตผลที่ได้จากระบวนการหมักอาจมากกว่าผลิตผลที่ได้จากการหมักในอาหารเหลวและผลิตผลที่ได้ค่อนข้างคงที่
9. ผลิตผลที่ได้จากกระบวนการหมักสามารถนำมาสกัดออกจากอาหารแข็งได้ทันที โดยการเติมสารละลายลงไป หรืออาจนำมาเก็บแช่แข็งไว้ก่อนที่จะนำมาสกัด
10. ผลิตผลที่ได้สามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องแยกออกจากอาหารแข็งก่อน

ข้อเสียของการหมักในอาหารแข็ง

1. การเขย่าหรือการกวนอาหารแข็งตลอดเวลาการหมักต้องอาศัยพลังงานสูง
2. การเติมน้ำลงไปในอาหารแข็งในช่วงแรกของการหมัก อาจมีผลทำให้เกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้
3. ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์ที่ใช้อาจต้องมีปริมาณมาก ดังนั้นต้องมีกรรมวิธีการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณสปอร์ และการเก็บเกี่ยวสปอร์ต้องใช้เทคนิคที่ปราศจากเชื้อ
4. วัตถุดิบทางการเกษตรที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจต้องนำมาผ่านกรรมวิธีอื่นๆ ก่อนการใช้ เช่น นำมาทำให้แตก
5. อาจต้องมีการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อให้แน่ใจว่าผลิตผลที่ต้องการในปริมาณมากมีความเป็นไปได้สูง

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

จากกระบวนการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกพบว่าในปี 1926 Kurosawa ได้พบว่าสารที่กรองได้จากการเพาะเลี้ยง ***Fusarium moniliforme*** สามารทำให้ข้าวยืดยาวได้ จากนั้นประสบความสำเร็จในการแยกผลึกของแข็งที่เรียกว่า จิบเบอเรลลินออกมาเป็น 2 รูปแบบคือ A และ B ต่อมา Stodela และคณะได้พบว่ากรดจิบเบอเรลลิกเป็นส่วนประกอบที่ได้จากการแยกผลึกของแข็งเหล่านั้น Darken (1959) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย น้ำสกัดจากข้าวโพด แอมโมเนียมซัลเฟต , โพแทสเซียมฟอสเฟต ในสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่ำ (กลีเซอรอล) และมีการเติมแลคโตสในระหว่างการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองดังกล่าวสามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 805 – 880 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 – 8 ของการหมัก ต่อมาในปี 1963 ได้มีการศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในอาหารที่มีกลูโคสโดยใช้กระบวนการผลิตแบบชีวภาพโดย A. sanchez – Marroquin (1963) ได้ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลิกจากสารตั้งต้นต่างๆ กันโดยใช้เชื้อ ***Fusarium*** 43 สายพันธุ์ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเชื้อ ***Fusarium moniliforme*** สายพันธุ์ ICC – 3326 มีศักยภาพสูงสุดในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยใช้สารตั้งต้นในปริมาณที่ทำให้ได้ผลิตผลสูงสุด เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 2.6 กรัม โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม และน้ำ 1000 มิลลิลิตร สามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้สูงสุด 1,196 มิลลิกรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์ และ 997 มิลลิกรัมต่อลิตรในระดับถังหมักขนาดเล็ก นอกจากนี้ในปี 1976 Moddose I.S. และ Richert S.H. ได้ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยใช้เชื้อ ***Fusarium moniliforme*** ในหางนมที่ผ่านกระบวนการกรองเอาเคซีนออกไป พบว่าสามารถผลิตกรดจิบเบอรลลิกได้สูงสุด 750 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากระยะเวลาการหมัก 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อรา ***Gibberella fujikuroi***

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์ ได้แก่

1. ฟลาสก์ก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. บีกเกอร์
4. ไมโครปิเปต (Micropipette)
5. ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop) ตะเกียงแอลกอฮอล์และเข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
6. ช้อนตักสาร
7. กรวยแก้ว
8. ขวดแก้วทรงแบน
9. หลอดหยด
10. บิวเรต (Burettes)
11. Digestion tube
12. Kjeldahl flask
13. เตาย่อย (Digester)
14. เครื่องกลั่น (Kjeltec 1026 Distilling Unit)
15. หม้อสแตนเลส
16. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
17. กล้องจุลทรรศน์
18. Haemacytometer
19. Spectrophotometer DR/4000 Procedures Manual (Hach)
20. Centrifuge (Hettich Universal) D-7200 Tutting
21. pH meter (TOA) (ORION)
22. Incubator TYPE B60 (Memert 854 Schwabach)
23. Hot Air Oven TYPE UL50 (Memert 854 Schwabach)
24. Hot Air Oven 1350 FD (SHEL – LAB)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25. Incubator Shader VSL (Vindon Scientific Ltd.)
26. Ultrasonic Cleaner Model. 2800 HT (TRU – SWEEP)
27. Larminar Air Flow FASTER BIO 48
28. เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography)
29. เครื่องชั่ง (Balancer)
30. เครื่องปั่น (Blender)

สารเคมี ได้แก่

1. ทวีน-80 (Tween – 80) 0.01 เปอร์เซ็นต์
2. สารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (W/V)
3. กรดกำมะถันเข้มข้น
4. สารละลายกรดฟอสฟอริกที่มีพีเอช 3
5. เมทานอล
6. เอทิลอะซีเตต
7. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์
8. กรดบอริก
9. Methylred
10. Bromocresol green

3. การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อทำเป็น Stock เชื้อสำหรับใช้ในการทดลอง

เขี่ยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลาก (Streak) ลงบนอาหารเอียง Potato Dextrose Agar ในหลอดทดลองและขวดแก้วแบนเพื่อเพิ่มพื้นที่สัมผัสให้เชื้อรามากยิ่งขึ้น บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 14 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว จึงนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujikuroi* เพื่อเป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

หยดสารละลาย Tween 80 10 มิลลิลิตร ลงในเชื้อที่อยู่ในขวดแก้วแบนที่เตรียมจากข้อ 1.2 แล้วทำการเขย่า หลังจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อที่ได้ 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Plate ที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar แล้วใช้แท่งแก้วงอเขี่ยเชื้อ (Spread) ให้ทั่ว Plate บ่มเชื้อที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 14 วัน หลังจากเชื้อเจริญเต็มที่แล้วจึงนำไปถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกหรือนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujikuroi* เพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 4 ชนิดคือ

1. รำข้าว
2. กากมะพร้าว
3. กากปาล์ม
4. แป้งมันสำปะหลัง

วิธีการเตรียม

นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 4 ชนิด มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเพื่อนำมาวิเคราะห์หาคุณสมบัติต่างๆ คือ

1. ความชื้น
2. ปริมาณน้ำตาล
3. ปริมาณไนโตรเจน

6. การเลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujikuroi* ในอาหารแข็งเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อลงในอาหารแข็งแล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน และเก็บตัวอย่างหลังจากการเลี้ยงที่วันที่ 5 6 7 และ 8 เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกเพื่อศึกษา

1. ชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก
2. สัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก
3. ความชื้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก
4. ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก
5. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก
6. พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. วิเคราะห์ผลการทดลอง

7.1 วิเคราะห์หาคุณสมบัติต่างๆ ของวัตถุดิบเริ่มต้น

7.1.1 ความชื้น

ทำการวัดตามวิธีของ A.O.A.C. (1984) ดังนี้

1. นำภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาไปอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักของภาชนะพร้อมฝา
2. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักแน่นอน (1.0 กรัม) ใส่ในภาชนะที่ชั่งน้ำหนักแล้ว เกลี่ยให้เนื้อกระจาย ปิดฝาและชั่งน้ำหนัก
3. นำไปอบในตู้อบโดยให้ฝาปิดไว้บางส่วน อบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบปิดฝาและนำไปใส่ในเดสิเคเตอร์จนเย็น ชั่งน้ำหนัก

7.1.2 ปริมาณน้ำตาล

ทำการวัดโดยใช้วิธี Phenol – Sulfuric Method (ตามภาคผนวก ก.)

7.1.3 ปริมาณไนโตรเจน

ทำการวัดโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยกรดบอริก (Boric Acid) (ตามภาคผนวก ก.)

7.2 วิเคราะห์ปริมาณของกรดจิบเบอเรลลิก

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม
2. นำตัวอย่างมาสกัดด้วยเอทิลอะซีเตต ปริมาณ 8 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่งโมง
3. นำชั้นของเอทิลอะซีเตตมา 3 มิลลิลิตร มาระเหยให้แห้ง
4. แล้วนำมาละลายด้วยเมทานอล 0.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟฟี (High Performance Liquid Chromatography) ที่มีคอลัมน์เป็น C_8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร สารละลายตัวพา (Mobile phase) เป็นสารละลายของเมทานอล ร้อยละ 25 ในสารละลายกรดฟอสฟอริกที่มีพีเอช เท่ากับ 3 อัตราการไหลของสารละลายตัวพา 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ภายหลังที่แยกผ่านคอลัมน์ด้วยเครื่องตรวจวัดการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolatdetector) ที่ความยาวคลื่น 208 นาโนเมตร ใช้ความไวของเครื่องตรวจวัดเท่ากับ 0.02 AUFS (Absorbance Unit Full Scale)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. สรุปผลการทดลอง

9. จัดทำรายงานการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของวัตถุดิบเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตกรดจิบบอเรลลิกโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

จากการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณน้ำตาลของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก 4 ชนิดคือ รำข้าว กากมะพร้าว กากปาล์ม และแป้งมันสำปะหลัง ตามวิธีในภาคผนวก ก. ผลการศึกษาแสดงได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณสมบัติต่างๆ ของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

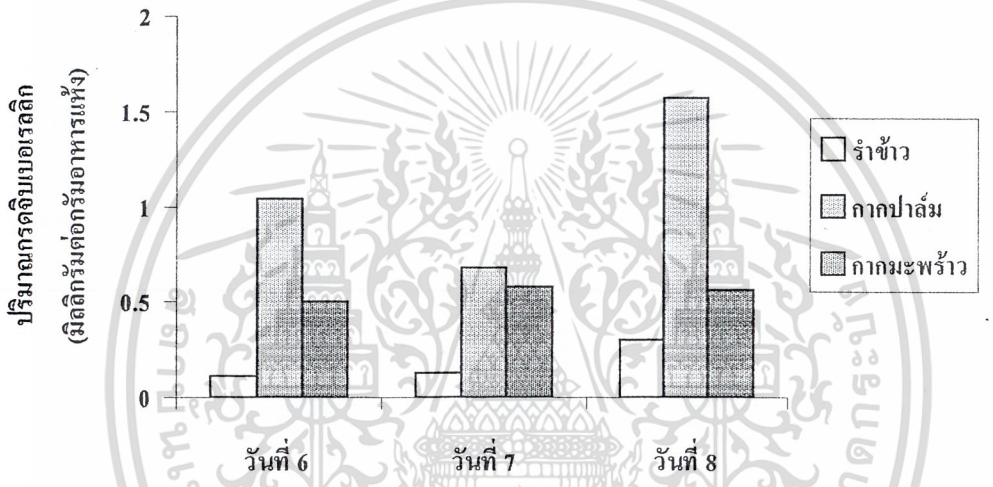
ชนิดวัตถุดิบ	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์ต่อกรัมอาหารแห้ง)	ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนต่อกรัมอาหารแห้ง)	ปริมาณน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์น้ำตาลต่อกรัมอาหารแห้ง)
รำข้าว	7.65	1.65	36.46
กากมะพร้าว	7.65	1.34	31.54
กากปาล์ม	4.13	1.10	33.23
แป้งมันสำปะหลัง	8.04	0.05	77.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาชนิดของวัตถุดิบและสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่ผสมในวัตถุดิบต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

ในการทดลองนี้ได้ศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 3 ชนิดคือ รำข้าว กากปาล์ม และกากมะพร้าวที่เหมาะสมจะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

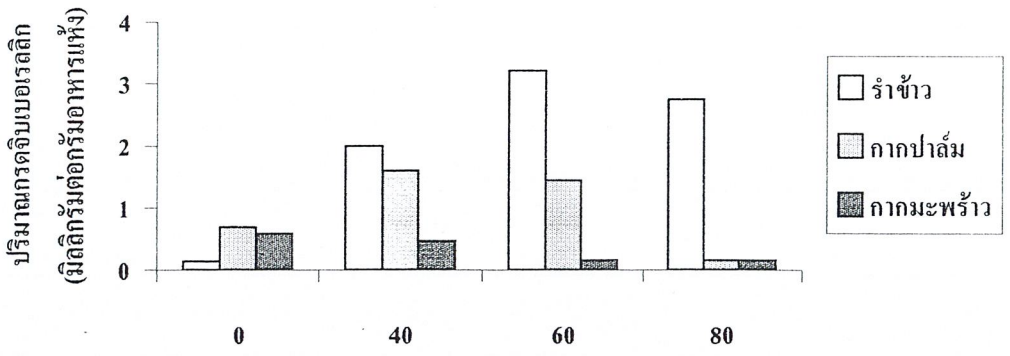
จากผลการศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 6 7 และ 8 ของการเพาะเลี้ยงแสดงได้ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

เมื่อศึกษาสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่มีในวัตถุดิบที่เป็นรำข้าว กากปาล์มและกากมะพร้าวในสัดส่วนต่างๆ คือ 0 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดยวัตถุดิบดังกล่าวจะมีการปรับให้มีความชื้นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์โดยใช้สารละลายธาตุอาหารตามภาคผนวก ก. หลังจากการหมัก 7 วันได้ผลดังแสดงในรูปที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 สัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่มีในวัตถุดิบต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่มีในวัตถุดิบมีผลต่อปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในวัตถุดิบที่เป็นรำข้าวมีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังเป็นร้อยละ 60 และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้คือ 3.21 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้รำข้าว 24.69 เท่า ส่วนสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในวัตถุดิบที่เป็นกากปาล์มมีสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังเป็นร้อยละ 40 และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้คือ 1.59 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้กากปาล์ม 2.34 เท่า ในขณะที่การเพิ่มสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังในวัตถุดิบที่เป็นกากมะพร้าวนั้นกลับมีแนวโน้มทำให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้มีปริมาณลดลง

จากผลการทดลองดังกล่าวจะพบว่าสัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังที่มีในรำข้าวในสัดส่วนร้อยละ 60 มีผลทำให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้เท่ากับ 3.21 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ซึ่งสูงกว่าการใช้สัดส่วนของแป้งมันสำปะหลังและชนิดของวัตถุอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

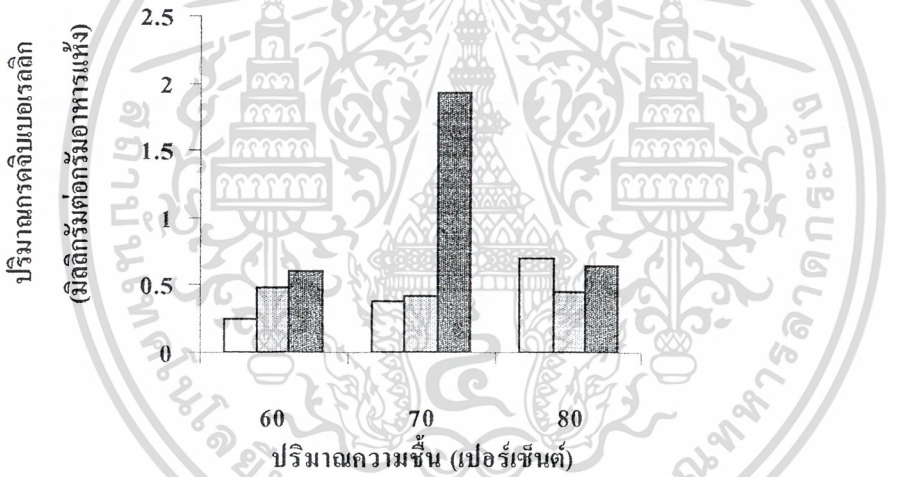
หมายเหตุ ผลที่ได้ แสดงผลหลังจากการหมักวันที่ 7 เนื่องจากที่วันอื่นผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาความชื้นเริ่มต้นของอาหารและปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

จากการศึกษาปริมาณความชื้นเริ่มต้นและปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนระหว่างรำข้าวกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 40 ต่อ 60 โดยการผันแปรระดับความชื้นเริ่มต้นในอาหารเป็น 3 ระดับคือ 60 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ และการผันแปรปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 3 ระดับ คือ 10^8 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลจากการศึกษาปริมาณความชื้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงแสดงได้ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ผลของปริมาณความชื้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

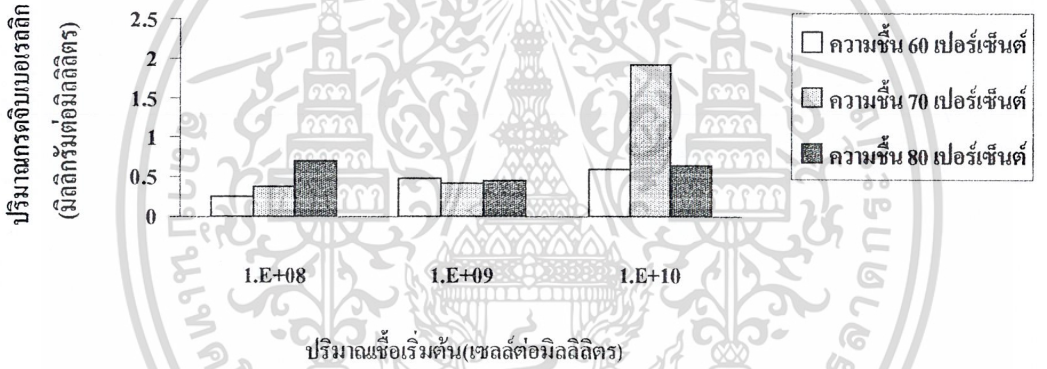
- ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
- ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาโดยให้ปริมาณความชื้นเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ และการผันแปรปริมาณเชื้อเป็น 10^8 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 0.25 0.48 และ 0.60 มิลลิกรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ และเมื่อศึกษาถึงปริมาณความชื้นเริ่มต้นในอาหารที่ระดับ 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยการผันแปรปริมาณเชื้อเป็น 10^8 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกัน พบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ที่ระดับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 0.38 0.42 และ 1.93 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ ส่วนที่ระดับความชื้นเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้เท่ากับ 0.7 0.45 และ 0.64 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงแสดงได้ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง
1.E+08 คือปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
1.E+09 คือปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
1.E+10 คือปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

จากผลการศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการผันแปรความชื้นเริ่มต้นในอาหารเป็น 60 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 0.25 0.38 และ 0.70 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ และเมื่อศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยผันแปร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณความชื้นเริ่มต้นในอาหารเป็น 60 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน พบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 0.48 0.42 และ 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ ส่วนที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ได้เท่ากับ 0.60 1.93 และ 0.64 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ

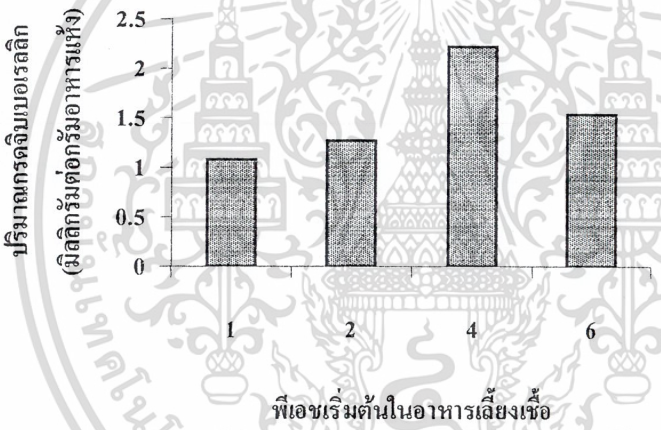
จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่าปริมาณความชื้นเริ่มต้นของอาหารและปริมาณเชื้อเริ่มต้นจะมีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก โดยปริมาณความชื้นของอาหารที่ระดับ 70 เปอร์เซ็นต์นั้น ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้จะมีปริมาณสูงกว่าที่ระดับความชื้น 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนปริมาณความชื้นของอาหารที่ระดับ 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ นั้นปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นนั้นพบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อจะมีแนวโน้มทำให้กรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้มีปริมาณสูงขึ้น โดยที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{6} และ 10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นั้นมีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้จะมีปริมาณสูงกว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{8} และ 10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาระดับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*

จากการศึกษาระดับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย ***Gibberella fujikuroi*** ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนระหว่างรำข้าวกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 40 ต่อ 60 ความชื้นในอาหารเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการผันแปรระดับพีเอชในอาหารเป็น 4 ระดับคือ 1 2 4 และ 6 และการผันแปรอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 3 ระดับ คือ 28 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ผลการศึกษาระดับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง แสดงได้ดังรูปที่ 8

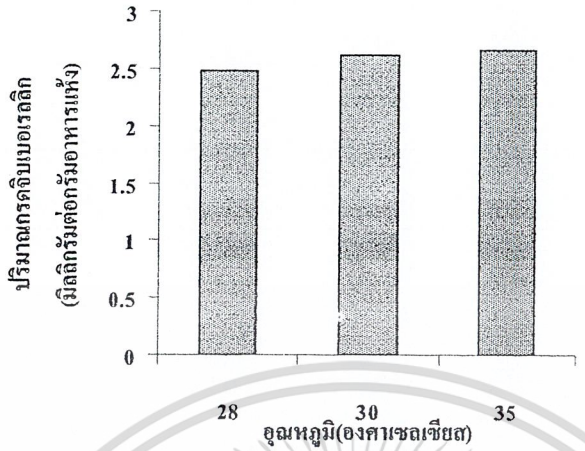


รูปที่ 8 ผลของระดับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาระดับพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยการผันแปรระดับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 ระดับคือ 1 2 4 และ 6 พบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้มีปริมาณเท่ากับ 1.08 1.27 2.22 และ 1.54 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ และที่ระดับพีเอชเท่ากับ 4 มีปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาระดับอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงแสดงได้ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาโดยการผันแปรอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็น 3 ระดับคือ 28 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้เท่ากับ 2.68 2.62 และ 2.67 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหารแห้ง ตามลำดับ

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่า ระดับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4 นั้นปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกจะมีปริมาณสูงกว่าที่พีเอช 1 2 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ส่วนอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 28 30 และ 35 นั้นไม่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

1. จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ รำข้าว กากปาล์มและกากมะพร้าว มาผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** พบว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ใช้ในการศึกษาทั้ง 3 ชนิด สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้
2. การใช้แป้งมันสำปะหลังผสมลงในวัตถุดิบเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกนั้นจะช่วยให้ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตได้มีปริมาณมากขึ้น
3. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ ***Gibberella fujikuroi*** นั้นคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนระหว่างรำข้าวกับแป้งมันสำปะหลังเป็น 40 ต่อ 60 พีเอชและปริมาณความชื้นเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 4 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงระหว่าง 25 – 35 องศาเซลเซียส

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาถึงวิธีการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้ ความบริสุทธิ์และรูปแบบในการนำผลผลิตเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์
2. ควรมีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาล ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก
3. ควรมีการศึกษาถึงผลของอัตราการให้อากาศโดยการผันแปรความเร็วรอบของการเขย่าที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

1. สารละลายธาตุอาหาร

ประกอบด้วย

1. Zinc sulphate heptahydrate	0.007 กรัม
2. Iron sulphate heptahydrate	0.007 กรัม
3. Copper sulphate	0.007 กรัม
4. Concentrated HCl	16.9 มิลลิลิตร
5. น้ำกลั่น	83.1 มิลลิลิตร

2. การวัดปริมาณ Total sugar ด้วย Phenol – sulphuric method

วิธีการนี้จะวัดน้ำตาลได้ประมาณ 1-100 ไมโครกรัม และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์หาปริมาณของ Total sugar อย่างไม่เฉพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูป Reducing sugar หรือ Neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็น Monosaccharide และ Polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้

วิธีการทดลอง

1. เติม Sample ที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วทำได้ครั้งละหลายตัวอย่าง ขณะเดียวกันก็ทำ Blank ด้วยการใช้น้ำ 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงใน Sample ในข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน
3. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 2 ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากัน
4. ตั้งทิ้งต่อไปอีก 20 นาที แล้วจึงวัด OD_{490}

การเตรียม Standard curve

1. ละลายน้ำตาลที่บริสุทธิ์ในน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) น้ำตาลที่ใช้เป็นน้ำตาลมาตรฐาน ควรเป็นน้ำตาลชนิด Monomer ซึ่งเป็นน้ำตาลชนิดเดียวกับที่ต้องการทราบปริมาณ เช่นควรใช้ Glucose หรือควรใช้ Xylose เป็นน้ำตาลมาตรฐานถ้าหากน้ำตาลที่ต้องการหาเป็นน้ำตาลที่เป็น Monomer หรือ Oligomer ของ Xylose
2. ทำให้น้ำตาลเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ เช่น 10 25 50 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

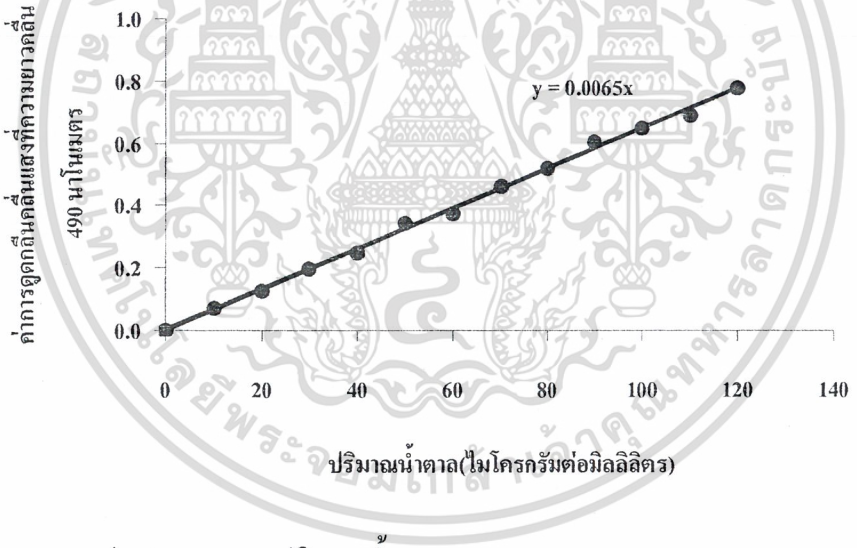
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำสารละลายน้ำตาลในข้อ 2 ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล โดยใช้วิธีการเดียวกับการวิเคราะห์น้ำตาลใน Samples และวัดหาค่า Absorbance ที่ความยาวคลื่น (Wavelength) 490 นาโนเมตร ตามวิธีที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

4. นำค่าที่ได้ไป Plot graph ระหว่างค่า OD (Optical Density) ที่วัดได้จากแต่ละหลอดกันค่าความเข้มข้นต่างๆ หรือปริมาณของน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ เส้นกราฟที่ได้จะใช้เป็นค่าเทียบมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นหรือปริมาณน้ำตาลใน Sample ต่อไป

อุปสรรคและแนวทางแก้ไข

ได้ค่าไม่แน่นอนบางครั้งมีค่า OD สูงเกินกว่าค่าที่ควรจะได้ อาจเกิดจากคุณภาพของฟีนอลที่ใช้ในการวิเคราะห์ครั้งนั้นไม่ดีพอ ควรใช้ฟีนอลชนิด Analytical grade หรืออาจทำการกลั่นใหม่และในการทดลองต้องระมัดระวังไม่ให้ถูกฟีนอลและกรดกำมะถัน เพราะมีฤทธิ์กัดกร่อนสูงมาก



รูปที่ 10 กราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาล

โดยมีความสัมพันธ์ $Y = 0.0065X$

โดยที่ Y = ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

X = ปริมาณน้ำตาล (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

3. วิธีการวิเคราะห์ไนโตรเจนโดยวิธี Boric acid

1. ชั่งตัวอย่าง 0.9 – 1.0 กรัม ใส่ลงในกระดาษกรอง (เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง) แล้วใส่ลงในหลอด Digestion

2. ใส่โพแทสเซียมซัลเฟตเท่ากับ 3.5 กรัมและคอปเปอร์ซัลเฟตเท่ากับ 0.4 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

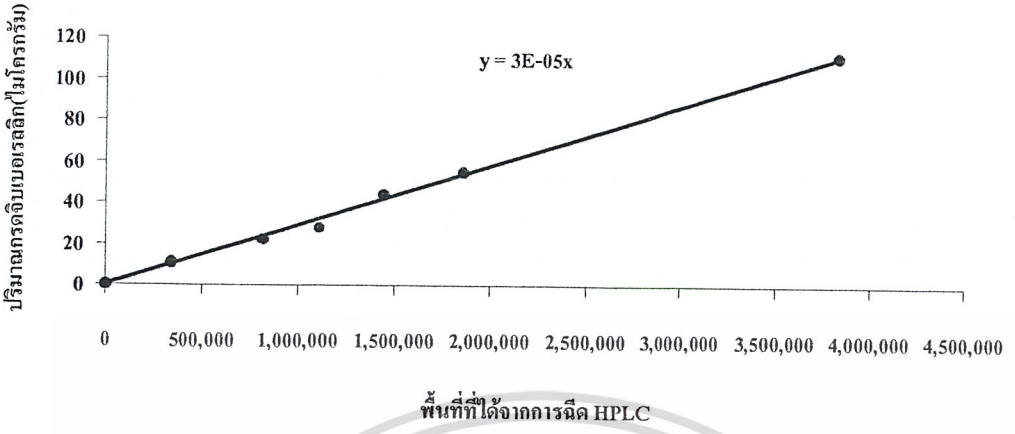
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ
4. นำหลอด Digestion วางลงใน Digestor ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 420 องศาเซลเซียส แล้วเปิด hood เพื่อช่วยในการดูดควัน
5. ย่อยเป็นเวลา 50 นาที จนได้สารละลายใสสีเขียวหรือสีฟ้า นำออกจาก Digestor ตั้งทิ้งไว้ใน hood เพื่อให้หมดควันเติมน้ำลงในหลอดพอประมาณ แล้วนำไปขึ้นเครื่องกลั่น
6. เปิดก๊อกน้ำเพื่อหล่อเย็นเครื่องควบแน่นและเปิด Power ของเครื่องกลั่น (Kjeltec)
7. กดปุ่ม Alkali เท่ากับ 2-3 ครั้ง จนแน่ในว่าในท่อด่างไม่มีฟองอากาศหลงเหลืออยู่
8. Warm เครื่องกลั่นใช้ฟลาสก์และหลอดเปล่า เปิด steam กลั่นเป็นเวลา 5 นาที
9. ปิด Steam นำหลอดและฟลาสก์ออกจากเครื่องกลั่น
10. Set Alkali เท่ากับ 2 Delay time เท่ากับ 0.2 Steam เท่ากับ 3.6
11. นำฟลาสก์ซึ่งมีกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปตั้งบน plate form ของเครื่องกลั่น กดปุ่ม Auto ยก plate form ขึ้นเพื่อให้หลอดจุ่มลงในสารละลาย ปิด Safety door เครื่องจะทำงานโดยมีน้ำกลั่นลงมา dilute สารตัวอย่างแล้วตามด้วย NaOH 40 เปอร์เซ็นต์ 2 Stroke (1 Stroke เท่ากับ 25 มิลลิลิตร) จากนั้น Steam จะทำงาน
12. เมื่อกลั่นเสร็จแล้วนำฟลาสก์และหลอดออกจากเครื่องกลั่นแล้วทำการกลั่นตัวอย่างใหม่ต่อไป
13. นำฟลาสก์ซึ่งมี distillate เป็นสารละลายสีเขียวไปไตเตรตกับ 0.2 N กรดไฮโดรคลอริกจนถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทา

การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{1.401 \times (\text{มิลลิลิตร HCl - blank}) \times \text{N HCl}}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิก



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิก

โดยมีความสัมพันธ์ $Y = 3 \times 10^{-5}X$

โดยที่ Y = ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ไมโครกรัม)

X = พื้นที่ใต้กราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ดวงพร คันธโชติ , จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ , 2530 , โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์ , พิมพ์ครั้งที่ 1 , หน้า 99 – 103 .

ดุษณี ธนะบริพัฒน์ , รศ. ดร. , จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม , 2537 , สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง , หน้า (3-16) – (3-22).

สมใจ ศิริโภค , เทคโนโลยีการหมัก , 2537 , ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ , หน้า 16 .

อรพิน ภูมิภมร , ดร. , จุลินทรีย์ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรม การเกษตร สิ่งแวดล้อม , 2526 , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , หน้า 180 – 187 .

A.O.A.C. 1984 . Official Method of Analysis of Association of Official Chemistry , 14th ed. Association of Official Analytical Chemists , Inc. , USA.

Bandelier , S. , Renaud , R. , and Durand , A. (1997) . Production of gibberellic acid by fed-batch solid-state fermentation in an aseptic pilot-scale reactor. Process. Biochemistry. 32(2) : 141 – 145 .

Cihangir, N., and Aksoza, N.(1995).Evaluation of some food industry wastes for production of gibberelic acid by fungal source . Enviromental Technology . 18 : 553 – 557.

Kumakura , M . , Lu , Z . –X . , and Xie , Z . –C . (1995) . Production of gibberellic acid in ***Gibberella fujikuroi*** adhered onto polymiric fibrous carriers . Process Biochemistry. 30 (7) : 661 – 665

Kumar , P . K . R . , and Losane , B . K . (1987) . Extraction of gibberellic acid from dry mouldy bran produced under solid – state fermentation . Process Biochemistry. 139–143.

Kumar , P . K . R . , and Losane , B . K . (1988) . Immobilized growing cell of ***Gibberella fujikuroi*** P – 3 for production of gibberellic acid and pigment in batch and semi – continuous cultures. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28 : 537 – 538

Kumar , P.K.R. , and Losane , B . K . (1986) . Gibberellic acid by solid – state fermentation : Consistent and improved yields . Biotechnology and Bioengineering . 30 : 267-271.

Kumar, P.K.R. , and Losane , B . K . (1988) . Batch and fed – batch solid-state fermentations : Kinetic of cell growth , hydrolytic enzyme production , and gibberellic acid production . Process Biochemistry . 43 – 47 .

Marjorie , A. , Darken , A. , Jensen , L. , and Shu , P. , (1959). Production of gibberellic acid by fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7 : 301 – 303.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sanchez–Marroquin , A. , (1963) . Microbiological production of gibberellec acid in glucose media . Appl. Microbiol. Biotechnol . 11 : 523 – 528 .

Tomasini , A. , Fajardo , C. , and Barrios – Gonzalez , J. , (1977) . Gibberellic acid production using different solid–state fermentation system . World Journal of Microbiology and Biotechnology. 13 : 203 – 206.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้