การหมักแบบเฟดแบตช์เพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก

นางสาวอภิรดี จันทร์ทอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6113-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FED-BATCH FERMENTATION FOR GIBBERELLIC ACID PRODUCTION

Misss Apiradee Chunthong

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6113-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหมักแบบเฟดแบตช์เพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก
โดย	นางสาวอภิรดี จันทร์ทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตฤศาสน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตฤศาสน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อภิรดี จันทร์ทอง : การหมักแบบเฟดแบตช์เพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (FED-BATCH FERMENTATION FOR GIBBERELLIC ACID PRODUCTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตอุศาสน์, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง, 94 หน้า.ISBN 974-17-6113-9

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกจากเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ จากการทดลองเบื้องต้นโดยใช้กระบวนการหมักแบบแบตช์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 1.68 กรัมต่อลิตรร่วมกับกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันออกแล้วปริมาณ 5.9 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร อลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวตลอดการทดลอง สามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้ 1,203.11 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่192 ส่วนการหมักแบบเฟดแบตช์โดยการควบคุมปริมาณน้ำตาลในถังหมักเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้ภาวะเช่นเดียวกับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกแบบแบตช์สามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้ 968.43 และ1,244.43 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 192 และ264 ตามลำดับ และเมื่อทำการควบคุมปริมาณน้ำตาลในถังหมักเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ร่วมกับควบคุมปริมาณไนโตรเจนในถังหมักเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรโดยการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ในระหว่างชั่วโมงที่ 168-216 เชื้อสามารถผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเพิ่มขึ้นเป็น 1,321.44 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่240 ดังนั้นการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการควบคุมปริมาณแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดจิบเบอเรลลิกได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....อภิรดี จันทร์ทอง.....

ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....วาสนา โตเลี้ยง.....

4372542023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : *Gibberella fujikuroi*/ GIBBERELLIC ACID / FED-BATCH FERMENTAION

APIRADEE CHUNTHONG : FED-BATCH FERMENTATION FOR GIBBERELLIC ACID PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSAS , Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. NALINE NILUBOL , Ph.D.,VASANA TOLIENG. 94 pp.
ISBN 974-17-6113-9

The purpose of this research was to optimize conditions of gibberellic acid (GA_3) production by *Gibberella fujikuroi* N9-34 using fed batch fermentation. In preliminary investigation using batch fermentation in a 5 l-fermentor, the result showed that the suitable compositions of medium for gibberellic acid production contained 100 g/l sucrose as carbon source, 1.68 g/l $(NH_4)_2SO_4$ and 5.9 g/l defatted soy bean meal as nitrogen source, 5 g/l KH_2PO_4, 1 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 0.1 g/l Al_2O_3 and 0.2% (v/v) soybean oil. Process temperature, aeration rate and initial agitation speed were controlled at 25°C, 1 vvm and 600 rpm, respectively. After 24 hrs, the agitation speed was automatically maintained to control dissolved oxygen at 20% of saturated dissolved oxygen throughout the period of fermentation. Under these conditions, the amount of GA_3 produced was 1,203.11 mg/l at 192 hrs. For fed-batch fermentation, the total sugar content was maintained at 40 g/l, with the same condition as batch fermentation, 968.43 and 1,244.43 mg/l of GA_3 were obtained at 192 and 264 hrs, respectively. When controlling the amount of total sugar in the fermentor at 40 g/l and nitrogen at 0.05 g/l between the period of 168-216 hrs by adding $(NH_4)_2SO_4$, the amount of GA_3 was increased to 1,321.44 mg/l at 240 hrs. Therefore, the fed-batch fermentation with a proper controlled level of carbon source and nitrogen source can increase the production of GA_3.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study.....Biotechnology.....

Academic year.....2004.....

Student's signature.....

Adviser's signature.....

Co-advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และอาจารย์วาสนา โตเลี้ยง ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ซึ่งดิฉันขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้อย่างสูงยิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความสะดวกในด้าน อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของดิฉันที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญ สำหรับการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ เทคโนโลยีชีวภาพทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือด้วยดีมาตลอด ขอขอบคุณ คุณวรวิทย์ คุณนัยนา คุณเรณินทร์ คุณอัจฉรา คุณวนิดา คุณพงษ์ศักดิ์ คุณไพบูลย์ ที่คอยให้คำปรึกษาและให้กำลังใจตลอดมา สุดท้ายขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆน้องๆที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ความดีของการศึกษา และคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ ข้าพเจ้าขออุทิศแด่ บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ณ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 ชนิดและโครงสร้างของจิบเบอเรลลิน..... 2

1.3 คุณสมบัติของกรดจิบเบอเรลลิก..... 3

1.4 การสังเคราะห์จิบเบอเรลลิน (Biosynthesis pathway)..... 4

1.4.1 การสังเคราะห์ไอโซเพนทีนิล ไพโรฟอสเฟต (Isopentenyl pyrophosphate ,IPP)..... 4

1.4.2 การสังเคราะห์เทอร์พีน และเทอร์พีนอยด์ (Terpene and terpenoid biosynthesis)..... 5

1.4.3 การสังเคราะห์เอนท์-คอรีน (Ent – kaurene biosynthesis)..... 5

1.4.4 การสังเคราะห์ GA_{12} แอลดีไฮด์ (GA_{12}-aldehyde biosynthesis) 7

1.5 การผลิตจิบเบอเรลลิน..... 8

1.5.1 การสกัดจากพืช..... 8

1.5.2 การสังเคราะห์ทางเคมี..... 8

1.5.3 การหมักด้วยจุลินทรีย์..... 8

1.6 กระบวนการหมักเพื่อผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อจุลินทรีย์..... 8

1.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก..... 9

1.7.1 หัวเชื้อสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก..... 9

1.7.2 ปัจจัยของสารอาหาร..... 10

1.7.2.1 สารแหล่งคาร์บอน..... 10

1.7.2.2 สารแหล่งไนโตรเจน..... 11

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	1.7.3 ปัจจัยทางกายภาพ	11
	1.7.3.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง	12
	1.7.3.2 อุณหภูมิ	12
	1.7.3.3 อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวน	12
	1.8 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยใช้กระบวนการแบบเฟดแบตช์ (fed-batch fermentation)	13
	1.9 ประโยชน์ของจิบเบอเรลลิน	14
	1.10 มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย	14
2	อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย	
	2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	15
	2.1.1 อุปกรณ์การทดลอง	15
	2.2.2 สารเคมี	16
	2.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	17
	2.3 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	17
	2.4 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย	17
	2.4.1 การเตรียมสปอร์	17
	2.4.2 การเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร	18
	2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	18
	2.4.3.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับขวดเขย่า	18
	2.4.3.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร	18
	2.5 วิธีการทดลอง	18
	2.5.1 ศึกษาปัจจัยของสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับขวดเขย่า	18
	2.5.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบแบตช์	19
	2.5.2.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	19

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	2.5.2.2 ศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก	19
	2.5.3 ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์	20
	2.5.3.1 ศึกษาผลของระดับน้ำตาลที่ควบคุมในระหว่างการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์	20
	2.5.3.2 ศึกษาการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อทำการควบคุมระดับน้ำตาล และเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนลงไปในระหว่างการหมักในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์	20
	2.6 วิธีการวิเคราะห์	20
	2.6.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง	20
	2.6.2 การหาค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมัก	20
	2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ภายหลังการหมัก (total sugar) โดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส	21
	2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	21
	2.6.5 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก โดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC)	22
3	ผลการทดลองและวิจารณ์	
	3.1 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในระดับขวดเขย่า	23
	3.1.1 การเจริญของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในอาหารเตรียมหัวเชื้อ	23
	3.1.2 ผลของปริมาณของซูโครส และปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย *Gibberella fujikuroi* N9-34	24
	3.2 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดย *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบแบตช์	38
	3.2.1 ผลของอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร	38
	3.2.2 ผลของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีแปรปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักแตกต่างกันในถังหมักขนาด 5 ลิตร	50

สารบัญ(ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.3 การผลิตกรดจิบเบอเรลลิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์	58
	3.3.1 ผลของระดับน้ำตาลที่ควบคุมในระหว่างการหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 โดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์	58
	3.3.2 ผลของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อควบคุมระดับน้ำตาลในถังหมักและเติมสารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนในระหว่างเลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 โดยใช้กระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์	70
	3.3.3 การเปรียบเทียบการเจริญ และการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 โดยใช้กระบวนการหมักแบบแบตช์ แบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว และแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมสารอาหารแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนระหว่างการหมักในถังหมัก 5 ลิตร	76
4	สรุปและวิจารณ์ผลการทดลองผลการทดลอง	78
รายการอ้างอิง		81
ภาคผนวก		
	ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	86
	ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	88
	ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	90
	ภาคผนวก ง สูตรการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์	92
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์		94

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่าที่ช่วงเวลาเพาะเลี้ยงต่าง ๆ 23

3.2 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 25

3.3 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.31 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า 29

3.4 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.49 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า 31

3.5 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.68 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า 33

3.6 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.89 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า 35

3.7 เปรียบเทียบค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด และอัตราการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่แปรปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร และแปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.31, 1.49, 1.68 และ1.89 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า 37

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.8 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 71 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 40

3.9 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 71 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 41

3.10 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 81 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 43

3.11 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 81 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 44

3.12 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 88 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 46

3.13 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 47

3.14 เปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 71 81และ 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.15 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน อัตราการกวนและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 51

3.16 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 52

3.17 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน อัตราการกวนและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm 54

3.18 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 55

3.19 เปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงเชื้อในภาวะที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก กับภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่ 20 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 57

3.20 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักที่ 40 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 60

3.21 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 61

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.22 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ โดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักที่ 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 63

3.23 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 64

3.24 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ โดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักที่ 60 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 66

3.25 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 67

3.26 เปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 40, 50, และ 60 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 70

3.27 ค่าพีเอชของน้ำหมัก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเมื่อเลี้ยงเชื้อ โดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน 0.05 กรัมต่อลิตรระหว่างการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.28 ค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน 0.05 กรัมต่อลิตรในระหว่างการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 73

3.29 เปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวกับแบบเฟดแบตช์ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 75

3.30 เปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดจิบเบอเรลลิกโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักแบบแบตช์และเฟดแบตช์ เมื่อเลี้ยงในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 vvm ในถังหมักขนาด 5 ลิตร..... 77

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 แสดงโครงสร้างของ ent-gibberellane skeleton..... 2

1.2 แสดงโครงสร้างของกรดจิบเบอเรลลิก (GA_3) 3

1.3 ขั้นตอนการสังเคราะห์ไอโซเพนทีนิล ไพโรฟอสเฟต..... 4

1.4 ขั้นตอนการสังเคราะห์เทอร์พีน และเทอร์พีนอยด์..... 5

1.5 ขั้นตอนการสังเคราะห์เอนท์-คอรีน..... 6

1.6 ขั้นตอนการสังเคราะห์ GA_{12} แอลดีไฮด์..... 7

3.1 รูปแบบการเจริญของเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ..... 24

3.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ค่าพีเอชของน้ำหมัก และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก ในถังหมักขนาด5 ลิตร ทำการหมักในภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 26

3.3 น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก)และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข)ที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.31 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า..... 30

3.4 น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก)และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข)ที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.49 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า..... 32

3.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก)และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข)ที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.68 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า..... 34

3.6 น้ำหนักเซลล์แห้ง (ก)และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข)ที่ผลิตโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi* N9-34 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดจิบเบอเรลลิกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.89 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณซูโครสเริ่มต้นเป็น 80, 100 และ120 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า..... 36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ค่าพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 71 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 42

3.8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ค่าพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 81 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 45

3.9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ค่าพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีอัตราส่วนโดยมวลระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 88 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทำการหมักในภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 48

3.10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ค่าพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักที่ 20 เปอร์เซ็นต์ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 53

3.11 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ค่าพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก ในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนในระหว่างการหมักที่ 50 เปอร์เซ็นต์ระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.12 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ก.)น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข.)โดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักที่ 40 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 62

3.13 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ก.)น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข.)โดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักที่ 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 65

3.14 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ก.)น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข.)โดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาลในระหว่างการหมักที่ 60 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 68

3.15 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ก.)น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมัก และปริมาณกรดจิบเบอเรลลิก (ข.)โดยทำการควบคุมปริมาณน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจน 0.05 กรัมต่อลิตรระหว่างการเลี้ยงเชื้อ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอัตราการให้อากาศ 1 vvm..... 74

ค.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร..... 90

ค.2 กราฟมาตรฐานของกรดจิบเบอเรลลิกในช่วงความเข้ม 200-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร 91