บทที่ 4

บทวิจารณ์และอภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21) ที่ได้ศึกษาตั้งแต่การคัดเลือกเชื้อรา Gibberella fujikuroi สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน และศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว ในระดับขวดเขย่า โดยใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีราคาถูก และหาได้ง่ายภายในประเทศมาใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารดังกล่าว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการศึกษาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินในระดับขยายส่วนต่อไป ส่วนชนิดและปริมาณจิบเบอเรลลินที่เชื้อผลิตได้จะนำมาวิเคราะห์โดยวิธี HPLC ซึ่งได้มีการปรับปรุงจากวิธีของ วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์ (21) เพื่อให้การแยกของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการแยกจากสารอื่นที่อยู่ใกล้เคียงได้อย่างสมบูรณ์ (resolution) และการวิเคราะห์มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยวิธี HPLC พบว่าสภาวะที่ประกอบด้วย คอลัมน์ C_8 และระบบสารละลายตัวพาที่ประกอบด้วยสัดส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ GA_3 และสัดส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 55 ต่อ 45 นั้น เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ GA_4 กับ GA_7 และจากผลการทดลองดังกล่าวดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่าไม่สามารถใช้ระบบสารละลายตัวพาเพียงระบบเดียวสำหรับการวิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 พร้อมกันได้ เช่นเดียวกับที่ Jensen และคณะ (37) รายงานไว้ แม้ว่า Barendse และคณะ (40)จะวิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้พร้อมกัน โดยการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของระบบสารละลายตัวพาในขณะวิเคราะห์ (gradient elution) ก็ตาม แต่วิธีดังกล่าวนี้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์เป็นเวลานาน และก่อนวิเคราะห์ตัวอย่างใหม่จะต้องรอให้คอลัมน์เข้าสู่สภาวะสมดุลเริ่มต้นก่อน นอกจากนี้เส้นฐาน (baseline) ที่ได้ยังเปลี่ยนไปตามการเปลี่ยนแปลงของระบบสารละลายตัวพาด้วย เนื่องจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ในน้ำหมักโดยวิธี HPLC นั้น เป็นวิธีที่มีความไวและความละเอียดสูง ทั้งน้ำหมักที่นำมาวิเคราะห์ก็มีปริมาณน้อยและยังต้องผ่านขั้นตอนการสกัดอีกหลายขั้นตอน จึงจำเป็นต้องมีสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน แต่เนื่องจากยังไม่มีผู้รายงานชนิดของสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณจิบเบอเรลลิน ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาสารมาตรฐานเปรียบเทียบที่เหมาะสม และจาก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 พบว่าพาราเซตามอล เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่เหมาะสมสำหรับ GA_3 สำหรับ GA_4 กับ GA_7 นั้น พบว่านาโปรเซนเป็นสารที่เหมาะสมที่สุด

จากการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลินด้วยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในระดับขวดเขย่า โดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์นั้น(21) พบว่าเมื่อใช้แร่ธาตุเสริม 2 แบบ คือ 0.1 กรัมต่อลิตรของอลูมิเนียมออกไซด์ หรือ 0.5 0.5 และ 0.01 กรัมต่อลิตรของอลูมิเนียมออกไซด์ร่วมกับซิงค์คลอไรด์และคอปเปอร์ซัลเฟตตามลำดับผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อสามารถผลิต GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ งานวิจัยนี้จึงได้นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแร่ธาตุเสริมทั้ง 2 แบบ มาศึกษาผลของชนิดและปริมาณน้ำมันพืชที่มีต่อการผลิตจิบเบอเรลลินโดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C เนื่องจากมีผู้รายงานว่าน้ำมันพืชบางชนิดมีผลทำให้เชื้อราผลิตจิบเบอเรลลินเพิ่มขึ้น(22,41) และงานส่วนนี้ยังมิได้มีการศึกษาโดย วันฤดี นิ่มเจริญวงศ์(21) ซึ่งจากผลการทดลองตามข้อ 3.3 และ 3.4 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแร่ธาตุเสริมเป็นอลูมิเนียมออกไซด์ 0.1 กรัมต่อลิตร และน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุด โดยเชื้อสามารถผลิต GA_3 และ ผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันถั่วเหลืองเป็นร้อยละ 14 และ 12 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Qiong และคณะ (41) รายงานไว้ว่าการเติมน้ำมันพืช (น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดฝ้าย) ในปริมาณร้อยละ 0.1 ถึง 0.3 ต่างมีผลทำให้การผลิตจิบเบอเรลลินเพิ่มขึ้นร้อยละ 15 และเมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน ในถังหมัก 5 ลิตร พบว่าการผลิตจิบเบอเรลลินชนิด GA_3 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C นั้นเป็นกระบวนที่ต้องการออกซิเจนสูง (23) และการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารแหล่งคาร์บอนจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดสูง การให้อากาศจึงต้องกวนด้วยความเร็วรอบสูงมากถึง 700 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในทางปฏิบัติ อีกประการหนึ่งการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่าเชื้อมีขีดจำกัดต่อการใช้แป้งมันสำปะหลัง ทำให้มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เชื้อไม่สามารถนำไปใช้ประมาณร้อยละ 2 อันเป็นปริมาณสารอาหารเหลือทิ้งที่ค่อนข้างสูงที่จะทำให้เกิดปัญหาต่อไปในกระบวนการเก็บเกี่ยว (recovary) และอาจทำให้เกิดมลภาวะที่ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการบำบัดได้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนอื่นที่เหมาะสมมาทดแทน และจากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของกลูโคสกับซูโครสเป็น 40 ต่อ 60 กรัมต่อลิตร หรือซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อสามารถเจริญและผลิต GA_3 และ GA_4 ได้สูงใกล้เคียงกัน ส่วนชนิดของแหล่งไนโตรเจน พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตกับกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน

ชนิด GA_3

ในการเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C เพื่อผลิตจิบเบอเรลลินนั้น พบว่าเชื้อที่เลี้ยงยังผลิตสารสีแดงร่วมไปด้วย ปริมาณที่ผลิตขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยงเชื้อ และสารนี้เมื่อนำไปสกัดและวิเคราะห์ด้วยโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปคโตรมิเตอร์ ตามวิธีที่ 2.3.11 พบว่าสารสีแดงดังกล่าวเป็นไบคาเวอริน ซึ่งBalanและคณะ(39) รายงานว่าเป็นสารต้านมะเร็ง (anticancer) และมีประสิทธิภาพสูงในการต่อต้านเชื้อ Leishmania brasiliensis และแม้ว่า Balan และคณะ (39) จะได้รายงานถึงผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีผลต่อการผลิตไบคาเวอริน ซึ่งมีวิถีทางการผลิตมาจากโพลีคีไตน์ (polyketide) ในขณะที่วิถีทางการผลิตจิบเบอเรลลินมาจากไดเทอร์ปีน ซึ่งมีอะซิทิล โค เอ เป็นสารตั้งต้นร่วมกันก็ตาม แต่จากผลการทดลองที่ได้ตามข้อ 3.15 ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไบคาเวอรินกับปริมาณจิบเบอเรลลินในน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Gibberella fujikuroi C โดยการแปรผันแหล่งไนโตรเจน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณจิบเบอเรลลิน(GA_3 GA_4 และ GA_7) ที่ผลิตได้โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมัก 5 ลิตร กับในระบบเขย่าขวด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในถังหมัก 5 ลิตร เชื้อสามารถผลิต GA_3 และผลรวมของ GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้ 530 และ 777 มก.ต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 8 ซึ่งสูงกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในระบบขวดเขย่า อยู่ร้อยละ 27 และ 57 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมัก สามารถใช้อัตราการกวนที่สูง เพื่อทำให้การถ่ายเทมวลสารและอากาศได้ดีกว่าในระบบขวดเขย่า

จากรายงานที่มีผู้ศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิ(secondary metabolize) พบว่าการผลิตจิบเบอเรลลินจะถูกควบคุมด้วยปรากฏการณ์ที่เรียกว่า คาร์บอนคะตาโบไลท์รีเพรสชัน จึงได้มีผู้ศึกษาถึงการเติมสารแหล่งคาร์บอนอย่างต่อเนื่องในปริมาณและเวลาที่เหมาะสม และจากการควบคุมระดับปริมาณน้ำตาลให้มีในถังหมักประมาณ 15 ถึง 45 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ให้มีอยู่ในถังหมักในปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุดประมาณ 1023 มก.ต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 348 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับที่ Borrow และคณะ 9 (12) รายงานไว้ว่าสภาวะที่มีการเติมสารละลายกลูโคสอย่างต่อเนื่อง เพื่อรักษาปริมาณกลูโคสให้มีในถังหมัก 20 ถึง 40 กรัมต่อลิตร เชื้อจะผลิต GA_3ได้สูงสุด 1002 มก.ต่อลิตรในชั่วโมงที่ 472 ซึ่งปริมาณ GA_3 ดังกล่าวมิได้ระบุวิธีที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ จึงเป็นการเปรียบเทียบได้เพียงคร่าวๆเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบค่าใช้จ่ายของวัตถุดิบ ระยะเวลาการผลิต และปริมาณ GA_3 ที่ได้ในสภาวะที่ไม่มีการเติมสารแหล่งคาร์บอนเพื่อควบคุมปริมาณแหล่งคาร์บอน กับสภาวะที่มีการเติมสารละลายกลูโคสเพื่อควบคุมปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักเป็น 25 กรัมต่อลิตรนั้น พบว่าสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ให้มีในถังหมักเป็น 25 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิต GA_3 ได้มากกว่าสภาวะที่ไม่มีการควบคุมแหล่งคาร์บอนประมาณ 0.93 เท่า แต่เวลาที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อนานกว่าประมาณ 0.93 เท่า และถ้าจะเทียบให้ได้ปริมาณ GA_3 ที่เท่ากันแล้ว พบว่าเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อคำนึงถึงค่าใช้จ่ายของวัตถุดิบ ระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าในสภาวะที่มีการเติมสารละลายกลูโคส เพื่อควบคุมปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในถังหมักให้มีประมาณ 25 กรัมต่อลิตรนั้น จะสามารถประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลาในส่วนดังกล่าวนี้ได้มากกว่าเท่าตัว นอกจากนี้ยังเป็นการลดปริมาณน้ำหมักที่ต้องนำไปผ่านกระบวนการสกัด ทำให้ลดปริมาตรสารละลายที่ต้องใช้สำหรับการสกัดได้ ดังนั้นสภาวะที่เลือกเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป จึงเป็นสภาวะที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีประมาณ 25 กรัมต่อลิตร

ส่วนการควบคุมความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยงนั้น พบว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 นั้น เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้น้อยกว่าสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างประมาณร้อยละ 48 และ 71 ตามลำดับ ในขณะที่การผลิต GA_4 และ GA_7 นั้น พบว่าสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดที่ 4 และ 5 นั้น เชื้อสามารถผลิต GA_4 และ GA_7 ได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Borrow และคณะ(23) ที่พบว่าอัตราการผลิตจิบเบอเรลลิน GA_1 และ GA_3 จะช้าลงเมื่อความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ได้อยู่ในช่วง 3 ถึง 3.5 เมื่อพิจารณาถึงสาเหตุที่อาจทำให้ปริมาณ GA_3 ที่เชื้อผลิตได้ในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 น้อยกว่าสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างนั้น อาจเป็นเพราะอิทธิพลของความเป็นกรดด่างที่ควบคุม หรืออาจเป็นเพราะความแรงของอิออน (ionic strength) เนื่องจากการเติมสารละลายกรดและด่าง เพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างนั้นๆ เพราะในสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 4 และ 5 จะมีการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 ปริมาณ 50 และ 105 มล. ตามลำดับ ซึ่งทำให้ความแรงของอิออนในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีอยู่ 0.31 เพิ่มขึ้นเป็น 2 และ 4.2 ตามลำดับ ส่วนสภาวะที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างที่ 3 พบว่าเชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้ไม่แตกต่างจากสภาวะที่ไม่มีการควบคุมความเป็นกรดด่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดยเชื้อ Gibberella fujikuroi C ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จึงประกอบด้วยซูโครส 100

กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟตและกากถั่วเหลืองสกัดไขมันแล้วที่มีปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.40 และ 0.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับเป็นแหล่งไนโตรเจน โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร อลูมิเนียมออกไซด์ 0.10 กรัมต่อลิตร น้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ในสภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °ซ อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเป็น 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที และมีการเติมสารละลายกลูโคส เพื่อควบคุมให้ระดับน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าประมาณ 25 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 162 พบว่าเชื้อสามารถผลิต GA_3 GA_4 และ GA_7 ได้สูงสุด 1023 48 และ 200 มก.ต่อลิตรตามลำดับในชั่วโมงที่ 348 และไม่สามารถผลิตได้สูงกว่านี้ เพราะขีดจำกัดของเชื้อต่อการผลิตจิบเบอเรลลิน อย่างไรก็ตามการผลิตจิบเบอเรลลินจากเชื้อรา Gibberella fujikuroi C นี้ควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตจิบเบอเรลลิน โดยการทำให้เชื้อกลายพันธุ์ (mutation) เช่นการฉายแสงอุลตราไวโอเลตซักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ หรือการใช้สารเคมี(42) เช่น NTG (nitrosoguanidine) หรือ nitrosoethylurea เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงกระบวนการที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ที่มีในน้ำหมักให้ได้สูงสุดเท่าที่จะเป็นไปได้ โดยการใช้สารละลายที่เหมาะสมในการสกัดแยกจิบเบอเรลลิน การใช้สารที่สามารถตกตะกอนจิบเบอเรลลิน เช่น เฟอร์รัสคลอไรด์ (43) N-benzyl-N-methyl amine (44) และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเพื่อแยกตะกอน GA_3 GA_4 และ GA_7 (45)เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวนี้เป็นกระบวนการที่มาซึ่งการเพิ่มปริมาณ GA_3 ทั้งสิ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. สภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ GA_3 GA_4 และ GA_7 โดยวิธี HPLC ประกอบด้วยคอลัมน์ C_8 และระบบสารละลายตัวพาที่มีสัดส่วนของเมทานอลต่อสารละลายกรดฟอสฟอริกเป็น 35 ต่อ 65 สำหรับการวิเคราะห์ GA_3 โดยมีพาราเซตามอล เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน และ 55 ต่อ 45 สำหรับวิเคราะห์ GA_4 และ GA_7 โดยมีนาโปรเซน เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน
2. การเติมน้ำมันถั่วเหลืองร้อยละ 0.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้เชื้อรา Gibberella fujikuroi C สามารถผลิต GA_3 ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมน้ำมันถั่วเหลือง ร้อยละ 14 และปริมาณน้ำมันถั่วเหลืองดังกล่าวยังสามารถเป็นสารกำจัดฟองในระดับถังหมัก 5 ลิตรได้
3. การผลิตจิบเบอเรลลิน GA_3 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C เป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจนปริมาณมาก
4. แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C คือ ซูโครส 100 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แหล่งไนโตรเจนร่วมที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้วเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยให้มีปริมาณไนโตรเจน 0.14 และ 0.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ
5. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต GA_3 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 4 คือ สภาวะที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารต่อนาที
6. สภาวะที่มีความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7 และไม่ต้องมีการควบคุมความเป็นกรดด่างระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต GA_3 โดยเชื้อรา Gibberella fujikuroi C
7. การควบคุมระดับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ ให้มีในถังหมักในปริมาณ 25 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้เชื้อผลิต GA_3 ได้เพิ่มขึ้น และในชั่วโมงที่ 348 เชื้อสามารถผลิต GA_3 ได้สูงสุด 1023 มก.ต่อลิตร และไม่สามารถผลิตได้สูงกว่านี้ เพราะขีดจำกัดของเชื้อที่ช่วงเวลานั้น