การเปรียบเทียบการหลอมโพรโทพลาสท์ของยีสต์ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟิวชันและการใช้สารเคมี

นางสาวสุกัญญา ป้องทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-992-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17231176

COMPARATIVE STUDY OF ELECTROFUSION AND CHEMICAL FUSION OF YEAST PROTOPLASTS

Miss Sukanya Pongthong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-634-992-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบการหลอมโพรโทพลาสท์ของยีสต์ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟิวชันและการใช้สารเคมี
โดย	นางสาว สุกัญญา ป้องทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
	รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุกัญญา ป่องทอง : การเปรียบเทียบการหลอมโพรโทพลาสท์ของยีสต์ด้วยวิธีอิเล็กโทร-ฟิวชันและการใช้สารเคมี (COMPARATIVE STUDY OF ELECTROFUSION AND CHEMICAL FUSION OF YEAST PROTAPLAST) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.นลิน นิลอุบล และ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ. 146 หน้า. ISBN 974-634-992-9

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการหลอมโพรโทพลาส์ท์ยีสต์ Endomycopsis fibuligera ATCC 9947 กับยีสต์ Candida oleophila NNU62 เพื่อสร้างลูกผสมที่ย่อยแป้งได้เหมือนกับ E. fibuligera และผลิตกรดมะนาวได้เหมือนกับ C. oleophila โดยใช้วิธีอิเล็กโทรฟิวชันเปรียบเทียบกับวิธีการใช้ PEG จากการเตรียมโพรโทพลาสท์เพื่อใช้ในการหลอม พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโทพลาสท์ E. fibuligera คือบ่มใน Zymolyase ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโทพลาสท์ C. oleophila คือบ่มใน Zymolyase ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

จากการหลอมโพรโทพลาสท์ระหว่างยีสต์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าทั้ง 2 วิธีได้ลูกผสมที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงขึ้นหรือลูกผสมที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามจากการหลอมโพรโทพลาสท์โดยวิธีอิเล็กโทรฟิวชัน พบลูกผสมที่สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดมะนาวแต่ไม่มีความคงตัว สำหรับภาวะที่เหมาะสมที่จะได้ลูกผสมที่สามารถย่อยแป้งได้สูงกว่า E. fibuligera โดยมีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.07 คือการให้สัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่มีความเข้มข้นสนามไฟฟ้า 5 kV/cm จำนวน 10 พัลส์ ในสารละลายซอร์บิทอลเข้มข้น 0.7 โมลาร์ ที่มีแคลเซียมอิออนความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมอิออนความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์ ส่วนลูกผสมที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่า C. oleophila จะได้จากภาวะเช่นเดียวกับข้างต้น แต่ในสารละลายที่มีแคลเซียมอิออนความเข้มข้น 0.7 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมอิออนความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.2

ส่วนการหลอมโดยใช้ PEG โดยบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 20 นาที จะได้ลูกผสมที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนเชื้อ C. oleophila เท่านั้น โดยลูกผสมที่ได้จะสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น โดยมีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.2

ภาควิชา -

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ

ปีการศึกษา 2539

ลายมือชื่อนิสิต สุกัญญา ป่องทอง

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

##C626888 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: ELECTROFUSION / Endomycopsis fibuligera / Candida oleophila / PROTOPLAST FUSION
SUKANYA PONGTHONG : COMPARATIVE STUDY OF ELECTROFUSION AND CHEMICAL FUSION OF YEAST PROTOPLASTS. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. MANA SRIYUTHSAK, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. NALINE NILUBOL, Ph.D. AND ASSO. PROF. PAIROH PINPHANICHAKARN, Ph.D., 146 pp.
ISBN 974-634-992-9

Comparative studies of protoplast fusion between Endomycopsis fibuligera ATCC 9947, an amylases-producing strain, and Candida oleophila NNU62, a citric acid-producing strain, by electrofusion and by treatment with polyethylene glycol (PEG) were performed. Suitable conditions for protoplast formation from both strains were by incubating at 35°C for 30 min. in zymolyase at 0.1 mg/ml for E. fibuligera and at 0.4 mg/ml for C. oleophila.

Protoplast fusion by both methods yielded strains capable to produce higher level of either amylases or citric acid than those of the parental strains. However by using electrofusion, strains with ability to produce both amylases and citric acid were obtained but they were unstable after subculturing.

Electrofusion conditions yielding strains capable to produce higher amylases than that of E. fibuligera were with direct current of 10 square pulse with 10 s pulse width and field strength at 5 kV/cm in 0.7 M sorbitol containing 0.5 mM Ca^{2+} and 0.7 mM mg^{2+}. Under these conditions, fusion frequency of 0.07 was obtained. Conditions for electrofusion giving strains producing higher citric acid than that of C. oleophila were similar to the above except for the fusion solution contained 0.7 mM Ca^{2+} and 0.1 mM Mg^{2+}. Fusion frequency under these conditions was 0.2.

Suitable conditions for protoplast fusion by treating with PEG were at 20°C for 20 min, under these conditions only strains capable to produce citric acid but higher than that of C. oleophila with fusion frequency of 0.20 were obtained.

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต สุกัญญา พ่วงทอง

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา มานะ ศรียุทธศักดิ์

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้ดำเนินการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นลิน นิลอุบล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง ณ ที่นี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทำที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องปฏิบัติการวิจัยสารกึ่งตัวนำ ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกในระหว่างการทำวิจัยนี้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบและให้คำแนะนำ ความคิดเห็น และคำวิจารณ์อันมีคุณค่ายิ่ง

ขอขอบคุณคุณอัญชนา จีนานุพันธ์ คุณอาภรณ์ ธีรมงคลรัศมี และคุณณรงค์ หอมจันทร์ ที่ได้ให้คำแนะนำในด้านวงจรไฟฟ้าและเทคนิคในการใช้อุปกรณ์ไฟฟ้าที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณศิรพรรณ สุคนธสิงห์ คุณเชษฐชวาลย์ วะดีศิริศักดิ์ คุณปิยวัตร สุขรำมิ และคุณนภดล สว่างนาวิน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการจัดทำเอกสารรูปเล่มวิทยานิพนธ์

เนื่องจากทุนวิจัยครั้งนี้ ได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย และทุนจากห้องปฏิบัติการวิจัยสิ่งประดิษฐ์สารกึ่งตัวนำ จึงขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ และคุณแม่ ที่ได้สนับสนุนทุนทรัพย์ และเป็นกำลังใจที่ดียิ่งแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่
1. บทนำ 1
2. การศึกษาภาวะของการเตรียมโพรโทพลาท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 และเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* ATCC 9947 22
3. การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 กับเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATCC 9947 โดยการใช้สารเคมี 36
4. การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 กับเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATCC 9947 ด้วยวิธี Electrofusion 51
5. การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 84
6. การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATCC 9947 90
7. สรุปผลการทดลอง 98
รายการอ้างอิง 101
ภาคผนวก ก 110
ภาคผนวก ข 112
ภาคผนวก ค 114
ภาคผนวก ง 115
ภาคผนวก จ 120
ประวัติผู้เขียน 146

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ชนิดของยีสต์ที่ใช้เอนไซม์จากหอยทาก (snail enzymes) , เอนไซม์ Zymolyase และ เอนไซม์ Mutanase และ Novozyme 234 สำหรับย่อยผนังเซลล์เพื่อเตรียมโพรโทพลาสท์	6
1.2	แสดงชนิดและความเข้มข้นของสาร osmotic stabilizer ที่ใช้กับ โพรโทพลาสท์	8
2.1	จำนวนโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62 เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก/มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	26
2.2	เปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62 เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะ เวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	28
2.3	เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของการเตรียมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62 เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	30
2.4	จำนวนโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	31
2.5	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับมาเป็นเซลล์ ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	33
3.1	ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของเชื้อที่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ยีสต์ *C.oleophila* กับเชื้อ *E. fibiligera* ในสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 27 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่มนาน 20, 30, และ 40 นาที	40
3.2	$\bar{X}$, $\bar{X}$+S,..., $\bar{X}$+10SD ของค่า potency index ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการบ่มใน PEG ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร C	42

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.3 ความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD,...,$\overline{X}$+10SD ของเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ระหว่างเชื้อ *C. oleophila* กับเชื้อ *E. fibuligera* ด้วยสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสโดยแปรระยะเวลาบ่ม 20, 30, และ 40 นาที ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร C 43

3.4 ความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD,...,$\overline{X}$+10SD ของเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ระหว่างเชื้อ *C. oleophila* กับเชื้อ *E. fibuligera* ด้วยสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยแปร ระยะเวลาบ่ม 20, 30, และ 40 นาที ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร C..... 44

3.5 เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ที่มีค่า Potency Index อยู่ในช่วงตั้งแต่ $\overline{X}$+6SD ถึง $\overline{X}$+10SD หลังจากผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ในสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 27 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่มนาน 20, 30, และ 40 นาที ตามลำดับ..... 45

3.6 fusion frequency ของลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ที่มีค่า Potency Index อยู่ในช่วงตั้งแต่ $\overline{X}$+6SD ถึง $\overline{X}$+10SD หลังผ่านการบ่มในสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 27 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 20, 30 และ 40 นาที ตามลำดับ..... 46

3.7 $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD, ...,$\overline{X}$ +10SD ของค่า potency index ของเชื้อ *E.fibuligera* ที่ไม่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร S..... 47

3.8 ความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD,...,$\overline{X}$+10SD ของเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E.fibuligera* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ระหว่างเชื้อ *C. oleophila* กับเชื้อ *E. fibuligera* ด้วยสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 27 องศาเซลเซียส โดยแปรระยะเวลาบ่ม 20, 30, และ 40 นาที ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร S..... 49

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ค่าเปอรเซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสท์ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 65 V/cm ความถี่ 2 MHz ตามด้วยไฟฟ้ากระแสตรงคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ความเข้มสนามไฟฟ้า 1.5 kV/cm ความกว้างพัลส์ 10 μs/pulse จำนวน 3 พัลส์..... 58

4.2 $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD, ..., $\overline{X}$ +10SD ของค่า Potency Index ของเชื้อ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า 65 V/cm AC ความถี่ 2 MHz 1.5 kV/cm DC ความกว้าง 10 μs/pulse ในอาหาร C เป็นเวลา 5 วัน..... 59

4.3 $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD, ..., $\overline{X}$ +10SD ของค่า Potency Index ของเชื้อ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า 65 V/cm AC ความถี่ 2 MHz 1.5 kV/cm DC ความกว้าง 10 μs/pulse ในอาหาร S เป็นเวลา 5 วัน 60

4.4 ความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD, ...,$\overline{X}$ +10SD ของโพรโทพลาสท์ *C.oleophila* กับ *E.fibuligera* ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้า 65 V/cm AC ความถี่ 2 MHz 1.5 kV/cm DC จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้าง 10 μs/pulse กระตุ้น 1 ครั้ง, 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง..... 61

4.5 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสท์ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยไฟฟ้ากระแสตรงคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมความเข้มสนามไฟฟ้า 2 kV/cm ความกว้างพัลส์ 10 μs/pulse จำนวน 3 พัลส์..... 63

4.6 ความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD,..., 10$\overline{X}$ +SD ของโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2.0 kV/cm DC จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้าง 10 μs/pulseกระตุ้น 1 ครั้ง, 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง..... 64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.7 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง จำนวน 4 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 10 μs/pulse แปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมอิออน 0- 0.9 mMในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 65

4.8 ค่า fusion frequency ของลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 10 μs/pulse แปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมอิออน 0- 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 66

4.9 ค่า fusion frequency ของโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *E. fibuligera* จากการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10 μ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ แปรแคลเซียมอิอนความเข้มข้น 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM..... 69

4.10 จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่าง *E. fibuligera* กับ *C. oleophila* จากการหลอมโพรโทพลาสท์ *E. fibuligera* กับ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10 μs/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ แปรแคลเซียมอิอนความเข้มข้น 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM..... 70

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.11 ค่า fusion frequency ของโคโลนีทั้งหมดที่มีค่า Potency Index สูงกว่า $\bar{X}$+5SD จากการหลอมโพรโทพลาสท์ของ *E. fibuligera* และ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์10 μs/pulse กระตุ้น 10 ครั้งในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ แปรแคลเซียมอิอนความเข้มข้น 0-0.9 mM และแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM..... 71

4.12 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น10 ครั้ง..... 73

4.13 ค่า fusion frequency ของลูกผสมที่มีโคโลนีลักษณะเหมือน *C. oleophila* เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV / cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง โดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 74

4.14 ค่า fusion frequency ของลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *E. fibuligera* ได้จากหลอมโพรโทพลาสท์ *C. olephila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง โดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออน ในสารละลายสำหรับ หลอมโพรโทพลาสท์ 0 - 0.9 mM..... 76

4.15 จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่าง *E. fibuligera* และเชื้อ *C. oleophila* หลังจากผ่านไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลล์ กระตุ้น 10 ครั้ง โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออน 0 -0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์... 77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.16 ค่า fusion frequency ของโคโลนีลูกผสมทั้งหมดที่มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อ *E. fibuligera* และ *C. oleophila* จากการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า ที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 79

4.17 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีลูกผสม ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท *C. oleophila* และ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้าที่มีค่า Potency Index สูงกว่าพ่อแม่ (control)โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 81

5.1 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* หลังผ่านการกระตุ้นที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 kV/cm DC จำนวน1 พัลส์ กระตุ้น10 ครั้ง โดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 85

5.2 จำนวนโคโลนีลูกผสม *C. oleophila* ที่มีค่า Potency Index สูงกว่า $\bar{X}$+5SD (1.495) ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง จำนวนพัลส์ 1 พัลส์ โดยแปรความ เข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 86

5.3 ค่า fusion frequency ของโคโลนีลูกผสม *C. oleophila* เมื่อผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 V/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง โดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 87

6.1 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง..... 91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

6.2 จำนวนโคโลนีลูกผสมของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ; 5 kV/cm DC โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0-0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 92

6.3 ค่า fusion frequency ของโคโลนีลูกผสมของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 kV/cm DC โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์..... 93

6.4 ความถี่ของโคโลนีเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\bar{X}$, $\bar{X}$+SD,...,$\bar{X}$ + 10SD และค่าที่มากกว่า $\bar{X}$ + 10SD หลังจากผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 Mhz ตามด้วย 5 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่ประกอบด้วย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 0-0.9 (mM)โดยใน แต่ละภาวะของการแปร $CaCl_2$จะแปร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0-0.9(mM) ควบคู่ไปด้วย..... 95

6.5 ความถี่ของโคโลนีเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่มีค่า Potency Index ในช่วง X, $\bar{X}$+SD,..., $\bar{X}$ + 10SD และค่าที่มากกว่า $\bar{X}$ + 10SD หลังจากผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง ในสารละลาย สำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่ประกอบด้วย $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0-0.9 (mM) โดยในแต่ละภาวะของการแปร $MgCl_2$จะแปร ความเข้มข้น $CaCl_2$ 0-0.9(mM) ควบคู่ไปด้วย..... 96

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	แผนภาพแสดงโครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ M, mannan ; G, glucan P, phosphate; S, sulphur.	3
1.2	แผนภาพแสดงกระบวนการโพรโทพลาสท์ฟิวชันของเชื้อยีสต์	10
2.1	ลักษณะของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 ในระยะการเจริญ 12 ชม. ในอาหารเหลว YM (ขนาดกำลังขยาย 800 X)	23
2.2	ลักษณะเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ในระยะเวลาการเจริญ 12 ชม. ในอาหารเหลว YM (ขนาดกำลังขยาย 800 X)	23
2.3	จำนวนโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62 เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	26
2.4	ลักษณะของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 ที่อยู่ในสารละลายซอร์บิทอล 1 โมลาร์ (ขนาดกำลังขยาย 800 X)	27
2.5	ลักษณะของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 ที่แตกเมื่ออยู่ในน้ำซึ่งปลายลูกศรคือ เซลล์ที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ และบริเวณรอบนอกเป็นโพรโทพลาสท์ที่แตก (ขนาดกำลังขนาย 800 X)	27
2.6	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับเป็นเซลล์ของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62 เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	29
2.7	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของการเตรียมโพรโทพลาสท์ ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62 เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	30
2.8	กราฟแสดงจำนวนโพรโทพลาสท์ ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	32
2.9	เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับมาเป็นเซลล์ ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลา บ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที	33

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
2.10	เปรียบเทียบลักษณะโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATCC 9947 ที่อยู่ในสารละลายซอร์บิทอล 1 โมลาร์ (ก) (ขนาดกำลังขยาย 800 X) และที่อยู่ในน้ำ (ข) ปลายลูกศรคือเซลล์ที่ยังไม่เปลี่ยนโพรโทพลาสท์ และบริเวณรอบนอกเป็นโพรโทพลาสท์ที่แตก (ขนาดกำลังขยาย 800 X).....	34
3.1	ลักษณะการเกาะกันของโพรโทพลาสท์เชื้อยีสต์ *C.oleophila* และเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* เมื่ออยู่ในสารละลาย PEG-4,000 (30%) ที่ประกอบด้วย 50 mM $CaCl_2$ (ขนาดกำลังขยาย 800X).....	40
3.2	โคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C.oleophila* ที่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG-4000 (30%) อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เวลานาน 20 นาที (A) เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. oleophila* NNU 62 (central) (B) เลี้ยงในอาหารทดสอบ C เป็นเวลา 5 วัน.....	48
3.3	โคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C . oleophila* ที่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG-4000 (30%) อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เวลานาน 40 นาที (A) เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. oleophila* NNU 62 (Central) (B) เลี้ยงในอาหารทดสอบ C เป็นเวลา 5 วัน.....	48
4.1	คลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า.....	
4.2	ขบวนการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า.....	52
4.3	ห้องบรรจุเซลล์(chamber) ขนาด 2 มิลลิเมตร.....	56
4.4	ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า ภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ.....	56
4.5	โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหาร C (A)กว้างกว่าเชื้อ *C. oleophila* ที่เป็น control (B) ในวันที่ 5 ของการทดสอบ.....	68
4.6	โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหาร S (A) กว้างกว่า *E. fibuligera* ที่เป็น control (B) ในวันที่ 5 ของการทดสอบ.....	68

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
4.7	ภาพโคโลนีผสม (ดังลูกศร) ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera*กับเชื้อ *C.oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหาร C (ก) และอาหาร S (ข) วันที่ 5 ของการทดสอบ	72
4.8	โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* (ดังลูกศร)หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหารC (A) กว้างกว่าเชื้อ *C. oliophila* ที่เป็น control (B) ในวันที่ 5 ของการทดสอบ	75
4.9	โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* (ดังลูกศร)หลังผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหาร S (B) กว้างกว่าเชื้อ *E. fibuligera* ที่เป็น control (A) ในวันที่ 5 ของการทดสอบ	75
4.10	ภาพโคโลนีผสม (ดังลูกศร) ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* กับเชื้อยีสต์ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหารทดสอบ S (A) และอาหาร C (B) วันที่ 5 ของการทดสอบ	78
4.11	การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ในห้องบรรจุโพรโทพลาสท์ ขณะกระตุ้นด้วยไฟฟ้าที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง	82
4.12	การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ในห้องบรรจุโพรโทพลาสท์ ขณะกระตุ้นด้วยไฟฟ้าที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง	82
5.1	แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นแคเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออนและจำนวนโคโลนีที่มีค่า Potency Index สูงกว่า 1.495	87
5.2(ก)	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Potency Index ของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้าภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm กับความสัมพันธ์ของแมกนีเซียมอิออนในสารละลายที่ใช้หลอมโพรโทพลาสท์ ความเข้มข้น 0 -0.9 mM	88

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

5.2(ข) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Potency Index ของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้าภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 kV/cm DC แปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0-0.9 mM ในสารละลายที่ใช้หลอมโพรโทพลาสท์..... 89

6.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน กับแมกนีเซียมอิออนและจำนวนโคโลนีลูกผสมที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ด้วยไฟฟ้า150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 kV/cm DC โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0-0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์... 94