บทที่ 3

การหลอมโพรโทพลาสท์ ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU62 กับ เชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ATCC 9947 โดยการใช้สารเคมี

ในบทนี้จะกล่าวถึงการศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 ซึ่งสามารถผลิตกรดมะนาวกับเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้สารเคมีเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบกับการหลอมโพรโทพลาสท์ โดยใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้น (Electrofusion)

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิดคือ สารโพลีเอธิลลีนไกลคอล (Polyethyleneglycol ; PEG) ซึ่งเป็นสารที่เรียกว่า fusogenic agent คือมีคุณสมบัติในการชักนำให้เกิดการรวมตัวกันของโพรโทพลาสท์ของพืช (Kao และ Michayluk , 1974) มีผู้นำ PEG มาใช้ในการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อจุลินทรีย์ คือ รา (Ann, 1976) แบคทีเรีย (Ochi, 1982) และยีสต์ (Sipiczki และ Ferenczy, 1977)

PEG มีสูตรโมเลกุล ดังนี้ CH_2OH-(CH_2-O-CH_2)$_n$-CH_2OH (Beckerich และคณะ, 1984) การใช้ PEG เป็น fusogenic agent ต้องเลือกให้มีน้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นที่เหมาะสมในแบคทีเรีย น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่ใช้ได้ผลดี คือ 4000 - 6000 และความเข้มข้นที่ใช้สูงราว 40 -50 เปอร์เซ็นต์ (Hopwood, 1981) ในขณะที่ Peberdy (1979) รายงานว่าสำหรับเชื้อราและยีสต์น้ำหนักโมเลกุลที่เหมาะสมของ PEG คือ 4000 - 6000 ความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 30 เปอร์เซ็นต์ ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้โพรโทพลาสท์ แตกได้ และถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ โพรโทพลาสท์จะหดตัว ทำให้มี fusion frequency ต่ำ และที่ความเข้มข้นสูง PEG จะเป็นพิษกับโพรโทพลาสท์ด้วย นอกจากนี้การบ่มโพรโทพลาสท์ใน PEG นานเกินไปจะมีผลทำให้โพรโทพลาสท์มีชีวิตรอดน้อยและมี fusion frequency ต่ำลงด้วย

หน้าที่ของ PEG คือทำให้โพรโทพลาสท์จับกันเป็นกลุ่ม แล้วเกิดการสลายและรวมตัวกันของผนังเมมเบรน การทำงานของ PEG จะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อเติมแคลเซียมอิออน ลงไปด้วย (Peberdy , 1979; Fournier 1977) พบว่า ถ้าไม่เติมแคลเซียมอิออน ลงใน PEG จะไม่เกิดลูกผสม ถึงแม้ว่า โพรโทพลาสท์สามารถ regenerate ได้ตามปกติ ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนที่เหมาะสมมีค่าประมาณ 10-50 mM สำหรับแบคทีเรียและพืชมีรายงานว่าการเติม

dimethyl sulfoxide ลงในสารละลาย PEG จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรวมตัวกันให้ดีขึ้น (Hopwood, 1981; Douglas และคณะ, 1980)

Kao และ Michayluk (1974) เสนอว่า PEG มีประจุเป็นลบเล็กน้อยเนื่องจากมี ether linkage สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับประจุบวกของน้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และอื่นๆ จากการที่ PEG มีโมเลกุลเป็นโซ่ยาว จึงทำหน้าที่เป็นเหมือนสะพานเชื่อมระหว่าง โพรโทพลาสท์ ให้มาติดกัน นอกจากนี้ PEG ยังสามารถเชื่อมกับแคลเซียมอิออนได้ดี สำหรับแคลเซียมเชื่อว่า ทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีนที่ผิวของโพรโทพลาสท์ กับ PEG ที่มีประจุเป็นลบ ทำให้โพรโทพลาสท์มาเกาะติดกันมากขึ้น

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมโพรโทพลาสท์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง *Endomycopsis fibuligera* และ *Candida oleophila* บน YM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม. แล้วนำมาเตรียม suspension ของเชื้อ โดยใช้น้ำปลอดเชื้อทำให้เจือจาง 10 เท่า นำ suspension ของเชื้อยีสต์แต่ละชนิดที่เตรียมได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพาะเชื้อลงใน YM broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้น นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที นาน 12-15 ชม. จะได้เซลล์ของเชื้อยีสต์แต่ละชนิดเพื่อนำไปเตรียมโพรโทพลาสท์ตามขั้นตอนการเตรียมโพรโทพลาสท์ ที่กล่าวในบทที่ 2 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมคือ นำเชื้อยีสต์ *C. oleophila* บ่มในเอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ระยะเวลานาน 30 นาที เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* บ่มในเอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ระยะเวลานาน 30 นาที

แยกโพรโทพลาสท์ออกจากสารละลายเอนไซม์ Zymolyase โดยการปั่นในเครื่องเหวี่ยง ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที ล้างโพรโทพลาสท์ด้วย 1.0 M sorbitol ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง

แขวนลอยโพรโทพลาสท์ใน 1.0 M sorbitol ปลอดเชื้อ 4 มล. นับจำนวนโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU62 และ เชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* ATCC 9947 ที่ได้โดยใช้ Haemacytometer

2. การหลอมโพรโทพลาสท์

2.1 ผสมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU62 และ เชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* ATCC9947 ที่ได้จากข้อ 1 ซึ่งมีความหนาแน่น 10^6 - 10^8 โพรโทพลาสท์ต่อมิลลิลิตร เชื้อละ 1 มล. ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ปลอดเชื้อ ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ

2.2 ปั่นตกตะกอนโพรโทพลาสท์ในเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีนาน 5 -10 นาที เทของเหลวทิ้ง

2.3 เติม 4 มล. ของสารละลาย 30 % PEG (น้ำหนักโมเลกุล 4000) (ภาคผนวก ข ข้อ 4) ลงไปและผสมโพรโทพลาสท์ให้เข้ากันกับสารละลาย PEG โดยใช้ Loop ปลอดเชื้อคนเบาๆ

2.4 บ่มที่อุณหภูมิห้อง และที่ 20 องศาเซลเซียส นาน 20, 30 และ 40 นาที

2.5 นำโพรโทพลาสท์ที่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG แต่ละตัวอย่างปั่นในเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้ง ปั่นล้างด้วยสารละลาย 1.0 M sorbitol 2 ครั้ง แล้วเจือจางถึงระดับที่เหมาะสมด้วย 1.0 M sorbitol ปลอดเชื้อ

2.6 นำโพรโทพลาสท์ที่ไม่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้มีความเจือจาง ในระดับเดียวกับความเจือจางในข้อ 2.5 ซึ่งจะทำให้โพรโทพลาสท์แตก และเหลือเฉพาะเซลล์ที่ไม่ใช่โพรโทพลาสท์ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ

3. การเปลี่ยนโพรโทพลาสท์กลับไปเป็นเซลล์ (Protoplast regeneration)

3.1 ปิเปตโพรโทพลาสท์แขวนลอย ที่เจือจางจากข้อ 2.5 และ 2.6 อย่างละ 0.1 มล. ใส่ลงบนผิวหน้าอาหาร CRM (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ที่ เทไว้ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อจนแข็งแล้ว เททับ ด้วยอาหาร CRM สำหรับเททับที่มีความเข้มข้นของวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมแล้วทำให้เย็นลงที่ 50 องศาเซลเซียส เอียงจานเลี้ยงเชื้อไปมาเพื่อให้เชื้อกระจายในอาหารที่ใช้เททับ ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง

3.2 บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.1 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนปรากฏโคโลนี และนับจำนวนโคโลนีบนอาหาร CRM จำนวนโคโลนีที่ได้จากตัวอย่าง ข้อ 2.5 มาจากทั้งโพรโทพลาส์ และเซลล์ส่วนจากตัวอย่างข้อ 2.6 มาจากเซลล์เท่านั้น

3.3 จำนวนโคโลนีจากโพรโทพลาสท์คำนวณได้จาก จำนวนโคโลนีที่ได้จากตัวอย่าง ข้อ 2.5 ลบจากตัวอย่าง ข้อ 2.6

3.4 สุ่มเก็บโคโลนีที่เจริญบนอาหารในข้อ 3.2 ที่มาจากตัวอย่างข้อ 2.5 จำนวน 100 โคโลนี ไปทำการทดสอบคุณสมบัติของลูกผสมโดยวิธี replica plating แบบ multiple point โดยทดสอบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวโดยเลี้ยงในอาหาร เลี้ยงเชื้อ C ซึ่งมี $CaCO_3$ เป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก ข้อ 3) และทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ S ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ (ภาคผนวก ก ข้อ 4) จากนั้นสังเกต วงใสรอบโคโลนีบนอาหารสำหรับคัดเลือก ทั้ง 2 ชนิด

3.5 บ่มจานเพาะเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.4 ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส วัดขนาดบริเวณใส (clear zone) ของเชื้อในอาหาร C และอาหาร S ในวันที่ 5 ของการทดสอบ ถ้าเป็น โคโลนีที่เกิดจากการหลอมรวมกันของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62 กับโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* จะสามารถเกิดบริเวณใสทั้งในอาหาร C และอาหาร S ที่ตรวจบริเวณตำแหน่งเดียวกัน คำนวณค่า Potency Index โดย

$$\text{Potency Index} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (ซม.)}}{\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (ซม.)}} \qquad (3.1)$$

และคำนวณค่าความถี่ของการหลอมรวมกัน ของโพรโทพลาสท์ (fusion frequency) เท่ากับ

$$\text{fusion frequency} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีของลูกผสม}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ทั้งหมดที่เจริญกลับเป็นเซลล์}} \qquad (3.2)$$

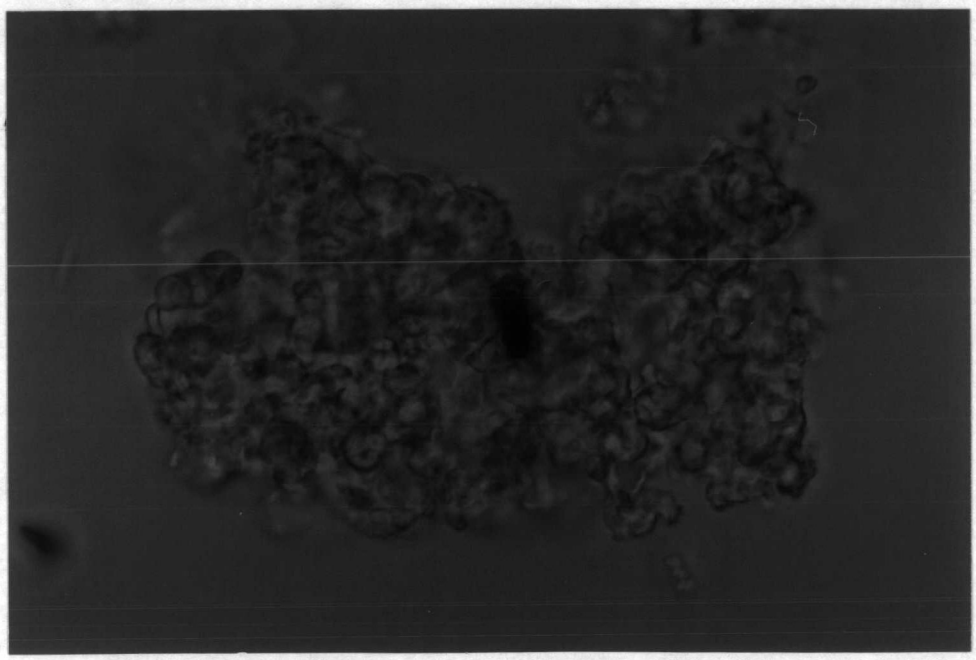
คำจำกัดความของ ลูกผสม ในที่นี้จะหมายถึงโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อ *C. oleophila* และ *E. fibuligera* คือ มีค่า Potency Index สูงกว่า $\bar{X}$+5SD ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหารทดสอบ

ผลการทดลอง

จากการนำโพรโทพลาสท์มาบ่มกับสารละลาย PEG พบว่าจะทำให้เกิดการเกาะติดกันเป็นกลุ่ม ดังแสดงในรูป 3.1 และเมื่อศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์โดยการใช้ PEG โดยแปรอุณหภูมิ ของการบ่มปฏิกิริยาที่ 27 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) และ 20 องศาเซลเซียส และมีระยะเวลา ในการบ่มที่ 20, 30, และ 40 นาที นับจำนวนโพรโทพลาสท์ที่เจริญขึ้นมาเป็นโคโลนีในอาหาร CRM (แสดงในตารางภาคผนวก ง ข้อ 1) และคำนวณค่าการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ของโพรโทพลาสท์จากการหลอมเชื้อ *C.oleophila* กับเชื้อ *E. fibuligera* แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 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

เปอร์เซ็นต์ regeneration frequency		
เวลา (นาที)	อุณหภูมิ 20 ° C	อุณหภูมิ 27 ° C
20	5.25×10^{-2}	10.41×10^{-2}
30	2.27×10^{-2}	7.18×10^{-2}
40	2.06×10^{-2}	3.54×10^{-2}



รูปที่ 3.1 ลักษณะการเกาะกันของโพรโทพลาสท์เชื้อยีสต์ *C.oleophila* และเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* เมื่ออยู่ในสารละลาย PEG-4,000 (30%) ที่ประกอบด้วย 50 mM $CaCl_2$ (ขนาดกำลังขยาย 800X)

จากตารางที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่าเมื่อบ่มโพรโทพลาสท์ใน PEG ระยะเวลานานขึ้นการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ (regeneration frequency)จะมีค่าลดลงและการบ่มใน PEG ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียล มีค่า regeneration frequencyสูงกว่า ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียล ในระยะเวลาบ่มนานเท่ากัน

การตรวจสอบลูกผสม โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ C และอาหารเลี้ยงเชื้อ S พบว่าโคโลนีที่ผ่านการบ่มใน PEG และเจริญได้ในอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะโคโลนี 2 แบบ คือ

1. มีลักษณะโคโลนีเหมือนกับเชื้อยีสต์ *C.oleophila* และให้บริเวณใสในอาหารเลี้ยงเชื้อ C สามารถคำนวณค่า Potency Index ได้จากสมการ 3.1 แสดงตารางในภาคผนวก ง ข้อ 4 และข้อ 5

2. ลักษณะโคโลนีเหมือนกับเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* และให้บริเวณใสในอาหาร S คำนวณค่า Potency Index ได้จากสมการ 3.1 แสดงในภาคผนวก ง ข้อ 6 และ ข้อ 7

ผลการทดลองพบโคโลนีแบบที่ 1 ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C. oleophila* มีจำนวนมากกว่าโคโลนีแบบที่ 2 และในการทดสอบลูกผสมในอาหาร C และ อาหาร S ไม่พบลูกผสมที่สามารถให้บริเวณใสในอาหาร ทั้ง 2 ชนิดที่ตำแหน่งเดียวกัน แต่พบโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C. oleophila* และให้บริเวณใสในอาหาร C กว้างกว่า โดยการคัดเลือกเปรียบเทียบกับค่า Potency Index ของเชื้อ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ในสารละลาย PEG ตามขั้นตอนดังนี้

จากการวัดค่า Potency Index ของเชื้อ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG (ภาคผนวก ง ข้อ 2) มีค่าเฉลี่ยของ ค่า Potency Index ($\overline{X}$) เท่ากับ 1.16 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.05 คำนวณค่า $\overline{X}$ + nSD เพื่อใช้เป็นค่าคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C. oleophila* หลังผ่านการบ่มใน PEG แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 $\bar{X}$, $\bar{X}$+S,..., $\bar{X}$+10SD ของค่า potency index ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการบ่มใน PEG ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร C

$\bar{X}$+ nSD ของค่า potency index	
$\bar{X}$	1.16
$\bar{X}$ + SD	1.21
$\bar{X}$ + 2SD	1.26
$\bar{X}$ + 3SD	1.31
$\bar{X}$ + 4SD	1.36
$\bar{X}$ + 5SD	1.41
$\bar{X}$ + 6SD	1.46
$\bar{X}$ + 7SD	1.51
$\bar{X}$ + 8SD	1.56
$\bar{X}$ + 9SD	1.61
$\bar{X}$ + 10SD	1.66

นำค่า $\bar{X}$, $\bar{X}$+SD,...,$\bar{X}$+10SD คำนวณได้ในตารางที่ 3.2 ไปเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C. oleophila* ที่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ในสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 3.3 และการหลอมโพรโทพลาสท์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 3.4 โดยค่าที่แสดงในตารางได้จากการสุ่มตัวอย่างโคโลนีที่เจริญในอาหาร CRM จำนวน 100 โคโลนี

ตารางที่ 3.3 ความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD,...,$\overline{X}$+10SD ของเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะ เหมือนเชื้อ *C. oleophila* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสท์ ระหว่างเชื้อ *C. oleophila* กับเชื้อ *E. fibuligera* ด้วยสารละลาย PEG ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยแปรระยะเวลาบ่ม 20, 30, และ 40 นาที ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร C

จำนวนความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วงต่างๆ อุณหภูมิที่ใช้บ่มในสารละลาย PEG 27 องศาเซลเซียส			
ช่วงของค่า Potency Index	20 นาที	30 นาที	40 นาที
$\overline{X}$ = 1.16	70	21	30
$\overline{X}$ + SD = 1.21	11	26	16
$\overline{X}$ + 2SD = 1.26	3	7	10
$\overline{X}$ + 3SD = 1.31	6	14	9
$\overline{X}$ + 4SD = 1.36	1	13	11
$\overline{X}$ + 5SD = 1.41	1	10	9
$\overline{X}$ + 6SD = 1.46	0	3	4
$\overline{X}$ + 7SD = 1.51	0	5	4
$\overline{X}$ + 8SD = 1.56	0	0	2
$\overline{X}$ + 9SD = 1.61	0	0	1
$\overline{X}$ + 10SD = 1.66	0	0	4

จากตารางที่ 3.3 พบว่าสภาวะการหลอมโพรโทพลาสท์ที่ 27 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่มนาน 40 นาที ให้โคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ที่มีค่า Potency Index ในช่วงตั้งแต่ $\overline{X}$ + 6SD ถึง $\overline{X}$ + 10SD มีจำนวนรวมทั้งหมดเท่ากับ 15 โคโลนี ซึ่งสูงกว่าการหลอมที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 และ 30 นาที

ในการหลอมโพรโทพลาสท์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส คำนวณค่า Potency Index แสดงในตารางข้อ 5 ภาคผนวก ง เมื่อนำข้อมูลมาจัดช่วง ของค่า Potency Index ของเชื้อที่มีลักษณะเหมือน *C. oleophila* มีความถี่ดังแสดงในตารางที่ 3.4

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

จำนวนความถี่ของโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index ในช่วงต่างๆ อุณหภูมิที่ใช้บ่มในสารละลาย PEG 20 องศาเซลเซียส			
ช่วงของค่า Potency Index	20 นาที	30 นาที	40 นาที
$\bar{X}$ = 1.16	26	27	53
$\bar{X}$ + SD = 1.21	15	14	15
$\bar{X}$ + 2SD = 1.26	5	10	14
$\bar{X}$ + 3SD = 1.31	8	10	3
$\bar{X}$ + 4SD = 1.36	7	9	5
$\bar{X}$ + 5SD = 1.41	6	7	4
$\bar{X}$ + 6SD = 1.46	4	3	0
$\bar{X}$ + 7SD = 1.51	5	2	1
$\bar{X}$ + 8SD = 1.56	3	1	0
$\bar{X}$ + 9SD = 1.61	4	2	1
$\bar{X}$ + 10SD = 1.66	4	8	1

จากตารางที่ 3.4 พบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาทีจะให้โคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* มีค่า Potency Indexในช่วงตั้งแต่ $\bar{X}$ + 6SD ถึง $\bar{X}$ + 10SD มีจำนวนรวมทั้งหมดเท่ากับ 20 โคโลนี ซึ่งสูงกว่าการหลอมที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 40 นาที เมื่อบ่มในสารละลาย PEG นานขึ้น จำนวนโคโลนีที่มีค่า Potency Index สูงมีค่าลดลง

จากข้อมูลที่ได้ในตารางที่ 3.3 และ 3.4 โดยสรุปเปรียบเทียบจำนวนลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ที่มีค่า Potency Index อยู่ในช่วง $\bar{X}$ + 6SD ถึง $\bar{X}$ + 10SD ในภาวะการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วย PEG ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ 27 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 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

เวลา (นาที)	อุณหภูมิ 20°C	อุณหภูมิ 27°C
	จำนวนโคโลนี	จำนวนโคโลนี
20	20	0
30	16	8
40	3	15

นำจำนวณโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C.oleophila* ที่แสดงในตารางที่ 3.5 มาคำนวณค่า fusion frequencyจากสมการที่ 3.2

$$\text{fusion frequency} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีลูกผสมในตารางที่ 3.5}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ทั้งหมดที่เจริญกลับมาเป็นเซลล์}}$$

ผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.6

คำว่า ลูกผสม ในที่นี้ คือ โคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างเชื้อยีสต์ *C. oleophila* และ *E. fibuligera* โดยมีค่า Potency Index สูงกว่า $\overline{X}$+5SD ในวันที่ 5 ของการทดสอบ

ตารางที่ 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

เวลา (นาที)	fusion frequency (x 10^{-2})	
	อุณหภูมิ 20 ° C	อุณหภูมิ 27 ° C
20	20	0
30	16	8
40	3	15

จากตารางที่ 3.6 พบว่าที่ภาวะการหลอมโพรโทพลาสท์ ของ *C. oleophila* กับ *E.fibuligera* ด้วยสารละลาย 30 % PEG (น้ำหนักโมเลกุล 4000) จะให้ลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2 ที่ภาวะการหลอมที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่มนาน 20 นาที มีลักษณะโคโลนีแสดงดังรูปที่ 3.2 และพบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ที่อุณหภูมินี้เป็นระยะเวลานานจะทำให้ค่า fusion frequency ลดลง

สำหรับการหลอมโพรโทพลาสท์ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสพบว่า เมื่อบ่มในสารละลาย PEG เป็นระยะเวลานานขึ้น จะทำให้เกิดลูกผสมได้สูงขึ้นมีลักษณะโคโลนีแสดงดังรูปที่ 3.3 แต่การเจริญกลับมาเป็นเซลล์ของโพรโทพลาสท์ก็จะลดลง จากตารางที่ 3.1 ซึ่ง Peberdy(1976) รายงานว่า ที่ความเข้มข้นสูง PEG จะเป็นพิษกับโพรโทพลาสท์ และการบ่มโพรโทพลาสท์ ใน PEGนานเกินไปจะมีผลทำให้โพรโทพลาสท์ มีชีวิตรอดน้อย และมีค่า fusion frequency ต่ำลงด้วย

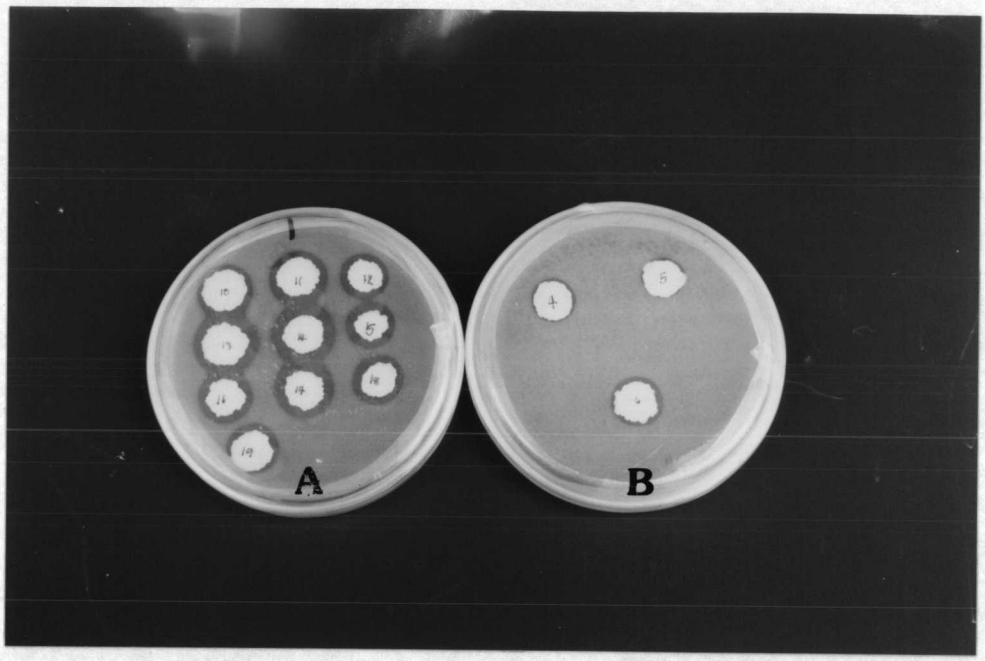
โคโลนีแบบที่ 2 ซึ่งมีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* พบว่ามีจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารทดสอบ S จำนวนน้อยมากซึ่งอาจเนื่องมาจากการเจริญกลับเป็นเซลล์ของโพรโพลาสท์ของ *E. fibuligera* ในบทที่ 2 มีค่าต่ำกว่า การเจริญกลับเป็นเซลล์ของ *C. oleophila* ดังผลการทดลองที่แสดงในบทที่ 2 ตารางที่ 2.5

เมื่อศึกษาการเกิดลูกผสมเทียบกับเชื้อ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่าน PEG ตามขั้นตอนโดยการเปรียบเทียบจากค่าเฉลี่ยของค่า Potency Index ($\overline{X}$) ของเชื้อ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่าน PEG (ภาคผนวก ง ข้อ 3) ซึ่ง เท่ากับ 2.18 และมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เป็น 0.17 โดยนำค่าที่ได้นี้มาจัดช่วงเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสม ดังแสดงในตารางที่ 3.7

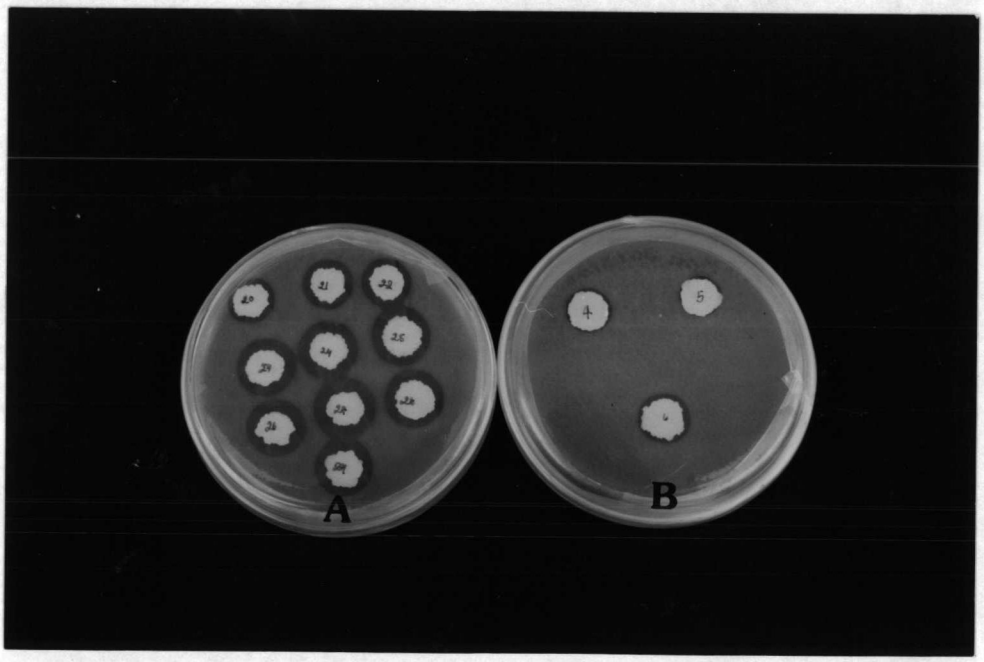
ตารางที่ 3.7 $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD, ...,$\overline{X}$ +10SD ของค่า potency index ของเชื้อ *E.fibuligera* ที่ไม่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG ในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร S

$\overline{X}$+nSD ของค่าPotency Index	
$\overline{X}$	2.18
$\overline{X}$ + SD	2.35
$\overline{X}$ + 2SD	2.52
$\overline{X}$ + 3SD	2.69
$\overline{X}$ + 4SD	2.86
$\overline{X}$ + 5SD	3.03
$\overline{X}$ + 6SD	3.20
$\overline{X}$ + 7SD	3.37
$\overline{X}$ + 8SD	3.54
$\overline{X}$ + 9SD	3.71
$\overline{X}$ + 10SD	3.88

จากข้อมูลในตารางที่ 3.7 นำค่า $\overline{X}$ +nSD มาเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* ในการจัดช่วงความถี่ของค่า Potency Index (ภาคผนวก ง ข้อ 6, ข้อ 7) ซึ่งได้ข้อมูลแสดงในตารางที่ 3.8



รูปที่ 3.2 โคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C.oleophila* ที่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG-4000 (30%) อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เวลานาน 20 นาที (A) เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. oleophila* NNU 62 ที่เป็น control (B) เลี้ยงในอาหารทดสอบ C เป็นเวลา 5 วัน



รูปที่ 3.3 โคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C . oleophila* ที่ผ่านการบ่มในสารละลาย PEG-4000 (30%) อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เวลานาน 40 นาที (A) เปรียบเทียบกับเชื้อ *C. oleophila* NNU 62 ที่เป็น control (B) เลี้ยงในอาหารทดสอบ C เป็นเวลา 5 วัน

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

จำนวนความถี่ของโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index ในช่วงต่างๆ						
ช่วงของค่า Potency Index	อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิ 27องศาเซลเซียส		
	20 นาที	30 นาที	40 นาที	20 นาที	30 นาที	40 นาที
$\overline{X}$ = 2.18	4	3	-	3	-	-
$\overline{X}$ + SD = 2.35	4	2	1	3	-	-
$\overline{X}$ + 2SD= 2.52	4	1	1	2	1	-
$\overline{X}$ + 3SD= 2.69	1	1	-	-	-	-
$\overline{X}$ + 4SD= 2.86	-	-	-	-	-	-
$\overline{X}$ + 5SD= 3.03	-	-	1	-	-	-
$\overline{X}$ + 6SD= 3.20	-	-	-	-	-	-
$\overline{X}$ + 7SD= 3.37	-	-	-	-	-	-
$\overline{X}$ + 8SD= 3.54	-	-	-	-	-	-
$\overline{X}$ + 9SD= 3.71	-	-	-	-	-	-
$\overline{X}$ + 10SD= 3.88	-	-	-	-	-	-

จากตารางที่ 3.8 พบว่าค่า Potency Index ของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการบ่มใน PEG แล้วให้บริเวณใสในอาหารทดสอบ S มีลักษณะโคโลนีเหมือนกับเชื้อยีสต์ *E . fibuligera* มีจำนวนน้อย ทั้งที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และไม่พบโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index สูงกว่า $\overline{X}$ + 5SD (3.03) แต่พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เวลาบ่ม 40 นาที จะได้โคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$ + 5SD (3.03) ส่วนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลานานขึ้น จะเกิดโคโลนีลักษณะนี้น้อยมากและที่เวลาบ่มนาน 40 นาที ไม่พบโคโลนีเจริญในอาหารทดสอบ S เลย

สรุป

การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* กับเชื้อยีสต์ *E . fibuligera* โดยใช้สารละลาย PEG หลังการทดสอบในอาหาร C และอาหาร S ไม่พบโคโลนีลูกผสมที่สามารถสร้างทั้งเอนไซม์อะไมเลส และผลิตกรดมะนาวได้พร้อมกัน แต่พบโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อยีสต์ *C. oleophila* และให้บริเวณใสในอาหาร C กว้าง และเร็วกว่าเชื้อ *C. oleophila* NNU 62 โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2 เมื่อบ่มใน PEG ระยะเวลานาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามไม่พบลูกผสมที่มีลักษณะเช่นเดียวกับ เชื้อ *E. fibuligera* ที่สามารถย่อยแป้งได้สูงขึ้น

นอกจากนี้พบว่าเมื่อระยะเวลาในการบ่มโพรโทพลาสท์ใน PEG นานเกินไปจะมีผลทำให้โพรโทพลาสท์มีอัตราการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ลดลงและมีค่า fusion frequency ลดลงด้วย อีกทั้งอุณหภูมิขณะหลอมโพรโทพลาสท์ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำจะให้ค่า fusion frequency สูงกว่าที่อุณหภูมิสูง