บทที่ 5

การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* NNU 62

จากการหลอมโพรโทพลาสท์ระหว่าง *C.oleophila* NNU 62 กับ *E.fibuligera* ATCC 9947 ดังผลการทดลองในบทที่ 4 เกิดโคโลนีที่มีลักษณะโคโลนีเหมือนกับเชื้อยีสต์ *C.oleophila* และให้บริเวณใสในอาหารทดสอบ C ได้กว้าง และเร็วกว่าเชื้อ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า จึงคาดว่าอาจจะเกิดจากการผสมกันเอง ในบทนี้จึงจะทดลองทำการหลอมโพรโทพลาส์ซึ่งสามารถจะเกิดได้ง่ายเพราะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อย

มีผู้ศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* (Fournier และคณะ, 1977) *Candida utilis* (Delgado และ Herrera, 1979) *Candida albicans* (Evan และคณะ, 1982) แต่ยังไม่มีรายงานผลการศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* งานวิจัยนี้จึงจะศึกษาการหลอมรวมกันของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* กับตัวของมันเองเพื่อพิสูจน์โคโลนีที่ได้ในบทที่ 4 นั้น ส่วนหนึ่งเกิดจากการรวมตัวของเชื้อชนิดเดียวกันหรือไม่

วิธีการทดลอง

ตามขั้นตอนโดยละเอียดในบทที่ 4 ภาวะที่ใช้กระตุ้นด้วยไฟฟ้า จะใช้ภาวะกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์มาเรียงตัวกันโดยใช้ไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ ขนาดสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยไฟฟ้ากระแสตรงกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์หลอมกันโดยใช้สัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ขนาดสนามไฟฟ้า 5 kV/cm กระตุ้น 10 ครั้ง ขนาดห้องบรรจุเซลล์ 2 มิลลิเมตร (chamber)

ผลการทดลอง

หลังจากผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร CRM นับจำนวนโคโลนีของโพรโทพลาสท์ที่เจริญกลับมาเป็นเซลล์ สามารถคำนวนค่าเปอรเซ็นต์ regeneration frequency จากสมการที่ 2.1แสดงในตารางที่ 5.1

ตารางที่ 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

$MgCl_2$ (mM) / $CaCl_2$ (mM)	%regeneration frequency ($\times 10^{-2}$)					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	2.04	1.89	1.55	4.68	0.48	2.28
0.1	4.40	3.60	3.45	6.73	4.75	8.79
0.3	0.89	0.82	2.91	7.24	3.29	4.66
0.5	2.39	1.51	2.89	0.45	2.76	1.02
0.7	1.68	2.35	5.42	6.51	4.66	4.34
0.9	2.67	4.14	3.63	3.26	4.13	2.01

จากตารางที่ 5.1 พบว่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของการหลอมโพรโทพลาสท์ของ *C. oleophila* เพียงชนิดเดียวจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila*กับ *E.fibuligera* ที่กระตุ้นด้วยไฟฟ้าภาวะเดียวกันนี้ ในตารางที่ 4.12

การคัดเลือกลูกผสมใช้ค่า $\overline{X}$+5SD ของ *C. oleophila* (จากผลการทดลองหลอมโพรโทพลาสท์ในบทที่ 4) ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (ภาคผนวก จ ข้อ 21) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.495 เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสมที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ โดยในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ จะแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0-0.9 mM และแมกนีเซียมอิออน 0-0.9 mM

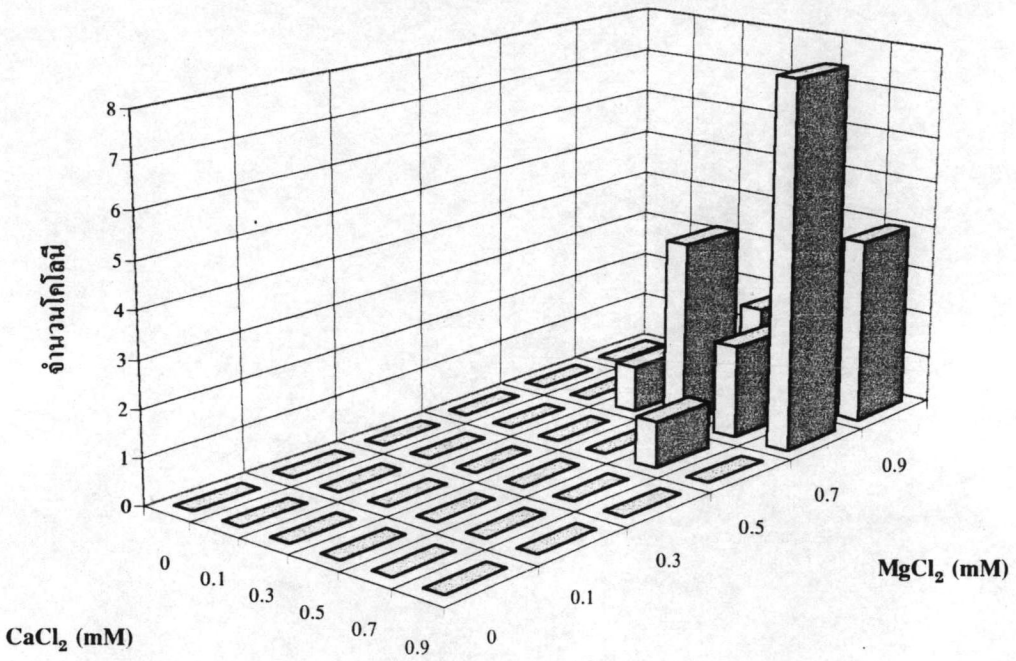
คัดเลือกโคโลนีที่มีค่า Potency Index สูงกว่า 1.495 ในแต่ละภาวะที่ศึกษา (ภาคผนวก จ. ข้อ 22 - ข้อ 24)แสดงจำนวนลูกผสมในตารางที่ 5.2

ตารางที่ 5.2 จำนวนโคโลนีลูกผสม *C. oleophila* ที่มีค่า Potency Index สูงกว่า 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 โดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์

จำนวนโคโลนี						
$CaCl_2$ (mM)	$MgCl_2$ (mM)					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-
0.3	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	1	-
0.7	-	-	1	4	2	8
0.9	-	-	-	2	2	4

จากตารางที่ 5.2 และกราฟรูปที่ 5.1พบว่าภาวะที่เกิดโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index สูงกว่า $\overline{X}$ + 5SD (1.495) จำนวนมากที่สุดคือ ในสารละลายแคลเซียมอิออน 0.7 mM และแมกนีเซียม 0.9 mM เมื่อนำจำนวนโคโลนีลูกผสมในตารางที่ 5.2 ไปคำนวณค่า fusion frequency ตามสมการที่ 3.2 ได้ค่า fusion frequency ดังแสดงในตารางที่ 5.3

โคโลนีที่มีค่า Potency Index สูงกว่า $\overline{X}$ + 5SD ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* แสดงในตารางที่ 5.2 จะพบโคโลนีลักษณะนี้กระจายอยู่ในภาวะที่ใช้สารละลาย ในการหลอมโพรโทพลาสท์ มีความเข้มข้นเกลือค่อนข้างสูงเช่นเดียวกันผลการทดลองในบทที่ 4 กรณีของการศึกษาที่ภาวะกระตุ้นด้วยไฟฟ้ากระแสสลับขนาดสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยไฟฟ้ากระแสตรงขนาดสนามไฟฟ้า 5 kV/cm



รูปที่ 5.1 แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นแคเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออน และจำนวนโคโลนีที่มีค่า Potency Index สูงกว่า 1.495

ตารางที่ 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

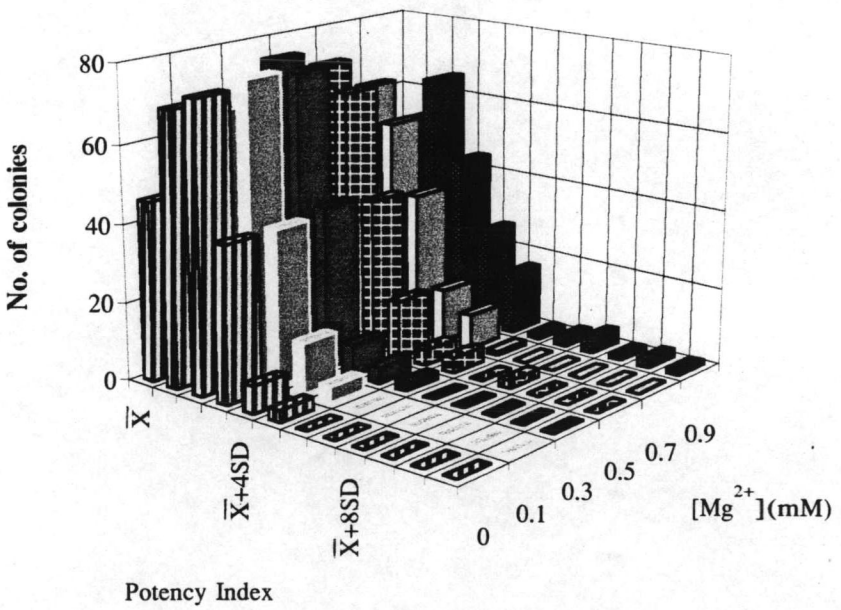
fusion frequency x 10^{-2}						
$CaCl_2$ (mM)	$MgCl_2$ (mM)					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-
0.3	-	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	13.3	-
0.7	-	-	3.3	13.3	6.7	26.7
0.9	-	-	-	6.7	6.7	13.3

จากตารางที่ 5.3 พบว่าภาวะที่เกิดโคโลนีที่มีลักษณะให้ค่า Potency Index สูงกว่า 1.495 คือสารละลายที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน 0.7 mM และแมกนีเซียมอิออน 0.9 mM มีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.27 ซึ่งเป็นภาวะที่พบจำนวนโคโลนีลูกผสม มากที่สุด

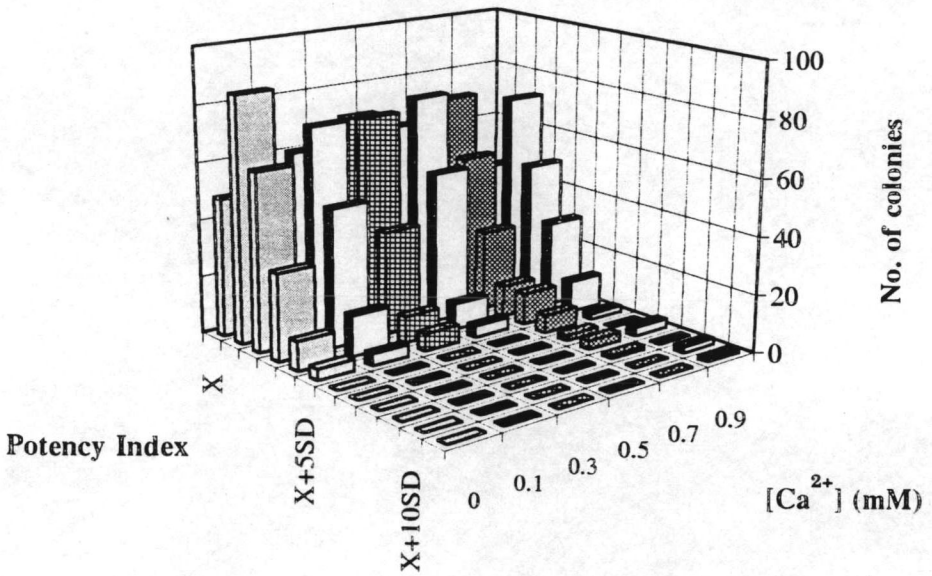
จากผลการทดลองนี้จะพบลูกผสมในภาวะที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมและแมกนีเซียมอิออนความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 0.3 - 0.5 mM ขึ้นไปพบว่า fusion frequency ในการหลอมโพรโทพลาสท์ *C.oleophila* เพียงชนิดเดียวมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 0.27 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า fusion frequency ของการหลอมโพรโทพลาสท์ *C.oleophila* กับ *E.fibuligera* และเกิดโคโลนีลักษณะเหมือนกับ เชื้อ *C.oleophila* มีค่า Potency Index สูงกว่า $\overline{X}$ + 5SD ในภาวะการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้าเท่ากันในบทที่ 4

ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ ความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออนในสารละลายที่ใช้หลอมโพรโทพลาสท์กับการกระจายของค่า Potency Indexของโคโลนีที่ได้จากการหลอมด้วยไฟฟ้า แสดงในกราฟรูปที่ 5.2

จากกราฟรูปที่ 5.2 (ก) และ(ข) การกระจายของค่า Potency Index ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแล้ว พบว่ากลุ่มของโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index สูงจะพบในภาวะการหลอมโพรโทพลาสท์ในสารละลายที่มีเกลือแคลเซียมอิออน มีความเข้มข้น 0.7 - 0.9 mM และมีเกลือแมกนีเซียมอิออน มีความเข้มข้น 0.5 - 0.9 mM



รูปที่ 5.2 (ก) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Potency Index ของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้าภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm กับความสัมพันธ์ของแมกนีเซียมอิออนในสารละลายที่ใช้หลอมโพรโทพลาสท์ ความเข้มข้น 0 -0.9 mM



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

สรุป

การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* ที่ภาวะกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าความเข้มสูง จะเกิดโคโลนีที่สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้น ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่มีเกลือแคลเซียมคลอไรด์ และแมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง 0.3-0.9 mM

ดังนั้นจึงอาจจะกล่าวได้ว่าผลการทดลองในบทที่ 4 ที่ได้เชื้อยีสต์ที่มีลักษณะคล้าย *C. oleophila* และ มีความสามารถในการสร้างกรดได้สูงขึ้น นั้น เกิดจากการหลอมกันเองของเชื้อยีสต์ *C. oleophila*