บทที่ 6

การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATTC 9947

จากการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อ *E. fibuligera* กับ *C.oleophila* ในการทดลองข้อ 6. ในบทที่ 4 พบโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ดีขึ้น การทดลองขั้นนี้จึงได้ทำการศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อ *E. fibuligera* กับตัวของมันเองโดยกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแรงดันสูงและใช้ความเข้มสนามไฟฟ้ากระแสสลับขนาดเท่าเดิม คือ 150 V/cm ความถี่ 1 MHz แต่เพิ่มไฟฟ้ากระแสตรงให้สูงขึ้นมีความเข้มสนามไฟฟ้าเท่ากับ 5 kV/cm กระตุ้น 10 ครั้งซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมในบทที่ 4

วิธีการทดลอง

เตรียมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ตามวิธีการในบทที่ 2 ภาวะที่ใช้คือย่อยด้วยเอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ระยะเวลานาน 30 นาที หลังจากนั้นนำมากระตุ้นด้วยไฟฟ้า ตามขั้นตอนในบทที่ 4 โดยใช้ภาวะทำให้โพรโทพลาสท์มาเรียงตัวกันด้วยไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ สนามไฟฟ้าขนาด 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยไฟฟ้ากระแสตรงคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมสนามไฟฟ้าขนาด 5 kV/cm และนำไปเลี้ยงในอาหาร CRM จนโพรโทพลาสท์ เจริญขึ้นเป็นเซลล์จึงนำไปเพาะเลี้ยง ทดสอบในอาหารแป้ง แบบ multiple point ตามวิธีการโดยเฉพาะละเอียดที่กล่าวแล้ว ในบทที่ 4 วัดขนาดเส้นผ่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใส ในวันที่ 5 ของการทดสอบ คำนวนค่า Potency Index ตามสมการที่ 3.1

ผลการทดลอง

สามารถคำนวนค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสท์ที่เจริญขึ้นมาเป็นเซลล์หลังผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว แสดงดังตารางที่ 6.1

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

% regeneration frequency ($\times 10^{-2}$)						
$CaCl_2$ (mM)	$MgCl_2$ (mM)					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	0.39	0.25	0.46	0.40	0.24	0.15
0.1	0.35	0.29	0.31	0.21	0.28	0.27
0.3	0.67	0.25	0.51	0.14	0.37	0.44
0.5	0.23	0.33	0.21	0.39	0.43	0.49
0.7	0.48	0.38	0.65	0.49	0.40	1.25
0.9	0.46	0.35	0.68	0.46	0.49	0.90

จากตารางที่ 6.1 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง มีค่าใกล้เคียงกับ ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของการหลอมโพรโทพลาสท์ *E. fibuligera* กับ *C.oleophila* ที่ภาวะ การกระตุ้นด้วยไฟฟ้านี้แสดงในตารางที่ 4.12

คำนวนค่า $\overline{X}$+5SD ของค่า PotencyIndex ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera*ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า จากตารางภาคผนวก จ ข้อ 25

คำนวณค่า $\overline{X}$+5SD ของค่า PotencyIndex ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ทไม่ผ่านกระแสไฟฟ้า ได้เท่ากับ 2.92 และใช้ค่า $\overline{X}$+5SD (2.92) เป็นค่าคัดเลือกลูกผสมจากค่า PotencyIndex ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ที่ผ่านกระแสไฟฟ้า (ในตารางภาคผนวก จข้อ 26 - ข้อ 28) พบจำนวนลูกผสมที่มีค่า PotencyIndex สูงกว่า 2.92 แสดงในตารางที่ 6.2

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

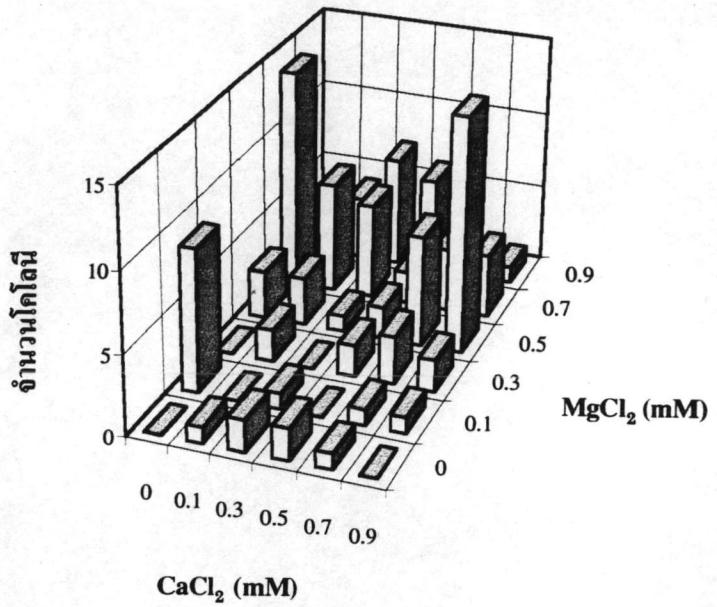
จำนวนโคโลนี						
$CaCl_2$ (mM)	$MgCl_2$ (mM)					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	0	1	2	2	1	-
0.1	9	-	1	-	1	1
0.3	-	2	-	2	3	2
0.5	3	3	1	2	7	15
0.7	14	7	6	2	4	4
0.9	2	4	7	6	1	1

จากตารางที่ 6.2 และกราฟรูปที่ 6.1 พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่เกิดโคโลนีลูกผสมของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ซึ่งสามารถย่อยแป้งได้สูงคือ การหลอมโพรโทพลาสท์ในสารละลายที่มีแคลเซียมอิออน ความเข้มข้น 0.5 mM และแมกนีเซียมอิออน 0.9 mM สามารถคำนวณค่า fusion frequency ได้จากสมการที่ 3.2 ในบทที่ 3 โดยมีค่าแสดงในตารางที่ 6.3

ตารางที่ 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

fusion frequency ($\times 10^{-2}$)						
$CaCl_2$ (mM)	$MgCl_2$ (mM)					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	3.3	6.7	6.7	3.3	-
0.1	30	-	3.3	-	3.3	3.3
0.3	-	6.7	-	6.7	10	6.7
0.5	10	10	3.3	6.7	23.3	50
0.7	46.7	23.3	20	6.7	13.3	13.3
0.9	6.7	13.3	23.3	20	3.3	3.3

จากตารางที่ 6.3 พบว่าภาวะที่เกิดลูกผสมซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงมีค่า fusion frequency สูงที่สุดคือ การหลอมโพรโทพลาสท์ในสารละลายที่มีแคลเซียมอิออน ความเข้มข้น 0.5 mM และแมกนีเซียมอิออน 0.9 mM มีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.5



รูปที่ 6.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Ca^{2+} อิออน กับ Mg^{2+} และจำนวนโคโลนีลูกผสมที่เกิดจากการหลอม โพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ด้วยไฟฟ้า150 V/cm AC; ความถี่ 1 MHz ; 5 kV/cm DC โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออน 0-0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์

การหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* โดยวิธี อิเล็กโทรฟิวชัน จะเกิดโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงขึ้นโดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.5 และพบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* เกิดโคโลนีที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้ดีขึ้นมีค่า fusion frequency ค่อนข้างสูงกว่าเชื้อ *C. oleophila* อาจเนื่องจากอยู่ในสภาพโพรโทพลาสท์ที่สมบรูณ์ ทำให้สามารถเกิดการหลอมรวมกันของโพรโทพลาสท์ได้ง่ายและมีโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อเดิมกระจายอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่มีแคลเซียมอิออน และแมกนีเซียมอิออนความเข้มข้นต่างๆ หลายความเข้มข้น ดังกราฟแสดงโคโลนีที่มีค่า Potency Index สูงกว่าเชื้อ *E.fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า รูปที่ 6.1

เมื่อศึกษาการกระจายของค่า potency indexของเชื้อ *E.fibuligera* ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าทั้งหมดจำนวนประมาณ 1100 โคโลนีที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่มีแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออนความเข้มข้น 0-0.9 mM เทียบกับค่า

$\overline{X}$,$\overline{X}$+SD,...$\overline{X}$+nSD ของเชื้อ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า มีจำนวนโคโลนีที่มีค่า potency index ในช่วงต่างๆดังตารางภาคผนวก จ ข้อ 26 - ข้อ 28 และนำจำนวนโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วงต่างๆ ในแต่ละความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออนมารวมกัน แสดงในตารางที่ 6.4 และ 6.5 ตามลำดับ เพื่อดูแนวโน้มของความเข้มข้นของเกลือทั้ง 2 ชนิดในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่ทำให้เกิดโคโลนีที่มีค่า Potency Index สูง

ตารางที่ 6.4 ความถี่ของโคโลนีเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่มีค่า Potency Index ในช่วง $\overline{X}$, $\overline{X}$+SD, ..., $\overline{X}$ + 10SD และค่าที่มากกว่า $\overline{X}$ + 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) โดยในแต่ละภาวะของการแปร $CaCl_2$ จะแปร $MgCl_2$ ความเข้มข้น 0-0.9(mM) ควบคู่ไปด้วย

ความเข้มข้นของเกลือ(mM) / ช่วงค่า PI	ความถี่จำนวนโคโลนี *E.fibuligera*					
	0 - 0.9 $MgCl_2$					
	0.$CaCl_2$	0.1 $CaCl_2$	0.3 $CaCl_2$	0.5 $CaCl_2$	0.7 $CaCl_2$	0.9 $CaCl_2$
$\overline{X}$ =2.17	13	17	9	6	3	17
$\overline{X}$+SD =2.32	19	44	27	17	12	25
$\overline{X}$+2SD=2.47	60	46	57	28	47	49
$\overline{X}$+3SD=2.62	39	47	65	44	62	57
$\overline{X}$+4SD=2.77	36	39	28	47	48	47
$\overline{X}$+5SD=2.92	18	15	18	37	35	27
$\overline{X}$+6SD=3.07	2	5	7	14	25	15
$\overline{X}$+7SD=3.22	3	4	2	6	5	1
$\overline{X}$+8SD=3.37	0	2	0	10	1	2
$\overline{X}$+9SD=3.52	0	1	0	1	0	0
$\overline{X}$+10SD=3.67	0	0	0	0	1	0
>3.67	0	1	0	0	1	0

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

ความถี่จำนวนโคโลนี *E.fibuligera*						
ความเข้มข้นของเกลือ(mM) / ช่วงค่า PI	0 - 0.9 $CaCl_2$					
	0$MgCl_2$	0.1$MgCl_2$	0.3$MgCl_2$	0.5$MgCl_2$	0.7$MgCl_2$	0.9$MgCl_2$
$\overline{X}$ =2.17	5	14	11	16	6	13
$\overline{X}$+SD =2.32	16	28	22	27	27	24
$\overline{X}$+2SD=2.47	45	42	40	44	65	51
$\overline{X}$+3SD=2.62	70	51	54	38	48	50
$\overline{X}$+4SD=2.77	44	45	43	47	44	23
$\overline{X}$+5SD=2.92	26	27	25	20	25	29
$\overline{X}$+6SD=3.07	14	13	11	8	7	12
$\overline{X}$+7SD=3.22	5	2	3	2	4	8
$\overline{X}$+8SD=3.37	2	1	0	3	4	5
$\overline{X}$+9SD=3.52	1	0	0	0	0	1
$\overline{X}$+10SD=3.67	0	0	1	0	0	0
>3.67	2	0	0	0	0	0

จากตารางที่ 6.4 เมื่อนับจำนวนรวมของลูกผสมที่มีค่า Potency Index สูงกว่า X+5SD (2.92) จะพบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของแคลเซียมอิออนสูงในช่วง 0.5-0.9 mM จะพบจำนวนลูกผสมมาก และจากตารางที่ 6.5 เมื่อนับจำนวนรวมของลูกผสม ที่มีค่า potency index สูงกว่า $\overline{X}$+5SD (2.92) จะพบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ในสารละลายที่มีแมกนีเซียมอิออน 0.9 mM จะพบจำนวนลูกผสมมากที่สุด

สรุป

ในบทนี้ได้ทำการทดสอบการหลอมเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* กับตัวของมันเองพบว่าเชื้อ *E. fibuligera* สามารถเกิดการหลอมกันเองได้ โดยพบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 5 kV/cn DC จะได้โคโลนีลูกผสมมีค่า fusion frequency สูงที่สุด เมื่อใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือแคลเซียม 0.5 mM และมีแมกนีเซียมความเข้มข้น 0.9 mMในสารละลาย

ดังนั้นจึงอาจจะกล่าวได้ว่าผลการทดลองในบทที่ 4 ที่ได้เชื้อยีสต์ที่มีลักษณะคล้าย *E. fibuligera* และ มีความสามารถในการย่อยแป้งได้สูงขึ้น นั้น เกิดจากการหลอมกันเองของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera*