บทที่ 2

การศึกษาภาวะของการเตรียมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 และเชื้อยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* ATCC 9947

การหลอมโพรโทพลาสท์ ต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์ของเซลล์ยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 ซึ่งสามารถผลิตกรดมะนาว กับเซลล์ยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* ATCC 9947 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาตัวแปรต่างๆ เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโทพลาสท์ของเซลล์ยีสต์ทั้งสองชนิดดังนี้

ก. ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Zymolyase ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์ยีสต์ออก ทำให้เซลล์ยีสต์ เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์

ข. ผลของระยะเวลาที่บ่มเซลล์ยีสต์ในเอนไซม์ Zymolyase

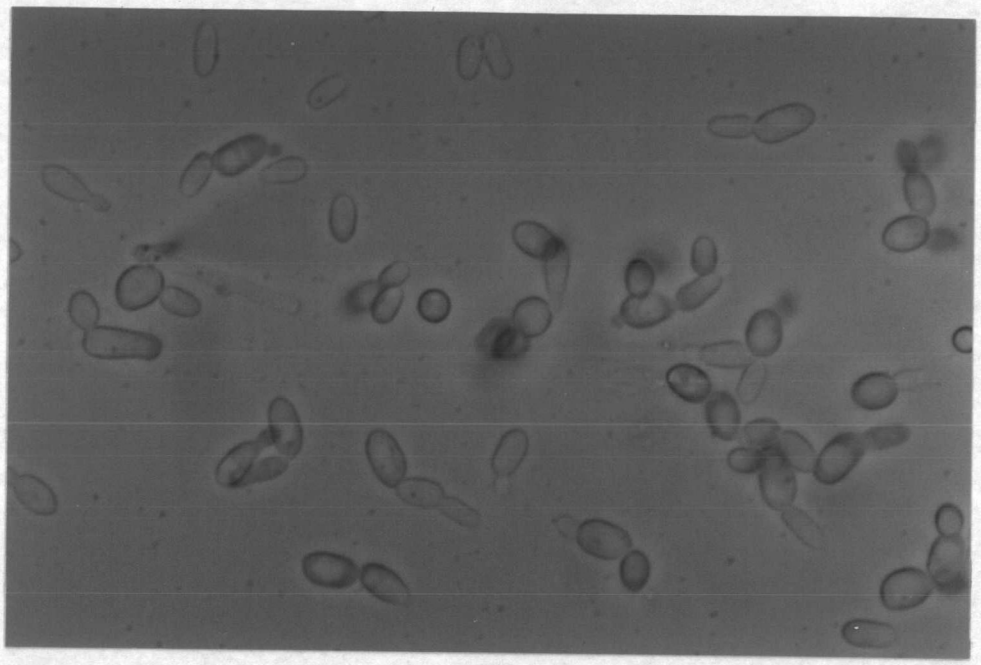
ค. ผลของการสร้างผนังเซลล์ใหม่และการเจริญเป็นโคโลนีของโพรโทพลาสท์

ในการศึกษาการเตรียมโพรโทพลาสท์ของเซลล์ยีสต์มีขั้นตอนดังนี้

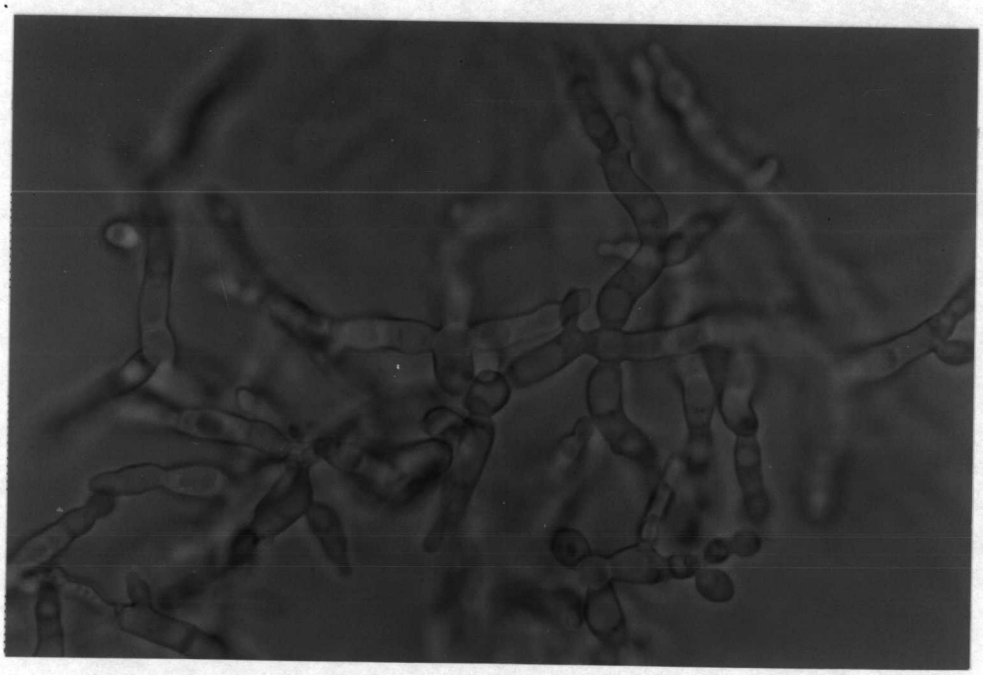
วิธีการทดลอง

1. วิธีการเตรียมโพรโทพลาสท์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ทั้ง *E. fibuligera* และ *C. oleophila* บน YM agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. แล้วนำมาเตรียมสารแขวนลอยของเซลล์ โดยทำให้เจือจาง 10 เท่า โดยใช้น้ำปลอดเชื้อ นำสารแขวนลอยของเชื้อยีสต์ แต่ละชนิดที่เตรียมได้ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 12 - 15 ชม. ซึ่งจะได้ *C. oleophila* มีลักษณะเซลล์ ดังรูปที่ 2.1 ที่ความหนาแน่นประมาณ 10^7 - 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และจะได้ *E.fibuligera* ดังรูปที่ 2.2 ซึ่ง เชื้อยีสต์



รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 ในระยะการเจริญ 12 ชม. ในอาหารเหลว YM (ขนาดกำลังขยาย 800 X)



รูปที่ 2.2 ลักษณะเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ในระยะเวลาการเจริญ 12 ชม. ในอาหารเหลว YM (ขนาดกำลังขยาย 800 X)

E. fibuligera มีลักษณะเป็นโครงร่างแห ทำให้ไม่สามารถนับโดยวิธี Direct count จึงต้องวัดจำนวนเซลล์ตั้งต้นเป็นค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.17 แยกเซลล์ยีสต์ออกโดยปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เติมสารละลาย KT ประมาณ 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ลงในเซลล์ที่ล้างแล้ว เขย่าให้เข้ากัน แยกเซลล์ยีสต์โดยปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนที่ใสทิ้ง เติมสารละลาย pretreatment (ภาคผนวก ข ข้อ 2) นำไปบ่มบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นจึงปั่นแยกเซลล์ เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายเอนไซม์ Zymolyase ปริมาณ 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 3) บ่มต่อไปพร้อมทั้งตรวจดูการสร้างโพรโทพลาสท์ ทุก 15 นาที โดยหยด สารแขวนลอย ของเซลล์บนสไลด์ด้านละหยด ด้านหนึ่งหยดน้ำลงไปบน สารแขวนลอย ของเซลล์ ส่วนอีกด้านหนึ่งจะหยดสารละลาย sorbitol เข้มข้น 1 โมลาร์(1.0 M sorbitol) สังเกตโพรโทพลาสท์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในสภาพที่มีน้ำเซลล์ที่เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์แล้วจะแตก เหลือเฉพาะเซลล์ที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ ส่วนในสภาพที่มี 1.0 M sorbitol โพรโทพลาสท์และเซลล์จะยังคงสภาพอยู่ได้ ติดตามผลโดยเก็บตัวอย่างที่เวลาบ่ม 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที จนเห็นว่าเซลล์ส่วนใหญ่เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ แล้วจึงนำมาแยกโพรโทพลาสท์ออกจากสารละลายเอนไซม์ โดยใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ล้างโพรโทพลาสท์ 2 ครั้งด้วย 1.0 M sorbitol แล้วนำมาทำ สารแขวนลอย ด้วย 1.0 M sorbitol ให้ได้ความหนาแน่น 10^{6}-10^{8} โพรโทพลาสท์/มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้โพรโทพลาสท์กระจาย

2 การหาค่า regeneration frequency ของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์แต่ละชนิด

2.1 นำ สารแขวนลอย ของโพรโทพลาสท์ 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้มีความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-4} เท่า ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรหยดลงบนผิวหน้าของ CRM agar (complete regeneration medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 2)ในจานเลี้ยงเชื้อ กระจายเชื้อด้วยแท่งแก้วให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร เททับด้วยอาหารชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นของวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยหลอมอาหารแล้วทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ ประมาณ 50 องศาเซลเซียส เอียงจานเลี้ยงเชื้อไปมา เพื่อให้เชื้อกระจายในอาหารที่ใช้เททับ ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนปรากฏโคโลนี นับจำนวนโคโลนีซึ่งจะเห็นโคโลนีที่เจริญจากเซลล์ที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ทั้งนี้เพราะเมื่อโพรโทพลาสท์ถูกทำให้เจือจางด้วยน้ำจะแตก

2.2 นำ สารแขวนลอย ของโพรโทพลาสท์ 0.1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย 1.0 M sorbitol ให้มีความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-4} เท่า ปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิว

หน้าของ CRM mediumในจานเลี้ยงเชื้อแล้วเททับด้วยอาหารชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นของวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ แทนโดยการหลอมอาหารแล้วทำให้เย็นจนมีอุณหภูมิ ประมาณ 50 องศาเซลเซียส เอียงจานเลี้ยงเชื้อไปมา เพื่อให้เชื้อกระจายในอาหารที่ใช้เททับ ตั้งทิ้งไว้จนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนปรากฏโคโลนี นับจำนวนโคโลนีซึ่งจะเป็นโคโลนีของเซลล์ยีสต์และ โพรโทพลาสท์

2.3 นำ สารแขวนลอย ของโพรโทพลาสท์ ที่เจือจางได้แล้วในข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 มานับจำนวนเซลล์ และโพรโทพลาสท์ ด้วยวิธี direct count ตามวิธีของ Townsend และ Lindgren (1953) (ภาคผนวก ค ข้อ 1) จำนวนโพรโทพลาสท์ที่เตรียมได้ คือค่าที่นับได้จากตัวอย่างที่ 2.1 - 2.2

นำค่าต่าง ๆ ที่ได้ในข้อ 2.1, 2.2 และ 2.3 มาหาค่า regeneration frequency และค่า efficiency ดังนี้

$$\% \text{ regeneration frequency} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ที่เจริญบน complete regeneration medium (2.2 - 2.1)}}{} \times 100$$

$$\% \text{ efficiency} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ ที่นับโดยวิธี direct count (2.3)}}{\text{เปอร์เซ็นต์ผลผลิต}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลผลิต} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ที่นับได้โดยวิธี direct count} \times 100}{\text{จำนวนเซลล์ตั้งต้น}}$$

ผลการทดลอง

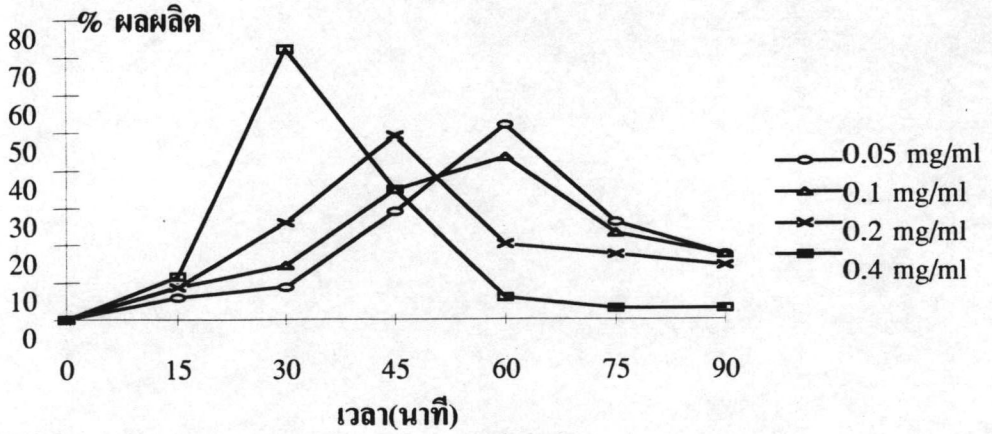
1. ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Zymolyase ที่มีต่อการย่อยผนังเซลล์และการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ของยีสต์ *Candida. oleophila* NNU 62

1.1 ในการทดลองได้ศึกษาการเตรียมโพรโทพลาสท์ด้วยการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยได้ทำการแปรความเข้มข้นของเอนไซม์ตั้งแต่ 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. และบ่มที่เวลา 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที นำตัวอย่างที่ได้มานับจำนวนโพรโทพลาสท์ด้วยวิธี direct count ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำมาคำนวณค่า % yield ของโพรโทพลาสท์เชื้อยีสต์ *C. oleophila* แสดงในตารางที่ 2.1

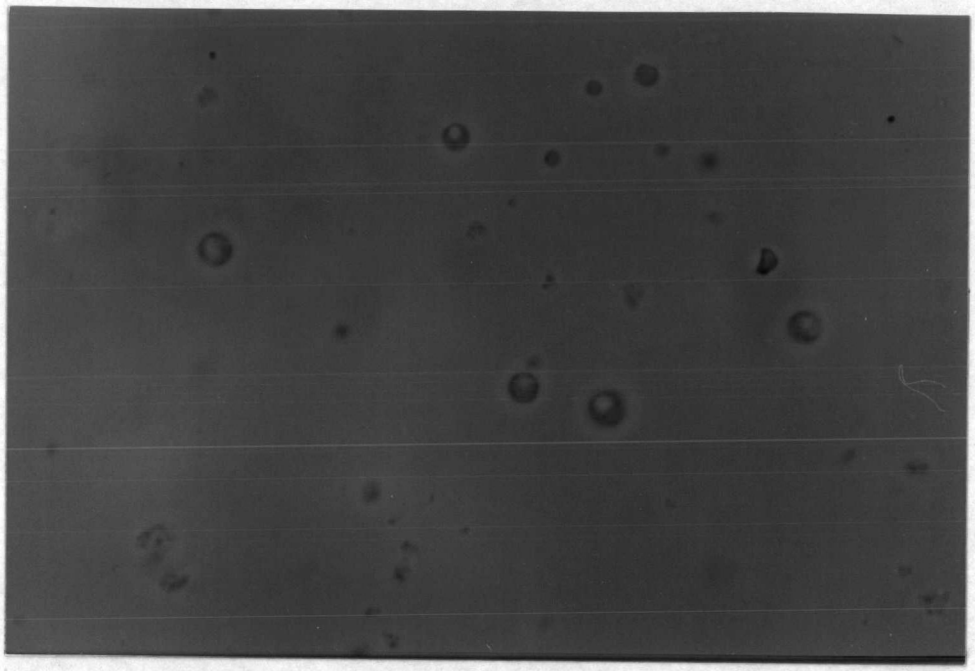
จากผลการทดลองตารางที่ 2.1 รูปที่ 2.3 พบว่าที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ Zymolyase 0.4 มก./มล. บ่มนาน 30 นาที สามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้เร็วที่สุด และให้เปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสท์สูงที่สุดคือ 72 เปอร์เซ็นต์ จากการสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าโพรโทพลาสท์เชื้อยีสต์ *C. oleophila* มีลักษณะ ดังรูปที่ 2.4 และเปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์เกือบหมด เมื่ออยู่ในน้ำจึงแตกเหลือเฉพาะเซลล์ยีสต์ที่ไม่เป็นโพรโทพลาสท์ ดังรูปที่ 2.5

ตารางที่ 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

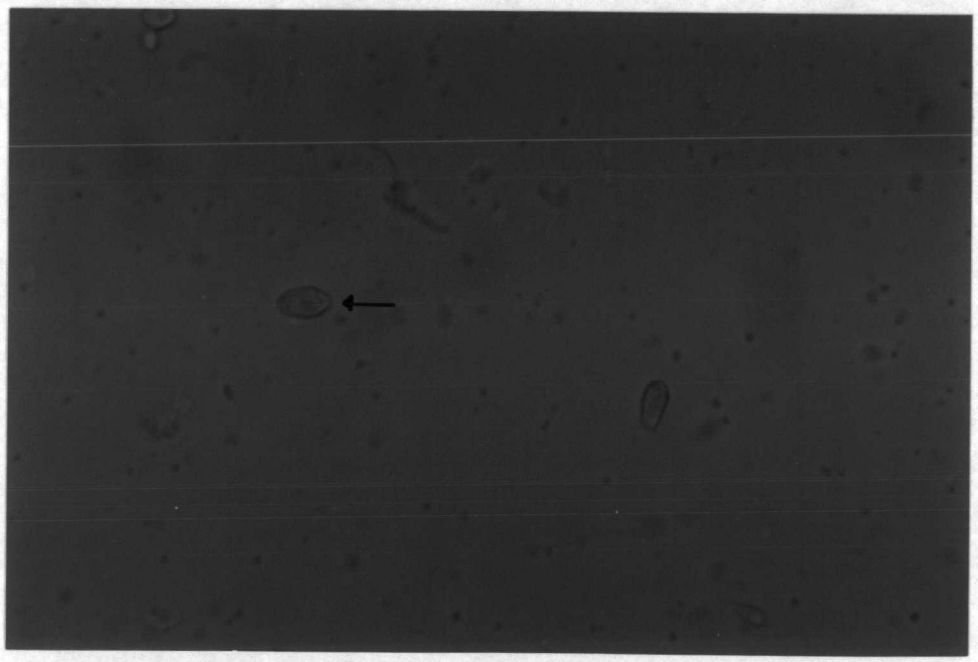
	% ผลผลิต						
ความเข้มข้นของ Zymolyase	เวลา (นาที)						
มก./มล.	0	15	30	45	60	75	90
0.05	0	5.78	8.67	28.9	52.02	26.01	17.34
0.1	0	8.67	14.45	34.68	43.35	23.12	17.34
0.2	0	8.67	26.01	49.13	20.23	17.34	14.45
0.4	0	11.06	72.05	34.68	5.78	2.89	2.89



รูปที่ 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



รูปที่ 2.4 ลักษณะของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 ที่อยู่ในสารละลายซอร์บิทอล 1 โมลาร์ (ขนาดกำลังขยาย 800 X)



รูปที่ 2.5 ลักษณะของโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Candida oleophila* NNU 62 ที่แตกเมื่ออยู่ในน้ำซึ่งปลายลูกศรคือ เซลล์ที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ และบริเวณรอบนอกเป็นโพรโทพลาสท์ที่แตก (ขนาดกำลังขนาย 800 X)

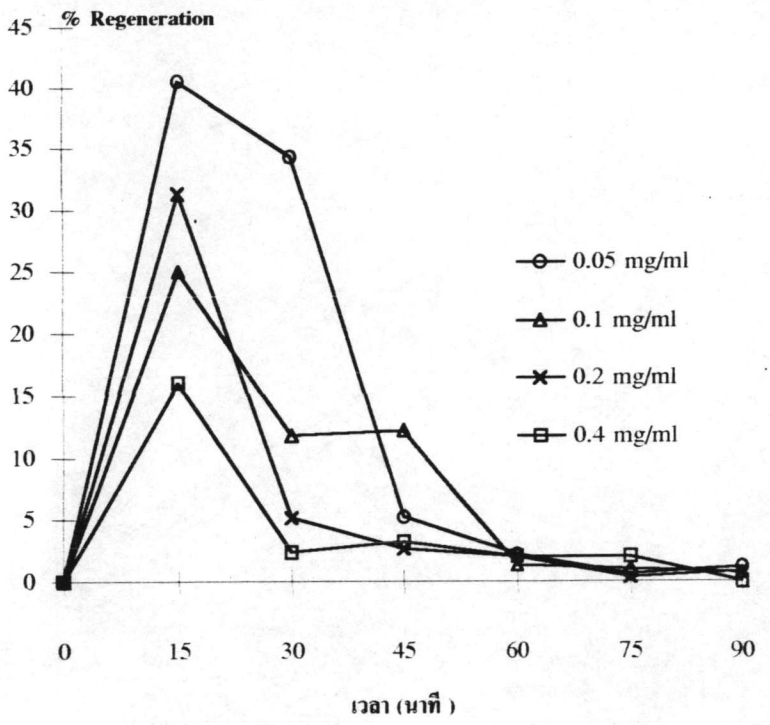
หลังจากนั้นนำโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* ที่เตรียมได้จากการบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และเวลาที่ใช้บ่ม 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาทีตามลำดับ ไปเลี้ยงใน CRM medium เพื่อให้โพรโทพลาสท์เจริญกลับมาเป็นเซลล์

1.2 การเจริญกลับมาเป็นของเซลล์โพรโทพลาสท์เชื้อยีสต์ *C. oleophila*

ผลการทดลองแสดงตารางที่ 2.2 และกราฟรูปที่ 2.6 พบว่าโพรโทพลาสท์ที่เตรียมจากการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ Zymolyase นั้น หากใช้เวลาในการบ่มเป็นระยะเวลาสั้น โพรโทพลาสท์ที่เตรียมได้ สามารถเจริญกลับมาเป็นเซลล์ยีสต์ ได้ในเปอร์เซ็นต์สูงกว่าโพรโทพลาสท์ที่บ่มในเอนไซม์เป็นระยะเวลานานและพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ยีสต์ก็จะลดลง

ตารางที่ 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

% regeneration frequency							
ความเข้มข้นของ Zymolyase	เวลา (นาที)						
มก./มล.	0	15	30	45	60	75	90
0.05	0	40.5	34.33	5.2	2.2	0.6	1.17
0.1	0	25	11.8	12.17	1.33	1	0.67
0.2	0	31.33	5.11	2.64	2	0.33	0.8
0.4	0	16	3.16	2.36	2	2	0



รูปที่ 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

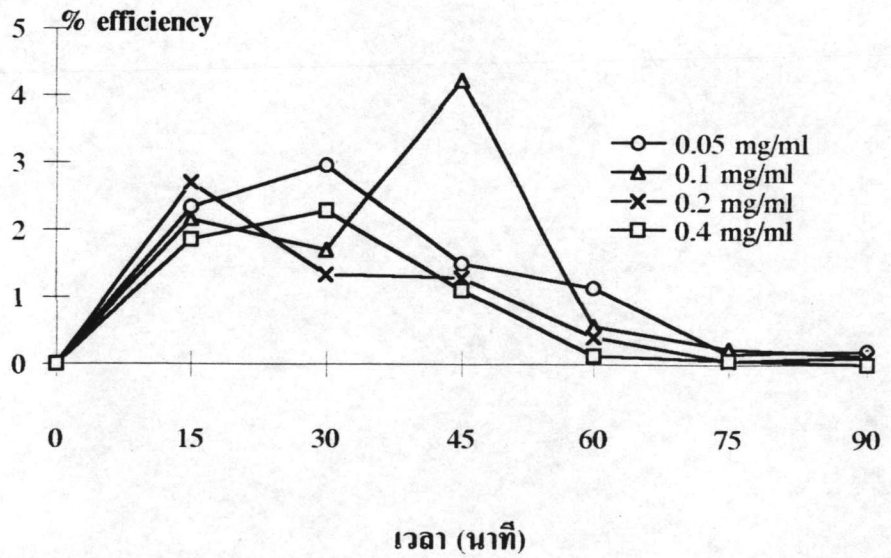
เมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของการเตรียมโพรโทพลาสท์ของ เชื้อยีสต์ *C. oleophila* ซึ่งแสดงในตารางที่ 2.3 และรูปที่ 2.7 สามารถคำนวณจากผลคูณของเปอร์เซ็นต์โพรโทพลาสท์(ตารางที่ 2.1) กับค่า % regeneration frequency (ตารางที่ 2.2) พบว่าภาวะที่ทำให้เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพสูงที่สุดคือ การบ่มเซลล์ในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. นาน 45 นาที ให้โพรโทพลาสท์ประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์มีค่าการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ 12 เปอร์เซ็นต์ มีค่าประสิทธิภาพของการเตรียมโพรโทพลาสท์ 4.2 เปอร์เซนต์ แต่จากกราฟในรูปที่ 2.3 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ในภาวะนี้เกิดโพรโทพลาสท์ขึ้นน้อยกว่าการบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. นาน 30 นาที เกือบ 2 เท่า

ถึงแม้ว่าการบ่มเซลล์ในเอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ระยะเวลานาน 30 นาที จะมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของการเตรียมโพรโทพลาสท์ มีค่า 2.28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าการบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. นาน 45 นาที ที่ได้ 4.2 เปอร์เซ็นต์

แต่จะให้จำนวนโพรโทพลาสท์มากกว่าเท่าตัว และในการหลอมโพรโทพลาสท์ ต้องใช้ปริมาณโพรโทพลาสท์ไม่ต่ำกว่า 10^{6} - 10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร จึงต้องการปริมาณโพรโทพลาสท์มากเพียงพอที่จะนำไปศึกษาในขั้นตอนการหลอมโพรโทพลาสท์ต่อไปได้

ตารางที่ 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

	%efficiency						
ความเข้มข้นของ	เวลา (นาที)						
Zymolyase มก./มล.	0	15	30	45	60	75	90
0.05	0	2.34	2.97	1.5	1.14	0.15	0.2
0.1	0	2.16	1.7	4.22	0.57	0.23	0.12
0.2	0	2.71	1.33	1.29	0.4	0.05	0.11
0.4	0	1.185	2.28	0.82	0.12	0.58	0



รูปที่ 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

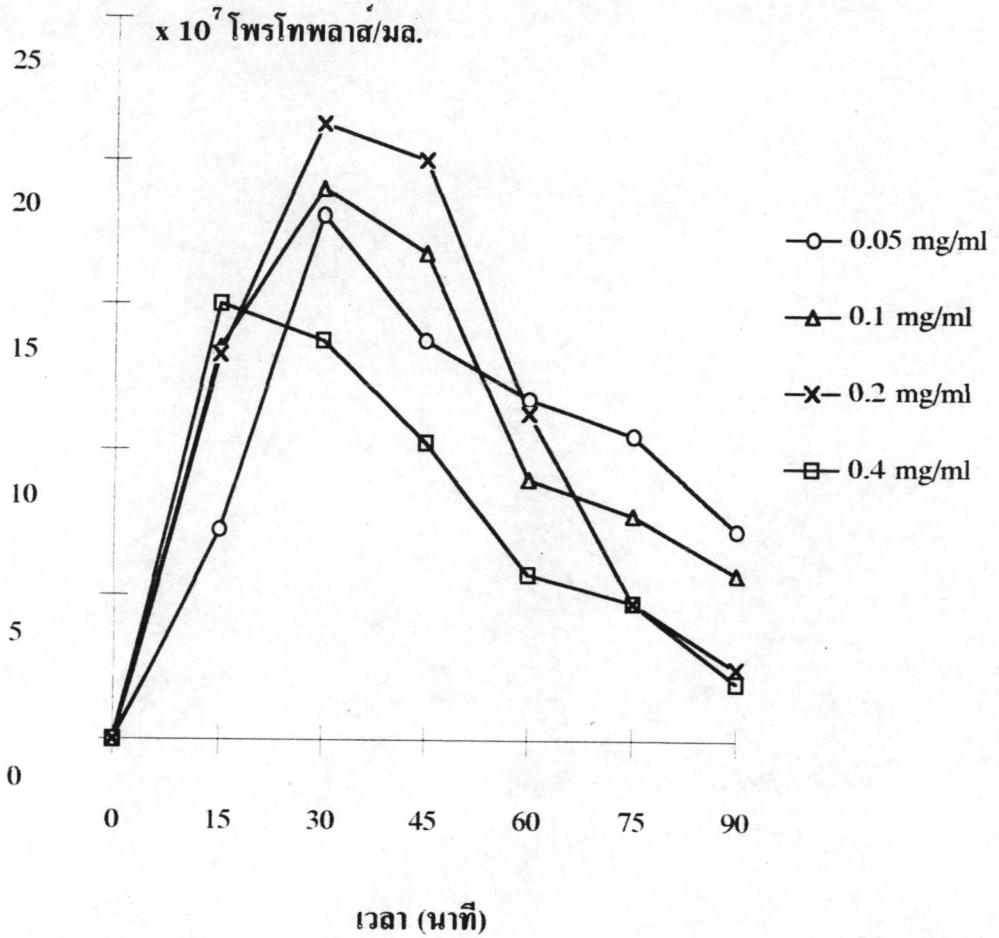
ในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้สภาวะการเตรียมโพรโทพลาสท์ของยีสต์ *C. oleophila* โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Zymolyase 0.4 มก./มล. ที่ระยะเวลาบ่มนาน 30 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโทพลาสท์ที่จะใช้ในขั้นตอนการหลอมโพรโทพลาสท์ ด้วยสารเคมีและการใช้กระแสไฟฟ้า ต่อไป

2.3 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ Zymolyase ที่มีต่อการย่อยผนังเซลล์ และการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ของยีสต์ *E. fibuligera*

ทำการย่อยผนังเซลล์โดยใช้เอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ดังวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที จากผลการทดลองดังตารางที่ 2.4 และกราฟรูปที่ 2.8 พบว่าในสภาวะความเข้มข้นของเอนไซม์ Zymolyase 0.2 มก./มล. บ่มเป็นระยะเวลานาน 30 นาที จะให้จำนวนโพรโทพลาสท์สูง ที่สุดคือ 2×10^8 โพรโทพลาสท์ ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. จะให้ปริมาณโพรโทพลาสท์ 1.9×10^8 ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าเล็กน้อย และจากการสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงในรูปที่ 2.10 (ก) และ รูปที่ 2.10 (ข) แสดงโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่แตกเมื่ออยู่ในน้ำ

ตารางที่ 2.4 จำนวนโพรโทพลาสท์ 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

จำนวนโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* x10^7 (protoplast/ml)							
ความเข้มข้นของ	เวลา(นาที)						
Zymolyase มก./มล.	0	15	30	45	60	75	90
0.05	0	7.25	18.05	13.75	11.75	10.05	7.05
0.1	0	13.5	19	16.05	9	7.75	5.75
0.2	0	13.05	21.25	20	11.25	4.75	2.5
0.4	0	15	13.75	10.25	5.75	4.75	2

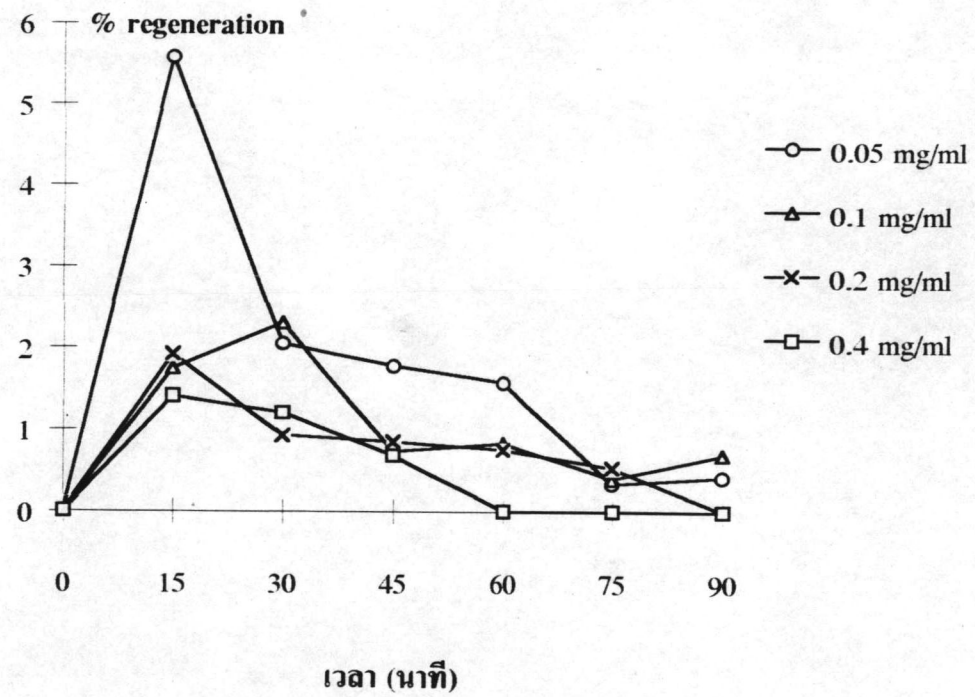


รูปที่ 2.8 กราฟแสดงจำนวนโพรโทพลาสท์ ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* เมื่อบ่มในเอนไซม์ Zymolyase ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15, 30, 45, 60, 75 และ 90 นาที

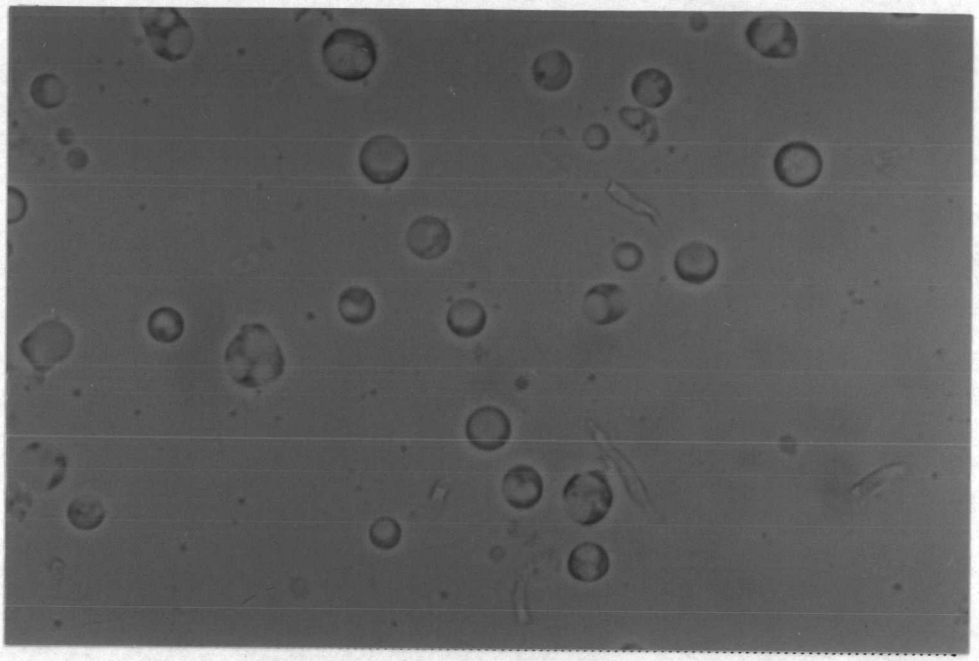
หลังจากนั้นนำโพรโทพลาสท์ที่เตรียมได้ไปเลี้ยงในอาหารสำหรับเจริญกลับมาเป็นเซลล์ (CRM) นับจำนวนโคโลนีของโพรโทพลาสท์ที่เจริญขึ้นมาในอาหารCRMและสามารถคำนวนค่าการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ของโพรโทพลาสท์ของยีสต์ *E. fibuligera* จากสมการที่ 2.1 ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2.5 และกราฟรูปที่ 2.9

ตารางที่ 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

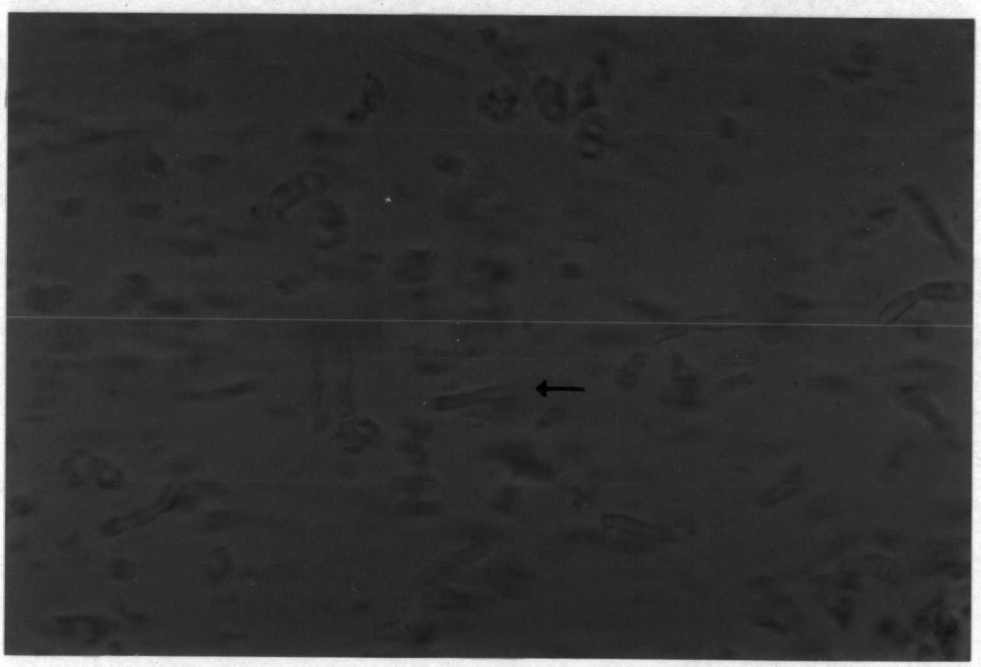
% regeneration frequency							
ความเข้มข้นของ Zymolyase มก./มล.	เวลา (นาที)						
	0	15	30	45	60	75	90
0.05	0	5.58	2.05	1.78	1.57	0.33	0.41
0.1	0	1.74	2.3	0.72	0.83	0.39	0.69
0.2	0	1.92	0.92	0.85	0.75	0.53	0
0.4	0	1.4	1.2	0.68	0	0	0



รูปที่ 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



(ก)



(ข)

รูปที่ 2.10 เปรียบเทียบลักษณะโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATCC 9947 ที่อยู่ในสารละลายซอร์บิทอล 1 โมลาร์ (ก) (ขนาดกำลังขยาย 800 X) และที่อยู่ในน้ำ (ข) ปลายลูกศรคือเซลล์ที่ยังไม่เปลี่ยนโพรโทพลาสท์ และบริเวณรอบนอกเป็นโพรโทพลาสท์ที่แตก (ขนาดกำลังขยาย 800 X)

ในการทดลองนี้ไม่สามารถคำนวณผลผลิตโพรโทพลาสท์เทียบกับเซลล์ตั้งต้นได้ดังแสดงกับ *C. oloephila* ทั้งนี้เพราะ *E. fibuligera* มีลักษณะเป็นสายใยจึงไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ตั้งต้นได้

จากกราฟในรูปที่ 2.9 พบว่าการเตรียมโพรโทพลาสท์ด้วยเอนไซม์ Zymolyase ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น การเจริญกลับไปเป็นเซลล์ของโพรโทพลาสท์เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* จะลดลง ซึ่งจากการทดลองนั้น พบว่าการย่อยผนังเซลล์ของเชื้อนี้ด้วยเอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.05 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 15 นาที โพรโทพลาสท์ที่ได้จะสามารถเจริญกลับไปเป็นเซลล์ได้สูงที่สุด คือ 5.58 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.5)

การเตรียมโพรโทพลาสท์ด้วยเอนไซม์ Zymolyase ที่มีความเข้มข้น 0.2 มก./มล. บ่มเป็นเวลานาน 30 นาที แม้ว่าจะให้ปริมาณโพรโทพลาสท์สูงที่สุด แต่เมื่อศึกษาการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ของโพรโทพลาสท์แล้วมีค่าค่อนข้างต่ำ คือ 0.92 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเตรียมโพรโทพลาสท์ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.1 มก./มล. บ่มเป็นเวลา 30 นาทีให้เปอร์เซ็นต์การเจริญกลับ 2.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงรองลงมาจากสภาวะที่ใช้เอนไซม์ 0.5 มก./มล. บ่ม 15 นาที แต่ในสภาวะนี้ ให้จำนวนโพรโทพลาสท์ที่ความหนาแน่นสูงกว่า (ตารางที่ 2.4) ดังนั้น จึงใช้สภาวะนี้ในการเตรียมโพรโทพลาสท์ จาก *E.fibuligera* ต่อไป

สรุป

จากการศึกษาการเตรียมโพรโทพลาสท์พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโทพลาสท์ ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* คือ ใช้เอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* คือ ใช้เอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที บ่มนาน 15

I17231176