

## บทที่ 4

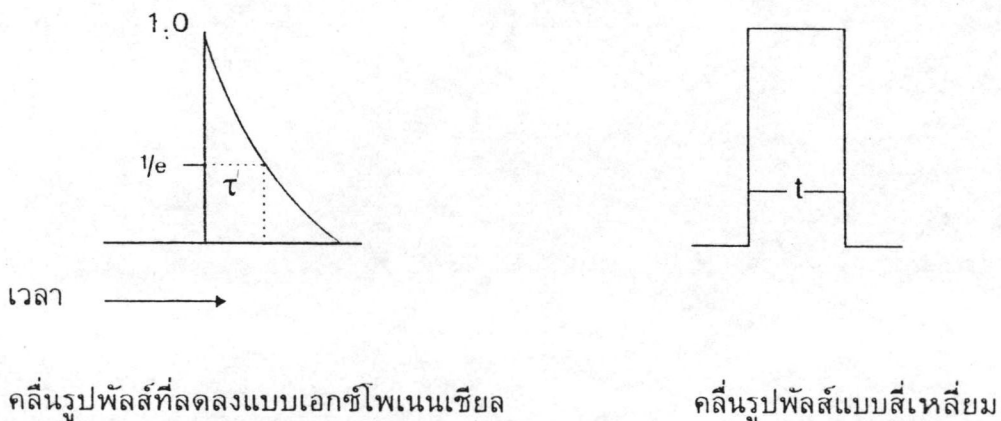
### การหลอมโพรโทพลาสต์ ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 กับ เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATCC 9947 ด้วยวิธี อิเล็กโทรฟิวชัน

ในการทดลองนี้จะศึกษาการหลอมโพรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 กับเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ATCC 9947 ด้วยไฟฟ้าซึ่งเรียกว่า “อิเล็กโทรฟิวชัน”

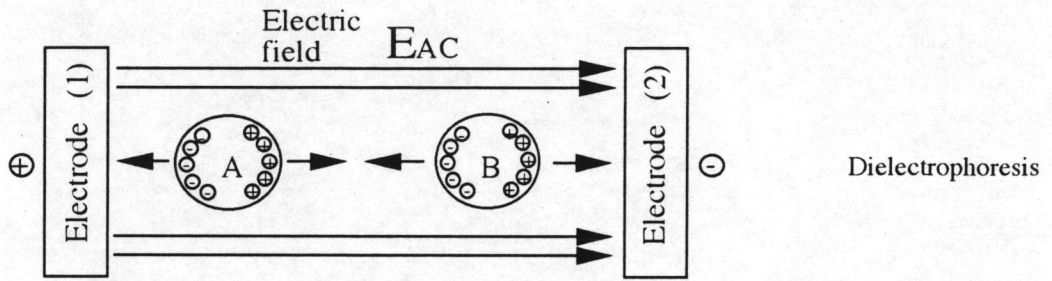
การหลอมโพรโทพลาสต์โดยใช้ไฟฟ้าจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1. การทำให้โพรโทพลาสต์มาเรียงติดกันโดยการทำ ไดอิเล็กโทรฟอรีซิส ( Dielectrophoresis ) ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งสัญญาณคลื่นรูปไซน์ และสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบต่อเนื่องที่มีปริมาณของสนามไฟฟ้าไม่มากนัก ( 70 - 500 V / cm ) และใช้ความถี่ที่มีค่าสูงในช่วง 800 กิโลเฮิรตซ์ ( kHz ) - 2 เมกกะเฮิรตซ์ ( MHz )

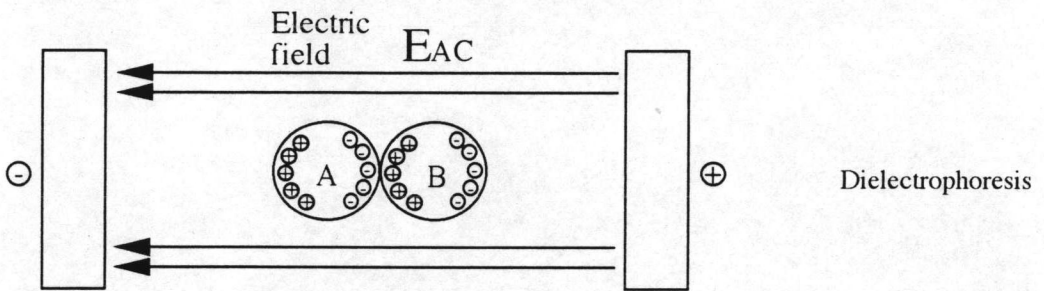
2. การหลอมโพรโทพลาสต์เข้าด้วยกัน เป็นการกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ ที่มีสนามไฟฟ้าสูง ( kV/cm ) โดยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ที่สามารถกระตุ้นให้โพรโทพลาสต์มาหลอมกันเข้ากันมากมี 2 แบบคือคลื่นรูปพัลส์ ที่ลดลงแบบเอกโปเนนเชียล ( Exponential decaying pulse ) และคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ( Square wave pulse ) ดังแสดงในรูปที่ 4.1



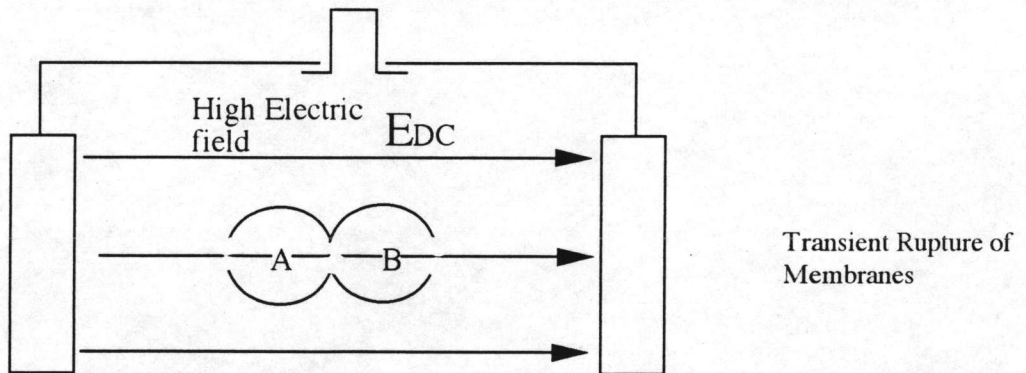
รูปที่ 4.1 คลื่นรูปพัลส์ที่ใช้ในการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า



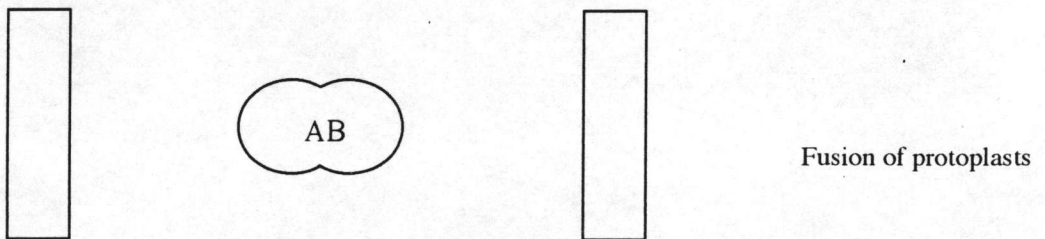
รูปที่ 4.2 ก โพรโทพลาสต์ถูกเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้ากระแสสลับสัญญาณคลื่นรูปไซน์ ( $E_{AC}$ )



รูปที่ 4.2 ข โพรโทพลาสต์เข้ามาเรียงตัวชิดกัน เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าระยะเวลาหนึ่ง



รูปที่ 4.2 ค โพรโทพลาสต์ถูกกระตุ้นด้วยไฟฟ้ากระแสตรงสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ( $E_{DC}$ ) โดยใช้สนามไฟฟ้าความเข้มสูง ทำให้เมมเบรนของโพรโทพลาสต์ไม่เสถียร เกิดเป็นรูพรุนชั่วคราว



รูปที่ 4.2 ง โพรโทพลาสต์ทั้งสองมาหลอมรวมกัน และแลกเปลี่ยนสารประกอบต่างๆ ภายในด้วยกัน

รูปที่ 4.2 กระบวนการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า (Electrofusion)

ตัวแปรที่สำคัญที่จะทำให้โพโรโทพลาสท์หลอมกันได้คือ ระยะเวลาที่กระตุ้น ( T , t ) โดยคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลงแบบเอกโปเนนเชียล จะขึ้นกับ ครึ่งเวลาการลดลงของสัญญาณ ( Decay half time ) และคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมจะขึ้นกับความกว้างของพัลส์ ( Pulse width )

การหลอมโพโรโทพลาสท์โดยใช้ไฟฟ้านั้นเริ่มด้วยการทำไดอิเล็กทริกโทรฟอร์ซิสแล้วกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ทันที ขั้นตอนที่โพโรโทพลาสท์เข้ามาเรียงกันและหลอม สามารถอธิบายดังรูปที่ 4.2

จากรูปที่ 4.2 ก และ 4.2 ข โพโรโทพลาสท์ที่อยู่ในภาวะปกติ อีออนภายในโพโรโทพลาสท์จะมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ หลังจากการเปิดสวิตช์ให้สนามไฟฟ้าคลื่นรูปไซน์ ( ไฟฟ้ากระแสสลับ ) อีออนภายในโพโรโทพลาสท์จะถูกเหนี่ยวนำให้มีการเคลื่อนที่ไปตามความถี่ที่ป้อน ถ้าความถี่ที่ป้อนมีค่าสูงมาก ( kHz - MHz ) จะทำให้อีออนที่อยู่ภายในโพโรโทพลาสท์เคลื่อนตามความถี่ไม่ทันและจะเคลื่อนที่ไปมาในระยะทางสั้นมากเหมือนหยุดอยู่ที่เดิม ถ้าในขณะนั้นด้านหนึ่งของขั้วมีศักย์ไฟฟ้าค่าจะเป็นผลให้อีออนบวกมีแนวโน้มที่จะมารวมกันด้านนี้ และอีออนลบจะมารวมกันด้านศักย์ไฟฟ้าสูง รูปที่ 4.2 (ก) เมื่อให้สนามไฟฟ้าคลื่นรูปไซน์ไประยะเวลาหนึ่ง โพโรโทพลาสท์ที่ถูกเหนี่ยวนำแต่ละโพโรโทพลาสท์จะอยู่ในระยะที่อีออนภายในโพโรโทพลาสท์ดึงดูดกันได้ก็จะทำให้โพโรโทพลาสท์มาเรียงตัวกันดังรูปที่ 4.2 (ข) หลังจากนั้นหากโพโรโทพลาสท์ได้รับสนามไฟฟ้าขนาดสูงราว 800 V/cm - 7 kV/cm จะทำให้โพโรโทพลาสท์มาหลอมรวมกันตามขั้นตอนที่จะกล่าวถึงดังต่อไปนี้

ขั้นตอนการหลอมรวมกันของโพโรโทพลาสท์สามารถแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน คือ

1. โพโรโทพลาสท์แขวนลอยอยู่ในสารละลายอยู่ในตำแหน่งเหมาะสม
2. การกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแล้วเกิดโพราไรเซชันทำให้มีการจัดเรียงประจุภายใน

โพโรโทพลาสท์ (การทำไดอิเล็กทริกโทรฟอร์ซิส)

3. โพโรโทพลาสท์เข้ามาเรียงชิดกันตั้งแต่ 2 โพโรโทพลาสท์ขึ้นไป หลังจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

4. โพโรโทพลาสท์ถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้า (kV/cm) ของคลื่นสัญญาณรูปพัลส์ ทำให้เมมเบรนของโพโรโทพลาสท์ไม่เสถียร

5. หลังจากโพโรโทพลาสท์ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แล้ว เมมเบรนของโพโรโทพลาสท์ 2 โพโรโทพลาสท์ จะเข้ามาเกาะและหลอมรวมกัน และมีการแลกเปลี่ยนสารประกอบต่างๆ ภายในโพโรโทพลาสท์

6. เมมเบรนของโพโรโทพลาสท์กลับคืนสู่ภาวะเสถียร

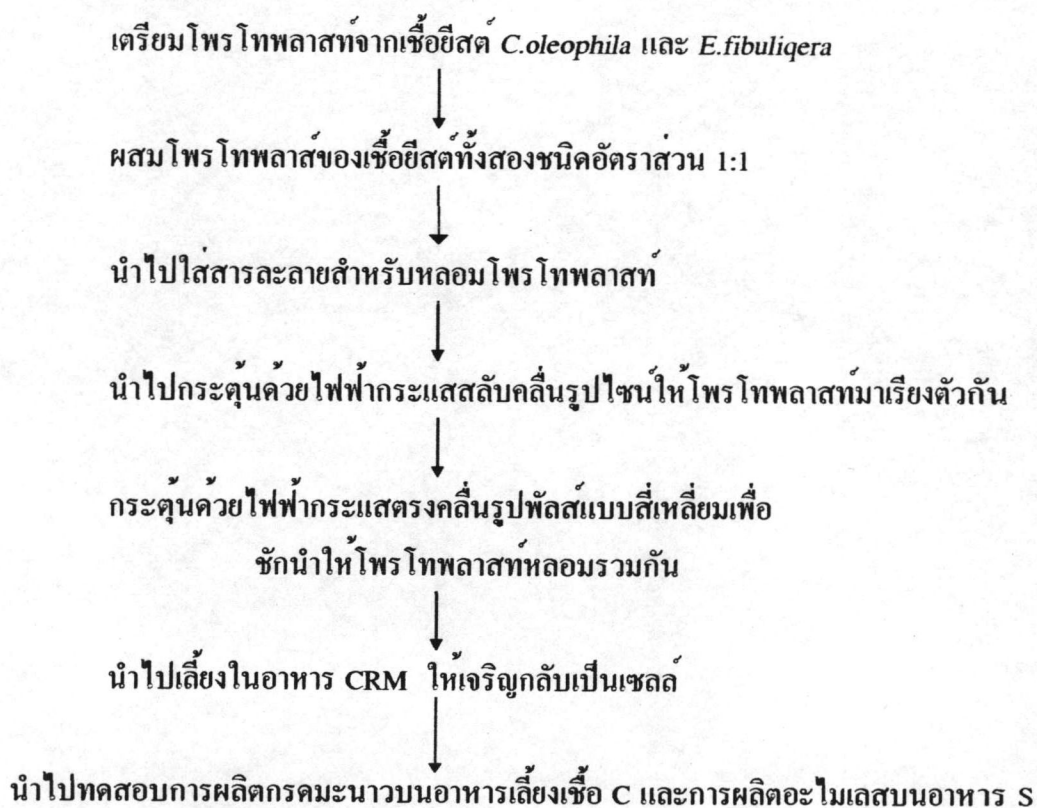


การศึกษาการหลอมโพรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* ซึ่งสามารถผลิตกรดมะนาวกับเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ซึ่งสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยศึกษาผลของภาวะต่างๆ ต่อการหลอมโพรโทพลาสต์ ของเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิด ดังต่อไปนี้

- ผลของความเข้มข้นไอออนในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ โดยไอออนที่ใช้ได้แก่ แคลเซียมไอออน และ แมกนีเซียมไอออนโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งแคลเซียมไอออน และแมกนีเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งของแมกนีเซียมไอออน

- ผลของไฟฟ้ากระแสสลับ (AC sine wave) ที่ใช้ในการเรียงตัวของโพรโทพลาสต์โดยเลือกใช้คลื่นรูปไซน์ ในการศึกษาผลของความถี่และแรงดันของสัญญาณที่ให้แก่โพรโทพลาสต์

- ผลของไฟฟ้ากระแสตรง ชนิดของสัญญาณคลื่นรูปพัลส์(DC square wave) ที่ใช้ในการหลอมโพรโทพลาสต์คือ คลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม โดยศึกษาผลของจำนวนพัลส์ ความกว้างพัลส์ และแรงดันของสัญญาณที่ให้แก่ โพรโทพลาสต์ ในการศึกษาผลของภาวะต่างๆ ที่มีผลต่อการหลอมโพรโทพลาสต์โดยใช้ไฟฟ้ามีขั้นตอนดังนี้





## วิธีการทดลอง

1. เตรียมโพรโทพลาสต์เชื้อยีสต์ *C.oleophila* และ เชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ตามวิธีในบทที่ 2 โดยเชื้อยีสต์ *C. oleophila* เตรียมโพรโทพลาสต์ด้วย Zymolyase ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. บ่มระยะเวลานาน 30 นาที โพรโทพลาสต์เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* เตรียมในเอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ระยะเวลาดบ่มนาน 30 นาที

2. เตรียมสารแขวนลอย ของโพรโทพลาสต์ในซอร์บิทอล ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ นับจำนวน โพรโทพลาสต์ของเชื้อทั้งสองชนิด ผสมโพรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ในอัตราส่วน 1:1

3. ปั่นตกตะกอนโพรโทพลาสต์โดยเครื่องเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เวลานาน 5 นาที

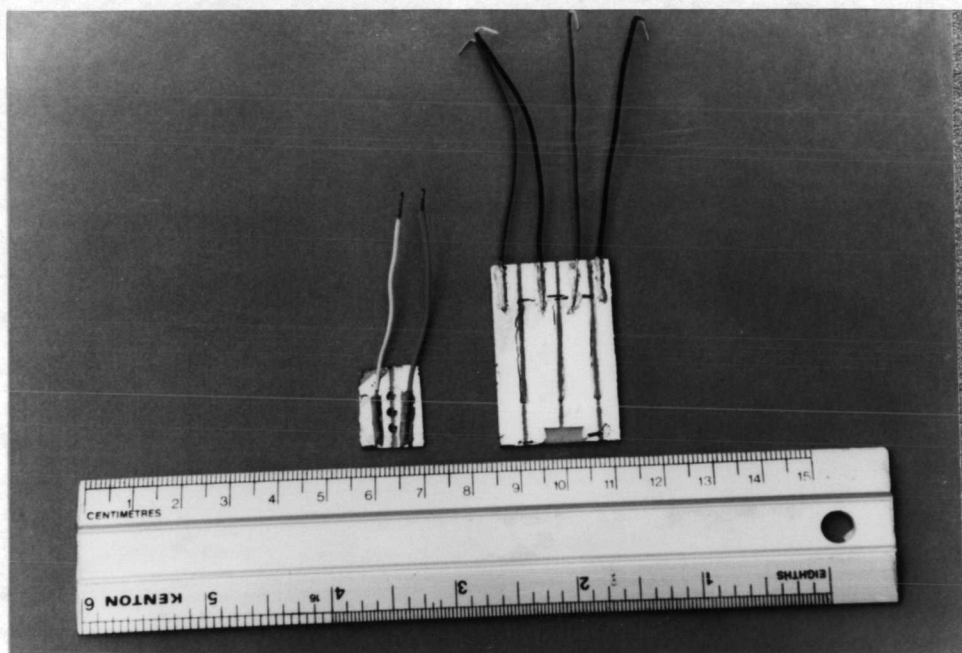
4. คูดสารละลาย ซอร์บิทอล 1 โมลาร์ ทั้ง เดิมสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ (ภาคผนวก ข ข้อ 5) มีเกลือแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.9 mM และเกลือแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.9 mM

5. คูด สารแขวนลอย ของโพรโทพลาสต์ ที่อยู่ในสารละลาย สำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ ความเข้มข้นของเกลือ ดังข้อ 4 ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ใส่ลงในห้องบรรจุเซลล์(chamber) ขนาด 2 มิลลิเมตรแสดงดังรูปที่ 4.3

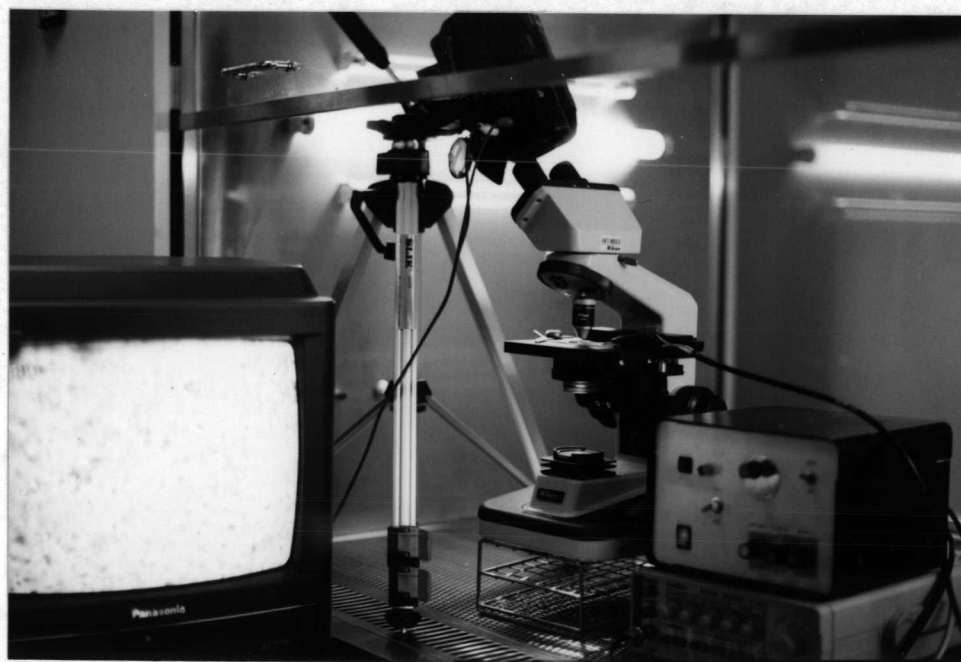
6. กระตุ้นโพรโทพลาสต์โดยใช้ไฟฟ้าจากเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้น ในห้องปฏิบัติการ (โดย ผศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์, นางสาวอัญญา จินานุพันธ์) แสดงดังรูปที่ 4.4

6.1 ศึกษาการกระตุ้นที่สัญญาณคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 65 V/cm (แรงดัน 13 Vp-p) ความถี่ 2 MHz (เครื่องกำเนิดสัญญาณคลื่นรูปไซน์นี้ สามารถสร้างแรงดันได้สูงสุด 13 Vp-p เมื่อใช้ความถี่ 2 MHz) ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ แบบสี่เหลี่ยมความเข้มสนามไฟฟ้า 1.5 kV/cm (แรงดัน 300 Vp-p) จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 1 ครั้ง, 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง

6.2 ศึกษาการกระตุ้นที่สัญญาณคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm(แรงดัน 30 Vp-p) ความถี่ 1 MHz (เครื่องกำเนิดสัญญาณคลื่นรูปไซน์นี้สามารถสร้างแรงดันได้สูงสุด 30 Vp-p เมื่อใช้ความถี่ 1 MHz) ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมขนาดแรงดันความเข้มสนามไฟฟ้า 1.5 kV/cm (แรงดัน 300 Vp-p) จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 1 ครั้ง, 5 ครั้ง, 10 ครั้ง



รูปที่ 4.3 ห้องบรรจุเซลล์ (chamber) ขนาด 2 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.4 ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า ภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ

6.3 ศึกษาการกระตุ้นที่สัญญาณคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมความเข้มสนามไฟฟ้า 2.0 kV/cm(แรงดัน 400 Vp-p) จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 1 ครั้ง , กระตุ้น 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง

6.4 ศึกษาการกระตุ้นที่สัญญาณคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมความเข้มสนามไฟฟ้า 2.0 kV/cm จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง

6.5 ศึกษาที่การกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ความเข้มสนามไฟฟ้า 5.0 kV/cm(แรงดัน 1000 Vp-p) จำนวน 1 พัลส์ มีความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง

7. หลังจากผ่านกระแสไฟฟ้า นำไปเลี้ยงในอาหาร CRM เวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วนับโคโลนีที่เจริญขึ้นในอาหาร CRM ลบด้วย จำนวนโคโลนีของยีสต์ที่ไม่เปลี่ยนเป็น โปรโทพลาสท์ซึ่งเตรียมสารแขวนลอยด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อคั่งที่ได้กล่าวแล้วในบทที่ 3 ข้อ 3.1 - 3.3

8. สุ่มโคโลนีที่เจริญในอาหาร CRM ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า จำนวน 30 โคโลนีเพาะเลี้ยงในอาหาร C และอาหาร S โดยวิธี replica plating แบบ multiple point ตามวิธีการที่กล่าวในบทที่ 3 ข้อ 3.4

9. ตรวจสอบความกว้างของโคโลนี และบริเวณใสในวันที่ 5 ของการทดสอบในอาหาร ทั้งสองชนิด นำมาคำนวณค่า Potency Index (ภาคผนวก ก ข้อ 2)

10. สามารถคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ได้จากสมการที่ 2.1 ในบทที่ 2 และคำนวณค่า fusion frequency ได้จากสมการที่ 3.2 ในบทที่ 3

#### ผลการทดลอง

1. ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารทดสอบ C และอาหารทดสอบ S หลังผ่านการหลอมโปรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E.fibuligera* ด้วยไฟฟ้าพบลักษณะโคโลนีดังนี้

1.1 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C.oleophila* ให้บริเวณใสในอาหาร C ชนิดเดียวเท่านั้น

1.2 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E.fibuligera* สามารถย่อยแบ่งเกิดบริเวณใสในอาหาร S



1.3 โคลิฟอร์มที่มีลักษณะของข้อ 1 และ 2 ผสมกันอยู่โดยมีลักษณะโคลิฟอร์มที่เหมือนเชื้อ *E.fibuligera* เจริญอยู่ด้านบน และโคลิฟอร์มที่เหมือนเชื้อ *C.oleophila* เจริญอยู่ด้านล่าง และให้บริเวณใสในอาหารแบ่ง มีขนาดชัดเจนแต่ให้บริเวณใสในอาหาร C ไม่ชัดเจน

โคลิฟอร์มที่พบในอาหารทดสอบทั้ง 2 ชนิด ทั้ง 3 แบบ ลักษณะข้างต้นจะเกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ ที่สภาวะการทดลองด้วยไฟฟ้าในข้อ 6.4 และ 6.5 เท่านั้น และในการคัดเลือกลูกผสมนอกจากใช้ลักษณะที่เจริญบนอาหารทดสอบ C และ S แล้ว ยังใช้ค่า  $\bar{X}$  ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* และค่า  $\bar{X}$  ของเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกตามวิธีการคัดเลือกลูกผสมดังกล่าวในบทที่ 3 แล้ว

2. ผลการศึกษาการหลอมโพรโทพลาสท์ *C.oleophila* กับ *E.fibuligera* ชั้นแรกศึกษาที่ภาวะกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 65 V/cm (แรงดัน 13 Vp-p) ความถี่ 2 MHz แล้วใช้สัญญาณคลื่นรูปพัลส์ความเข้มสนามไฟฟ้า 1.5 kV/cm (ขนาดแรงดัน 300 Vp-p) จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ เป็น 10  $\mu$ s/pulse ทำให้โพรโทพลาสท์การหลอมรวมกันกระตุ้น 1 ครั้ง, 5 ครั้ง, 10 ครั้ง จากการคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสท์ที่เจริญกลับมาเป็นเซลล์หลังผ่านการหลอมที่ภาวะ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสท์ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้า กระแสสลับคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 65 V/cm ความถี่ 2 MHz ตามด้วยไฟฟ้ากระแสตรงคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ความเข้มสนามไฟฟ้า 1.5 kV/cm ความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse จำนวน 3 พัลส์

%regeneration frequency		
กระตุ้น 1 ครั้ง	กระตุ้น 5 ครั้ง	กระตุ้น 10 ครั้ง
$1.86 \times 10^{-2}$	$1.62 \times 10^{-2}$	$1.60 \times 10^{-2}$

จากตารางที่ 4.1 พบว่าค่า เปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของเชื้อ *C. oleophila* และ *E. fibuligera* หลังผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้าที่ภาวะนี้จะมีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า เปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของเชื้อ *C. oleophila* และ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า ดังแสดงในตารางที่ 2.2 และ 2.5 ตามลำดับ และพบว่าเมื่อกระตุ้นด้วยไฟฟ้ากระแสตรงจำนวนครั้งมากขึ้นค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency จะลดลง

จากการวัดค่า Potency Index ของเชื้อ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้าจำนวน 20 โคโลนี (ภาคผนวก จ ข้อ 1) มีค่าเฉลี่ยของค่า Potency Index ( $\bar{X}$ ) เท่ากับ 1.19 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.043 คำนวณค่า  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $10\bar{X} +SD$  เพื่อใช้เป็นค่าคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C. oleophila* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $\bar{X} +10SD$  ของค่า Potency Index ของเชื้อ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า 65 V/cm AC ความถี่ 2 MHz 1.5 kV/cm DC ความกว้าง 10  $\mu$ s/pulse ในอาหาร C เป็นเวลา 5 วัน

X+ nSD ของค่า Potency Index	
$\bar{X}$	1.19
$\bar{X} + SD$	1.23
$\bar{X} + 2SD$	1.28
$\bar{X} + 3SD$	1.32
$\bar{X} + 4SD$	1.36
$\bar{X} + 5SD$	1.41
$\bar{X} + 6SD$	1.45
$\bar{X} + 7SD$	1.49
$\bar{X} + 8SD$	1.53
$\bar{X} + 9SD$	1.58
$\bar{X} + 10SD$	1.62

และจากการวัดค่า Potency Index ของ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้าจำนวน 20 โคโลนี (ภาคผนวก จ. ข้อ 2) มีค่าเฉลี่ยของค่า Potency Index ( $\bar{X}$ ) เท่ากับ 2.27 และมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) เท่ากับ 0.09 คำนวณค่า  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $\bar{X}+10SD$  เพื่อใช้เป็นค่าคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *E. fibuligera* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $\bar{X} +10SD$  ของค่า Potency Index ของเชื้อ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการ  
 หลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า 65 V/cm AC ความถี่ 2 MHz 1.5 kV/cm DC  
 ความกว้าง 10  $\mu$ s/pulse ในอาหาร S เป็นเวลา 5 วัน

$\bar{X} + nSD$ ของค่า Potency Index	
$\bar{X}$	2.27
$\bar{X} + SD$	2.36
$\bar{X} + 2SD$	2.45
$\bar{X} + 3SD$	2.54
$\bar{X} + 4SD$	2.63
$\bar{X} + 5SD$	2.72
$\bar{X} + 6SD$	2.81
$\bar{X} + 7SD$	2.90
$\bar{X} + 8SD$	2.99
$\bar{X} + 9SD$	3.08
$\bar{X} + 10SD$	3.17

นำค่า  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $\bar{X} +10SD$  ที่คำนวณได้ในตารางที่ 4.2 และ 4.3 ไปเป็นเกณฑ์ในการ  
 คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C.oleophila* และ *E.fibuligera* โคโลนีที่มีลักษณะเหมือน  
 เชื้อตามลำดับ แสดงในตาราง ที่ 4.4 โดยคัดเลือกลูกผสมที่มีค่า Potency Index ในช่วง  $\bar{X} + 6SD$   
 ถึง  $\bar{X} + 10SD$



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

จำนวนความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วงต่างๆ							
โคโลนีที่มีลักษณะเหมือน <i>C. oleophila</i> ใน อาหาร C				โคโลนีที่มีลักษณะเหมือน <i>E. fibuligera</i> ใน อาหาร S			
ช่วงของค่า Potency Index	กระตุ้น			ช่วงของค่า Potency Index	กระตุ้น		
	1 ครั้ง	5 ครั้ง	10 ครั้ง		1 ครั้ง	5 ครั้ง	10 ครั้ง
$\bar{X} = 1.19$	6	10	3	$\bar{X} = 2.27$	1	5	1
$\bar{X}+SD = 1.23$	12	3	1	$\bar{X}+SD = 2.36$	8	6	8
$\bar{X}+2SD = 1.28$	8	11	3	$\bar{X}+2SD = 2.45$	9	8	9
$\bar{X}+3SD = 1.32$	4	6	8	$\bar{X}+3SD = 2.54$	4	5	4
$\bar{X}+4SD = 1.36$	0	2	5	$\bar{X}+4SD = 2.63$	1	2	1
$\bar{X}+5SD = 1.41$	0	0	5	$\bar{X}+5SD = 2.72$	0	0	0
$\bar{X}+6SD = 1.45$	0	0	0	$\bar{X}+6SD = 2.81$	0	0	0
$\bar{X}+7SD = 1.49$	0	0	0	$\bar{X}+7SD = 2.90$	0	0	0
$\bar{X}+8SD = 1.53$	0	0	0	$\bar{X}+8SD = 2.99$	0	0	0
$\bar{X}+9SD = 1.58$	0	0	0	$\bar{X}+9SD = 3.08$	0	0	0
$\bar{X}+10SD = 1.62$	0	0	0	$\bar{X}+10SD = 3.17$	0	0	0

จากตารางที่ 4.4 พบว่าไม่มีโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง  $\bar{X}+6SD$  ถึง  $\bar{X}+10SD$   
 อาจเนื่องจากภาวะกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์มาเรียงตัวกันใช้แรงดันของไฟฟ้ากระแสสลับคลื่น  
 รูปไซน์ มีค่าต่ำเกินไปสำหรับโพรโทพลาสท์ของยีสต์ ซึ่งตามรายงานของ Schnettler และ  
 Zimmermann (1992) พบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ ของเชื้อยีสต์ *Hansinula polymorpha* ที่ให้  
 fusion frequency สูงที่สุดในภาวะที่กระตุ้นให้โพรโทพลาสท์ เรียงตัวกันใช้แรงดันของไฟฟ้า  
 กระแสสลับคลื่นรูปไซน์ ต้องใช้ความเข้มสนามไฟฟ้าสูงถึง 400 V/cm ความถี่ 2 MHz แต่เนื่อง

จากความสามารถของเครื่องกำเนิด ไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ให้ ความเข้มสนามไฟฟ้าสูงที่สุด 65 V/cm เมื่อใช้ความถี่ 2 MHz

การศึกษาในขั้นต่อไปจึงได้ศึกษาในขั้นตอนการทำให้โพรโทพลาสมาเรียงตัวกันโดยกระตุ้นด้วยความเข้มสนามไฟฟ้าสูงขึ้น คือ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz

3. ผลการศึกษาที่ภาวะกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm (ขนาดแรงดัน 30 Vp-p ) ความถี่ 1 MHz (เครื่องกำเนิดสัญญาณคลื่นรูปไซน์นี้สามารถสร้างแรงดันได้สูงสุด 30 Vp-p เมื่อใช้ความถี่ 1 MHz) ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมความเข้มสนามไฟฟ้า 1.5 kV/cm จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 1 ครั้ง, 5 ครั้ง, 10 ครั้ง

ผลการทดลองพบว่าในขณะที่ทำการกระตุ้นให้โพรโทพลาสมาเรียงตัวกัน ด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ นั้น สัญญาณภาพที่แสดงผลทางโทรทรรศน์ปรากฏว่าโพรโทพลาสมาเข้ามาเรียงตัวกัน 2 - 3 โพรโทพลาสมา แต่เมื่อคัดเลือกลูกผสมไม่พบลูกผสมที่มีค่า Potency Index ในช่วง  $\bar{X}+6SD$  ถึง  $\bar{X}+10SD$

การศึกษาขั้นต่อไปจึงได้เพิ่มความเข้มสนามไฟฟ้ากระแสตรง ในขั้นตอนการกระตุ้นให้โพรโทพลาสมาหลอมรวมกันเป็น 2 kV/cm และได้ใช้สภาวะของการกระตุ้นด้วยไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ภาวะเดิม คือ ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz

4. ผลการหลอมโพรโทพลาสมาที่ภาวะการกระตุ้นที่สัญญาณคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมความเข้มสนามไฟฟ้า 2.0 kV/cm (ขนาดแรงดัน 400 Vp-p ) จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 1 ครั้ง , กระตุ้น 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง โคลิनीที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้าที่ภาวะนี้นำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency มีค่าแสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสต์ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยไฟฟ้ากระแสตรงคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมความเข้มสนามไฟฟ้า 2 kV/cm ความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse จำนวน 3 พัลส์

% regeneration frequency		
กระตุ้น 1 ครั้ง	กระตุ้น 5 ครั้ง	กระตุ้น 10 ครั้ง
$1.70 \times 10^{-2}$	$1.41 \times 10^{-2}$	$2.14 \times 10^{-2}$

จากตารางที่ 4.5 พบว่า ค่า regeneration frequency ของการกระตุ้นทั้ง 3 ลักษณะมีค่าใกล้เคียงกัน

การคัดเลือกลูกผสม โดยคำนวณค่า  $\bar{x}+5SD$  ของเชื้อ *C. oleophila* และ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.41 และ 3.00 ( ภาคผนวก 3 และ 4) ตามลำดับ เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะโคโลนีเหมือน *C. oleophila* และ ลูกผสมที่มีลักษณะโคโลนีเหมือน *E. fibuligera* ที่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า ที่ภาวะนี้ดังแสดงในตารางที่ 4.6



ตารางที่ 4.6 ความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วง  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $\bar{X}+10SD$  ของ โพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ที่ผ่านการหลอมด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2.0 kV/cm DC จำนวน 3 พัลส์ มีความกว้าง 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 1 ครั้ง, 5 ครั้ง และ 10 ครั้ง

จำนวนความถี่ของโคโลนีที่มีค่า Potency Index ในช่วงต่างๆ							
โคโลนีที่มีลักษณะเหมือน <i>C. oleophila</i> ใน อาหาร C				โคโลนีที่มีลักษณะเหมือน <i>E. fibuligera</i> ใน อาหาร S			
ช่วงของค่า Potency Index	กระตุ้น			ช่วงของค่า Potency Index	กระตุ้น		
	1 ครั้ง	5 ครั้ง	10 ครั้ง		1 ครั้ง	5 ครั้ง	10 ครั้ง
$\bar{X} = 1.20$	7	5	8	$\bar{X} = 2.20$	1	5	1
$\bar{X}+SD = 1.24$	7	3	4	$\bar{X}+SD = 2.36$	8	6	8
$\bar{X}+2SD = 1.28$	5	5	4	$\bar{X}+2SD = 2.52$	9	8	9
$\bar{X}+3SD = 1.33$	5	2	6	$\bar{X}+3SD = 2.68$	4	5	4
$\bar{X}+4SD = 1.37$	2	9	10	$\bar{X}+4SD = 2.84$	1	2	1
$\bar{X}+5SD = 1.41$	1	2	5	$\bar{X}+5SD = 3.00$	0	0	0
$\bar{X}+6SD = 1.45$	0	0	0	$\bar{X}+6SD = 3.16$	0	0	0
$\bar{X}+7SD = 1.49$	0	0	0	$\bar{X}+7SD = 3.32$	0	0	0
$\bar{X}+8SD = 1.53$	0	0	0	$\bar{X}+8SD = 3.48$	0	0	0
$\bar{X}+9SD = 1.58$	0	0	0	$\bar{X}+9SD = 3.64$	0	0	0
$\bar{X}+10SD = 1.62$	0	0	0	$\bar{X}+10SD = 3.80$	0	0	0

จากตารางที่ 4.6 พบว่าการหลอมโพรโทพลาสท์ที่ภาวะด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1MHz ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม 2 kV/cm จำนวน 3 พัลส์ ความกว้างของพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse ไม่พบโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index อยู่ในช่วง  $\bar{X}+6SD$  ถึง  $\bar{X}+10SD$  แต่พบว่ามีโคโลนีที่มีค่า Potency Index สูง ในอาหาร S และ C ที่ภาวะกระตุ้น 10 ครั้ง มีจำนวนเพิ่มขึ้นและมีจำนวนมากกว่าการกระตุ้น จำนวน 5 ครั้ง และ 1 ครั้ง และจะพบโคโลนีที่ให้อาหาร C ทั้งในอาหาร C และ อาหาร S จำนวน 1 โคโลนี ซึ่งบริเวณใสในอาหาร C นี้จะแสดงให้เห็นชัดใน 2 - 3 วันแรก ของการทดสอบเท่านั้น

สำหรับการทดลองขั้นต่อไปใช้ภาวะการกระตุ้นให้โพรโทพลาสต์มาเรียงกันด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz และขั้นตอนการหลอมโพรโทพลาสต์ได้เพิ่มจำนวนพัลส์ ขึ้นเป็นจำนวน 4 พัลส์ เพื่อศึกษาผลของจำนวนพัลส์, แรงดัน และไค์แปรผันความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมอออน และแมกนีเซียมอออน ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ควบคู่ไปด้วย

5. ผลการหลอมโพรโทพลาสต์ ที่ภาวะกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปไซน์ ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ความเข้มสนามไฟฟ้า 2 kV/cm จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง พร้อมทั้งแปรความเข้มข้นของอออน ในสารละลาย สำหรับหลอมโพรโทพลาสต์

ในการศึกษาผลของแคลเซียมอออนได้เปลี่ยนความเข้มข้นของอออนตั้งแต่ 0 - 0.9 mM โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งของแคลเซียมอออนและผลของแมกนีเซียมอออนได้เปลี่ยนความเข้มข้นของอออนตั้งแต่ 0 - 0.9 mM และใช้แมกนีเซียมคลอไรด์เป็นแหล่งของแมกนีเซียมอออน นำโพรโทพลาสต์ที่เจริญขึ้นมาเป็นเซลล์ในอาหาร CRM มาหาค่า % regeneration frequency ตามสมการ 2.1 มีค่าแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของการหลอมโพรโทพลาสต์ *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  $\mu$  s/pulse แปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมอออน 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมอออน 0- 0.9 mM ในสารละลาย สำหรับหลอมโพรโทพลาสต์

MgCl <sub>2</sub> (mM) / CaCl <sub>2</sub> (mM)	% regeneration frequency (x 10 <sup>-2</sup> )					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	2.93	2.25	1.07	3.38	0.79	3.42
0.1	0.85	1.37	1.44	2.09	3.41	2.35
0.3	1.16	1.65	2.82	2.10	0.18	0.39
0.5	0.17	0.58	0.63	1.15	0.60	0.69
0.7	1.67	1.01	1.23	0.24	1.07	4.94
0.9	2.41	1.16	0.75	3.98	1.99	3.07

ค่า เปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของเชื้อยีสต์ที่ผ่านกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแล้ว มีค่าลดลงและภาวะที่พบโคโลนีลักษณะแตกต่างจากพ่อแม่ จะพบว่าอยู่ในภาวะที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ต่ำ

การหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ที่ภาวะนี้พบโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C. oleophila* แสดงดังรูปที่ 4.5

การคัดเลือก ลูกผสมใช้  $\bar{X}+5SD$  ของเชื้อ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า (ภาคผนวก จ. ข้อ 7) มีค่าเท่ากับ 1.475 เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการหลอมโพรโทพลาสต์ ที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ ความกว้างพัลส์เป็น 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง โดยแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมอ็อกไซด์และแมกนีเซียมอ็อกไซด์ 0-0.9 mM ได้ความถี่ของโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index ในช่วง  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $\bar{X}+10SD$  ในอาหารทดสอบ C ดังแสดงในภาคผนวก จ ข้อ 9 ถึง ข้อ 14

พบว่าเกิดลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *C. oleophila* มีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2 ที่ภาวะการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ที่มีแคลเซียมอ็อกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 mM และมีแมกนีเซียมอ็อกไซด์ความเข้มข้น 0.9 mM ดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ค่า fusion frequency ของลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse แปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมอ็อกไซด์ 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมอ็อกไซด์ 0- 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์

MgCl <sub>2</sub> (mM)	fusion frequency x 10 <sup>-2</sup>					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
CaCl <sub>2</sub> (mM)						
0	-	-	-	-	-	3.3
0.1	13.3	3.3	3.3	3.3	-	-
0.3	-	-	-	3.3	-	3.3
0.5	-	-	-	-	-	20.0
0.7	3.3	7.0	-	3.3	-	7.0
0.9	-	7.0	-	10.0	10.0	-



และการหลอมโพรโทพลาสท์ที่ภาวะนี้ ยังพบโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* โดยการคัดเลือกใช้ค่า  $\bar{X}+5SD$  ของเชื้อ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (ภาคผนวก จ. ข้อ 8) มีค่าเท่ากับ 2.925 เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสมที่ได้จากการหลอมโพรโทพลาสท์ที่ภาวะนี้ โดยแปรผันความเข้มข้นของแคลเซียมอ็อกไซด์ 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมอ็อกไซด์ 0.09 mM เช่นกัน ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ ได้ความถี่ของโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index อยู่ในช่วง  $\bar{X}$ ,  $\bar{X}+SD$ , ...,  $\bar{X}+10 SD$  ในอาหารทดสอบ S ดังแสดงในภาคผนวก จ. ข้อ 9 ถึงข้อ 14) มีลักษณะโคโลนีแสดงดังรูป 4.6 และสามารถคำนวณค่า fusion frequency ได้จากสมการ 3.2 มีค่าแสดง ดังตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.5 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหาร C (A) กว้างกว่าเชื้อ *C. oleophila* ที่เป็น control (B) ในวันที่ 5 ของการทดสอบ



รูปที่ 4.6 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหาร S (A) กว้างกว่า *E. fibuligera* ที่เป็น control (B) ในวันที่ 5 ของการทดสอบ

ตารางที่ 4.9 ค่า fusion frequency ของโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *E. fibuligera* จากการหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10  $\mu$  s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ แปรแคลเซียมอ่อนความเข้มข้น 0 - 0.9 mM และ แมกนีเซียมอ่อน 0 - 0.9 mM

MgCl <sub>2</sub> (mM) CaCl <sub>2</sub> (mM)	fusion frequency $\times 10^{-2}$					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	3.3	-	17	3.3	-	-
0.1	3.3	6.7	-	-	3.3	-
0.3	6.7	-	3.3	3.3	-	-
0.5	-	10	-	-	-	-
0.7	-	-	-	3.3	-	-
0.9	3.3	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.9 พบว่าภาวะที่เกิดโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *E. fibuligera* และสามารถย่อยแป้งได้ดีขึ้นในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์มีแมกนีเซียมอ่อนความเข้มข้น 0.3 mM เพียงชนิดเดียวโดยมีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.17

โคโลนีแบบที่ 3 ที่พบในอาหารทดสอบเป็นโคโลนีผสมระหว่างเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* และ *C. oleophila* ซึ่งให้บริเวณใสทั้งในอาหาร S และอาหาร C (แสดงดังรูป 4.7) โคโลนีผสมที่พบ มีจำนวนน้อย (มีจำนวนแสดงดังตารางที่ 4.10) และมีค่า Potency Index ก่อนข้างต่ำ ถึงแม้พบบริเวณใสบนอาหาร S และอาหาร C แต่เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารทดสอบอีกรุ่นหนึ่ง (subculture) พบว่าโคโลนีมีลักษณะของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* และเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* แยกกันอย่างชัดเจนจึงไม่สามารถบอกได้ว่าเกิดการรวมกันของโพรโทพลาสต์เชื้อยีสต์ *E. fibuligera* และ *C. oleophila*



ตารางที่ 4.10 จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่าง *E. fibuligera* กับ *C. oleophila* จากการหลอมโพรโทพลาสต์ *E. fibuligera* กับ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ แปรแคลเซียมไอออนความเข้มข้น 0 - 0.9 mM และแมกนีเซียมไอออน 0 - 0.9 mM

MgCl <sub>2</sub> (mM) CaCl <sub>2</sub> (mM)	จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะผสม					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	1	-	-	-	1
0.1	-	-	-	-	-	-
0.3	-	-	-	-	-	-
0.5	-	1	-	1	2	-
0.7	-	1	1	-	-	-
0.9	3	-	3	-	2	-

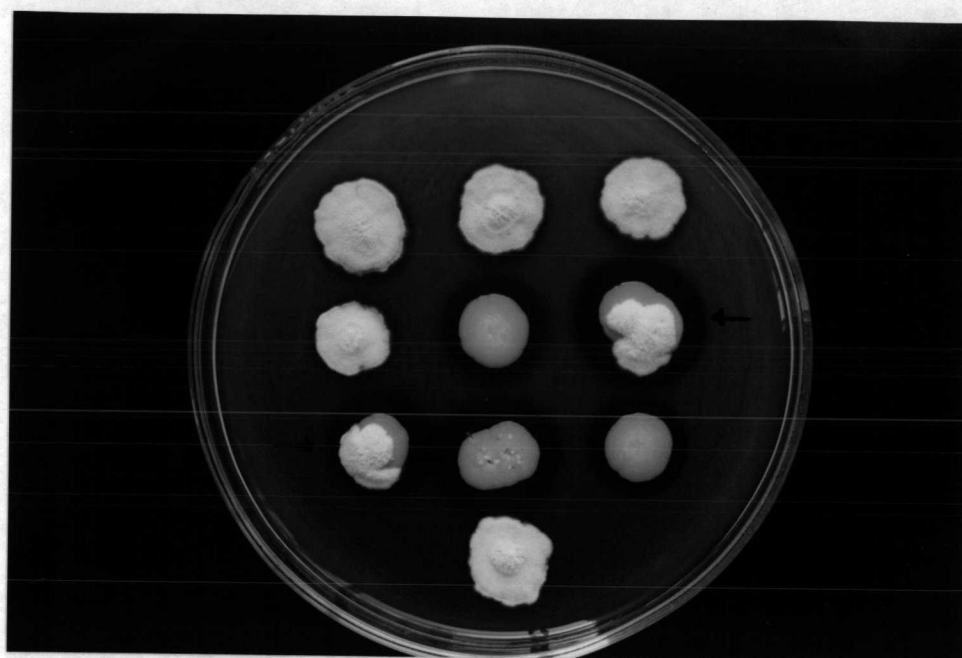
จากตารางที่ 4.10 พบว่าโคโลนีผสมที่เกิดมีจำนวนน้อย และพบในภาวะที่มีความเข้มข้นของ แคลเซียมไอออน ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ที่มีความเข้มข้นสูง 0.5 mM ถึง 0.9 mM โคโลนีผสมที่พบไม่ได้นำไปคำนวณค่า fusion frequency เนื่องจากยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าเกิดจากการรวมกันของโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* และ *E. fibuligera*

ได้นำจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างจากพ่อแม่คือ ลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *C. oleophila* ที่สามารถให้บริเวณใสในอาหาร C กว้างกว่าเชื้อเดิม และลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *E. fibuligera* และสามารถย่อยแป้งในอาหาร S ได้ดีกว่าเชื้อเดิม มารวมกัน และคำนวณค่า fusion frequency แสดงดังตารางที่ 4.11 และกราฟรูป 4.8 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนโคโลนีลูกผสมที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสต์ ของ *E. fibuligera* และ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง กับความเข้มข้นของ แคลเซียมไอออน และแมกนีเซียมไอออนในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์

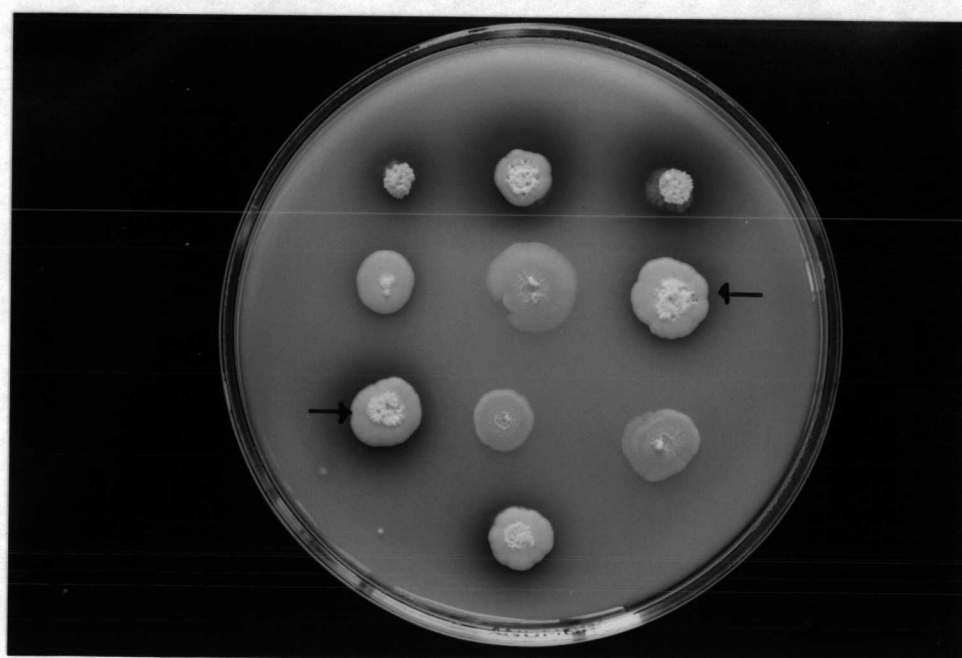
ตารางที่ 4.11 ค่า fusion frequency ของโคโลนีทั้งหมดที่มีค่า Potency Index สูงกว่า  $\bar{X}+5SD$  จากการหลอมโพรโทพลาสต์ของ *E. fibuligera* และ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ มีความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้งในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ แปรแคลเซียมไอออนความเข้มข้น 0-0.9 mM และ แมกนีเซียมไอออน 0 - 0.9 mM

MgCl <sub>2</sub> (mM) / CaCl <sub>2</sub> (mM)	fusion frequency x 10 <sup>-2</sup>					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	3.3	3.3	16.7	3.3	-	6.7
0.1	16.7	10.0	3.3	3.3	3.3	-
0.3	6.7	-	3.3	6.7	-	3.3
0.5	-	13.3	-	3.3	6.7	20.0
0.7	3.3	10.0	3.3	6.7	-	6.7
0.9	13.3	6.7	10.0	10.0	16.7	-

จากการทดลองพบว่าภาวะที่เกิดโคโลนีที่มีลักษณะ แตกต่างไปจากพ่อแม่มากที่สุดในการกระตุ้นโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz 2 kV/cm DC ความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ sec จำนวน 4 พัลส์คือ ภาวะที่มีแคลเซียมไอออน 0.5 mM และ แมกนีเซียมไอออน 0.9 mM โดยมีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.2



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.7 ภาพโคโลนีผสม (ดั่งลูกศร)ที่เกิดจากการหลอมโปรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ *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



## 6. ผลการศึกษาการหลอมโพรโทพลาสต์ที่ภาวะแรงดันสูง

ในขั้นกระตุ้นให้โพรโทพลาสต์มาเรียงกันด้วยคลื่นรูปไซน์ขนาดสนามไฟฟ้า 150V/cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยการกระตุ้นให้โพรโทพลาสต์หลอมรวมกันที่ภาวะกระตุ้นด้วยคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม ขนาดสนามไฟฟ้า 5 kV/cm จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง

พบว่าเมื่อ นับจำนวนโคโลนีที่เจริญขึ้นมาใน CRM หลังผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า แล้วนำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ตามสมการ 2.1 มีค่าดังแสดงในตาราง 4.12

ตารางที่ 4.12 ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของการหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง

MgCl <sub>2</sub> (mM) / CaCl <sub>2</sub> (mM)	%regeneration frequency x 10 <sup>-2</sup>					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	0.28	0.22	0.21	0.24	0.23	0.47
0.1	0.23	0.74	0.28	0.66	0.26	0.25
0.3	0.40	0.43	0.77	0.46	0.18	0.27
0.5	0.28	0.23	0.20	0.28	0.29	0.77
0.7	0.32	0.49	0.37	0.22	0.96	1.20
0.9	0.63	0.74	0.21	1.75	0.76	0.35

จากตารางที่ 4.12 พบว่าเมื่อเพิ่มแรงดัน ของคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมในขั้นตอนการกระตุ้นให้โพรโทพลาสต์หลอมรวมกัน ค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ของโพรโทพลาสต์ มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ regeneration frequency ที่การกระตุ้นด้วยคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมแรงดันต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ในการทดลองนี้พบโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* แสดงดังรูปที่ 4.8 ให้บริเวณใสในอาหาร C กว้างกว่า *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าคัดเลือก ลูกผสมโดยใช้ค่า  $\bar{X}+5SD$  ของ *C. oleophila* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (ภาคผนวก จ. ข้อ 7) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.475 เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสมโดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียม

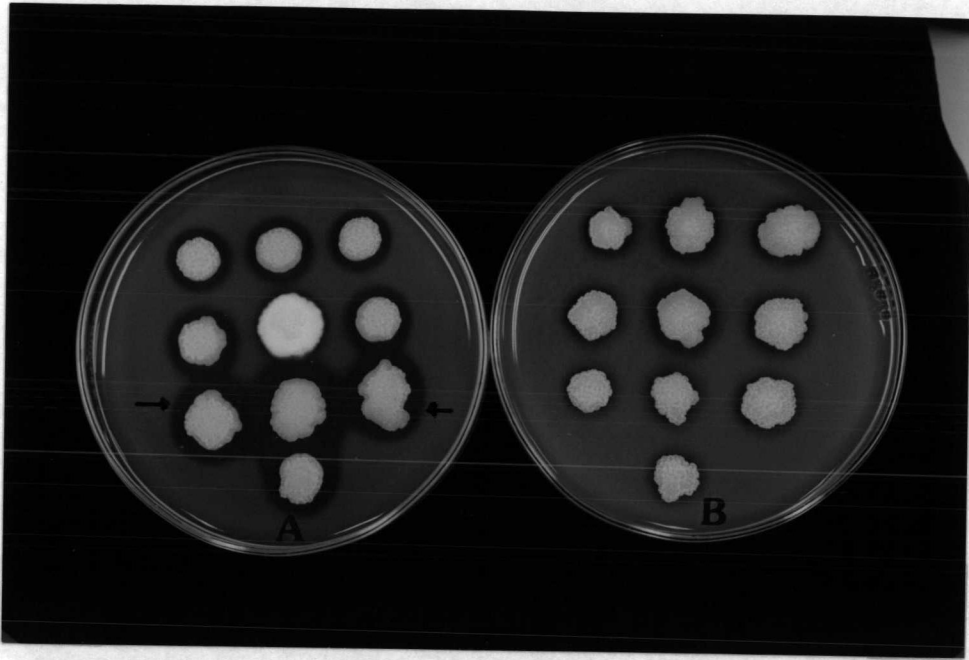
อออนตั้งแต่ 0 ถึง 0.9 mM และแมกนีเซียมอออนตั้งแต่ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ (ภาคผนวก จ ข้อ 15 ถึงข้อ 20 ) พบโคโลนีลูกผสมลักษณะนี้ที่มีค่า Potency Index สูงกว่า 1.475 ในภาวะการหลอมโพรโทพลาสต์ในสารละลายที่มีแคลเซียมและแมกนีเซียมอออนความเข้มข้นต่างๆ และสามารถคำนวณค่า fusion frequency ได้จากสมการ 3.2 แสดงค่าดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ค่า fusion frequency ของลูกผสมที่มีโคโลนีลักษณะเหมือน *C. oleophila* เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV / cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง โดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอออน และแมกนีเซียมอออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์

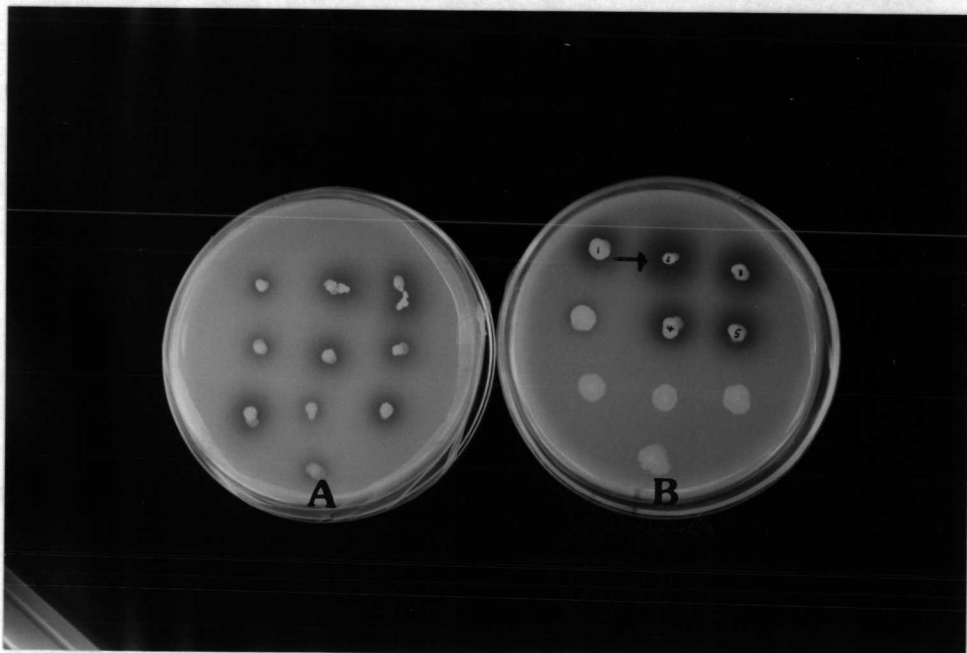
MgCl <sub>2</sub> (mM) \ CaCl <sub>2</sub> (mM)	fusion frequency (x10 <sup>-2</sup> )					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	-	-	3.3	10.0	-
0.1	6.7	6.7	6.7	3.3	13.3	3.3
0.3	3.3	-	-	-	-	-
0.5	3.3	-	6.7	13.3	-	6.7
0.7	10.0	20.0	6.7	6.7	-	-
0.9	-	-	3.3	17.0	10.0	3.3

จากตารางที่ 4.13 พบว่าการหลอมโพรโทพลาสต์ที่ภาวะกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์กระตุ้น 10 ครั้ง มีจำนวนโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *C. oleophila* และมีค่า Potency Index สูงกว่า  $\bar{X} + 5SD$  (1.475) ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ ที่มีแคลเซียมอออนความเข้มข้น 0.7 mM และแมกนีเซียมอออน 0.1 mM โดยมีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.2

การหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ที่ภาวะนี้ยังให้โคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* และให้บริเวณใสในอาหาร S กว้างกว่า *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (แสดงลักษณะโคโลนีดังรูป 4.9)



รูปที่ 4.8 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* (ดั้งลูกศร) หลังผ่านการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหาร C (A) กว้างกว่าเชื้อ *C. oliophila* ที่เป็น control (B) ในวันที่ 5 ของการทดสอบ



รูปที่ 4.9 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* (ดั้งลูกศร) 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



คัดเลือกลูกผสมโดยใช้ค่า  $\bar{X}+5SD$  ของ *E. fibuligera* ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (ภาคผนวก จ. ข้อ 8 ) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.925 เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกลูกผสมโดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอออนตั้งแต่ 0-0.9 mM และแมกนีเซียมอออนตั้งแต่ 0-0.9 mM ในสารละลายสำหรับผสมโพรโทพลาสต์ (ภาคผนวก จ. ข้อ 15 ถึง ข้อ 20 ) สามารถคำนวณค่า fusion frequency มีค่าดังแสดงตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ค่า fusion frequency ของลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *E. fibuligera* ได้จากหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้งโดยแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอออน และแมกนีเซียมอออน ในสารละลายสำหรับ หลอมโพรโทพลาสต์ 0 - 0.9 mM

MgCl <sub>2</sub> (mM) / CaCl <sub>2</sub> (mM)	fusion frequency (x 10 <sup>-2</sup> )					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-
0.3	-	-	-	-	3.3	-
0.5	-	3.3	-	-	6.7	3.3
0.7	-	-	-	3.3	3.3	3.3
0.9	3.3	-	-	-	3.3	-

จากตารางที่ 4.14 พบว่าเมื่อใช้ที่สารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ซึ่งมีแคลเซียมอออน 0.5 mM และมีแมกนีเซียมอออน 0.7 mM จะให้ลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* และมีค่า Potency Index สูงกว่า  $\bar{X}+5SD(2.925)$  โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ  $7 \times 10^{-2}$  และโคลนีนีลูกผสมที่พบจะเกิดจากการหลอมโพรโทพลาสต์ ในสารละลายที่มีเกลือแคลเซียมอออนความเข้มข้นสูง ในช่วง 0.5 - 0.9 mM และมีแมกนีเซียมอออนความเข้มข้น 0.5-0.9 mM เช่นกัน

การหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ที่ภาวะนี้นอกจากจะพบโคลนีนีลูกผสม 2 แบบที่ได้กล่าวข้างต้นแล้วยังพบโคลนีนีแบบที่ 3 ที่มีลักษณะผสมระหว่างเชื้อ

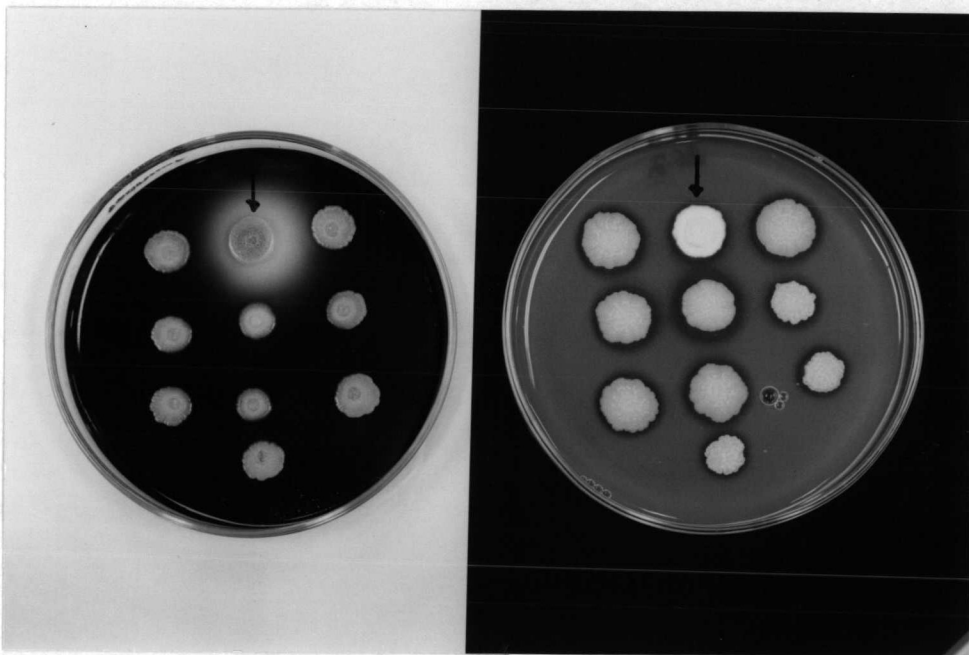
*C. oleophila* กับเชื้อ *E. fibuligera* แสดงคิงรูปที่ 4.11 โดยในอาหารทดสอบ S จะมีลักษณะโคโลนีเหมือน *C. oleophila* เจริญอยู่ด้านล่างและมีเส้นใยฟูขาวของ *E. fibuligera* เจริญอยู่ด้านบนและให้บริเวณใสในอาหารทดสอบ S แต่ในอาหารทดสอบ C จะมีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* และเกิดบริเวณใสไม่ชัดเจน ลักษณะโคโลนีลักษณะแบบที่ 3 นี้ อาจเกิดจากโพรโทพลาสท์ของ *C. oleophila* และ *E. fibuligera* มีการหลอมกันขณะกระตุ้นด้วยไฟฟ้าซึ่งอาจจะรวมเฉพาะไซโตพลาสซึม หรือหลอมรวมทั้งนิวเคลียส และไซโตพลาสซึม แต่เนื่องจากลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อทั้ง 2 ชนิดต่างกันมาก ซึ่งจากลักษณะของเชื้อ *E. fibuligera* เป็นร่างแหและมีโคโลนีฟูขาวคล้ายเส้นใยเชื้อรา แต่ *C. oleophila* มีลักษณะเป็นเชื้อยีสต์รูปไข่ และมีโคโลนีด้านบนเรียบทำให้ลูกผสมที่ได้มีการรวมตัวของยีนอาจทำให้มีความผิดปกติ และเกิดการ spontaneous segregation ออกจากกันขณะที่เจริญแบ่งเซลล์ในลูกรุ่นต่อมา จึงทำให้ลูกผสมที่ได้ไม่คงตัว (instable) และพบว่าโคโลนีผสมนี้เกิดกระจายอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่มีแคลเซียมอออน ความเข้มข้นค่อนข้างสูง ตั้งแต่ 0.3 mM ขึ้นไป แต่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมอออน ค่อนข้างต่ำในช่วง 0 - 0.5 mM ซึ่งแสดงจำนวนโคโลนีดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่าง *E. fibuligera* และเชื้อ *C. oleophila* หลังจากผ่านไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอออน และแมกนีเซียมอออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์

MgCl <sub>2</sub> (mM) / CaCl <sub>2</sub> (mM)	จำนวนโคโลนีที่มีลักษณะผสม					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-
0.3	5	-	1	3	-	-
0.5	-	1	2	-	-	-
0.7	2	-	-	-	-	-
0.9	-	3	-	1	-	3

โคโลนีลักษณะผสมที่พบนี้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าเกิดจากการรวมโพรโทพลาสท์

ของเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิด เนื่องจากผลของการทดสอบในอาหาร S และอาหาร C บริเวณตำแหน่งเดียวกันแสดงบริเวณใสในอาหาร C ไม่ชัดเจนแต่พบบริเวณใสในอาหาร S ชัดเจน ชนิดเดียวกันนั้น อีกทั้งโคโลนีของเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิดยังแสดงลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน



รูปที่ 4.10 ภาพโคโลนีผสม(ดั่งลูกศร)ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* กับเชื้อยีสต์ *C. oleophila* ด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC ให้บริเวณใสในอาหารทดสอบ S (A) และ อาหาร C (B) วันที่ 5 ของการทดสอบ



ได้นำจำนวนโคโลนีลูกผสมทั้ง 3 ลักษณะที่พบทั้งในอาหารทดสอบ S และอาหารทดสอบ C ที่มีค่า Potency Index สูงกว่า X+5SD (จากตารางภาคผนวก จ. ข้อ 15 ถึง ข้อ 20) มาคำนวณค่า fusion frequency ตามสมการที่ 3.2 แสดงดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ค่า fusion frequency ของโคโลนีลูกผสมทั้งหมดที่มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อ

*E.fibuligera* และ *C. oleophila* จากการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้า ที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอออน และแมกนีเซียมอออน 0 - 0.9 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์

MgCl <sub>2</sub> (mM) / CaCl <sub>2</sub> (mM)	fusion frequency x 10 <sup>-2</sup>					
	0	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0	-	-	-	3.3	10.0	-
0.1	6.7	6.7	6.7	3.3	13.3	3.3
0.3	16.7	-	3.3	10.0	3.3	-
0.5	3.3	6.7	13.3	13.3	6.7	10.0
0.7	16.7	20.0	6.7	10.0	3.3	3.3
0.9	3.3	10.0	-	3.3	6.7	10.0

จากตารางที่ 4.16 จะพบโคโลนีลูกผสมจำนวนมากในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ที่มี แคลเซียมอออน ความเข้มข้น 0.7 mM แมกนีเซียมอออนความเข้มข้น 0.1 mM โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2

การหลอมโพรโทพลาสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ที่ภาวะแรงดันต่ำโดยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse กระตุ้น 10 ครั้ง แสดงดังรูปที่ 4.11 พบโคโลนีลูกผสมมีลักษณะ 3 แบบคือ

1. เกิดลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ที่สามารถผลิตกรดอะมิโนได้สูงขึ้น และมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2 ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ที่มี แคลเซียมอออนเข้มข้น 0.5 mM และแมกนีเซียมอออนเข้มข้น 0.9 mM

2. เกิดโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E. fibuligera* ที่สามารถย่อยแป้งได้ดีขึ้น โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุด 0.17 ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่ไม่มีแคลเซียมอออน แต่มีแมกนีเซียมอออน ความเข้มข้น 0.3 mM

3. เมื่อรวมลูกผสมที่มีลักษณะแตกต่างจากพ่อแม่ มาคำนวณค่า fusion frequency จะพบว่าค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2 ที่ภาวะในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่มีแคลเซียมอออน ความเข้มข้น 0.5 mM และแมกนีเซียมอออน ความเข้มข้น 0.9 mM

จากการหลอมโพรโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* ที่ภาวะแรงดันสูงจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง แสดงดังรูปที่ 4.12 จะเกิดลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *C. oleophila* ซึ่งมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2 ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ที่มีแคลเซียมอออนความเข้มข้น 0.7 mM และแมกนีเซียมอออนความเข้มข้น 0.1 mM

การเกิดโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *E. fibuligera* มีค่า fusion frequency เท่ากับ  $7.0 \times 10^{-2}$  ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ ที่มีแคลเซียมอออน ความเข้มข้น 0.5 mM และมีแมกนีเซียมอออน 0.7 mM และเกิดโคโลนีผสมของเชื้อ 2 ชนิด เช่นเดียวกับการหลอมที่ภาวะแรงดันต่ำ เมื่อรวมโคโลนีลูกผสม ทุกลักษณะสามารถคำนวณค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 0.2 ที่ภาวะการหลอมโพรโทพลาสท์ในสารละลายที่มี ที่มีแคลเซียมอออน ความเข้มข้น 0.7 mM และมีแมกนีเซียมอออน 0.1 mM

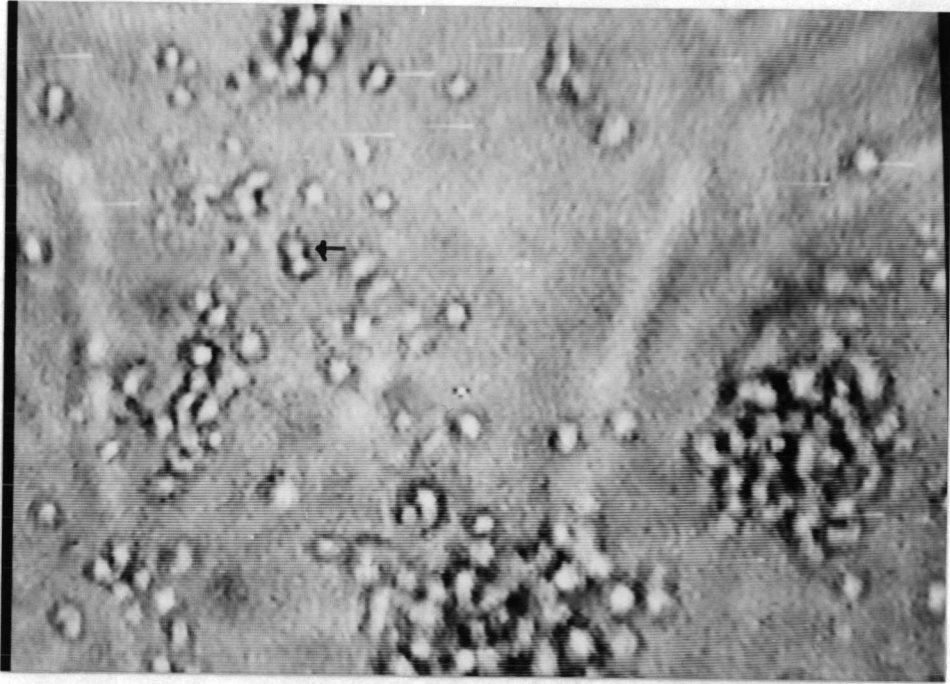
เปรียบเทียบจำนวนโคโลนีลูกผสมที่มีค่า Potency Index สูงกว่า X+SSD ในอาหารทั้ง 2 ชนิด (ภาคผนวก จ ข้อ 9 ถึง ข้อ 14) ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้าที่ภาวะแรงดันต่ำจากการกระตุ้นด้วย 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC จำนวน 4 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 10  $\mu$ s/pulse กับจำนวนโคโลนีลูกผสมที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสท์ ที่ภาวะแรงดันสูงจากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC จำนวน 1 พัลส์ กระตุ้น 10 ครั้ง (ภาคผนวก จ ข้อ 15 ถึง 20) มีจำนวนแสดงดังตารางที่ 4.17

ตารางที่ 4.17 การเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีลูกผสม ที่เกิดจากการหลอมโพรโทพลาสต์  
*C.oleophila* และ *E. fibuligera* ด้วยไฟฟ้าที่มีค่า Potency Index สูงกว่าพ่อแม่  
 (control) โดยการแปรความเข้มข้นของแคลเซียมอ็อกไซด์และแมกนีเซียมอ็อกไซด์ 0 - 0.9  
 mM ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์

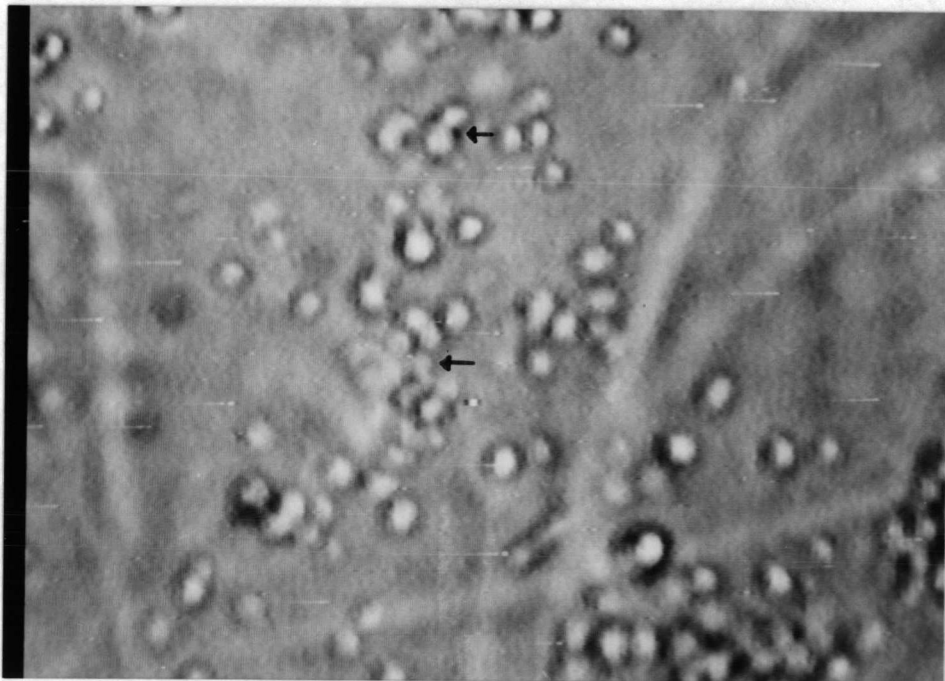
[Ca <sup>2+</sup> ] (mM)	DC 2 kV			DC 5 kV/cm		
	จำนวนโคโลนีที่ ที่เหมือน <i>C.oleophila</i>	Mix	จำนวนโคโลนีที่ ที่เหมือน <i>E. fibuligera</i>	จำนวนโคโลนี ที่เหมือน <i>C.oleophila</i>	Mix	จำนวนโคโลนี ที่เหมือน <i>E. fibuligera</i>
	0	1	2	7	4	0
0.1	8	0	4	12	0	0
0.3	2	0	4	1	8	1
0.5	6	4	3	9	3	4
0.7	6	2	1	12	2	3
0.9	8	8	1	10	7	2

[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	DC 2 kV			DC 5 kV/cm		
	จำนวนโคโลนีที่ เหมือน <i>C.oleophila</i>	Mix	จำนวนโคโลนีที่ เหมือน <i>E. fibuligera</i>	จำนวนโคโลนี ที่เหมือน <i>C.oleophila</i>	Mix	จำนวนโคโลนี ที่เหมือน <i>E. fibuligera</i>
	0	5	3	5	7	7
0.1	5	3	5	8	4	1
0.3	1	4	6	7	3	0
0.5	6	1	3	13	4	1
0.7	3	4	1	10	0	6
0.9	10	1	0	4	3	2





รูปที่ 4.11 การหลอมโพรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* (ดั้งลูกศร) ในห้องบรรจุโพรโทพลาสต์ขณะกระตุ้นด้วยไฟฟ้าที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 2 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง (ขนาดกำลังขยาย 600 เท่า )



รูปที่ 4.12 การหลอมโพรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* กับเชื้อ *E. fibuligera* (ดั้งลูกศร) ในห้องบรรจุโพรโทพลาสต์ขณะกระตุ้นด้วยไฟฟ้าที่ภาวะ 150 V/cm AC ความถี่ 1 MHz ตามด้วย 5 kV/cm DC กระตุ้น 10 ครั้ง (ขนาดกำลังขยาย 600 เท่า )

จากตารางที่ 4.17 พบโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อยีสต์ *C.oleophila* ที่ให้ค่า Potency Index สูงกว่าเชื้อ *C.oleophila* ที่ไม่ผ่านกระแสไฟฟ้า ที่ภาวะการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า 150 V/cm AC 1 MHz , 5 kV/cm DC (แรงดันสูง) จำนวนมากกว่าที่การหลอมโปรโทพลาสต์ที่ภาวะ 150 V/cm AC 1 MHz, 2 kV/cm DC

## สรุป

ในการศึกษาการหลอม *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* โดยใช้สนามไฟฟ้าพบว่า

1. ผลของอออนในสารละลายหลอมโปรโทพลาสต์ ที่ภาวะการหลอมโปรโทพลาสต์ โดยใช้สนามไฟฟ้ารูปพัลส์ความเข้ม 2 kV/cm จำนวน 10 พัลส์ จะเกิดโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *C.oleophila* ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมอออนสูงและแมกนีเซียมอออนสูงด้วย และเกิดโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเชื้อ *E.fibuligera* ที่ภาวะมีแคลเซียมอออนความเข้มข้นสูงและแมกนีเซียมอออนความเข้มข้นต่ำ

2. การหลอมโปรโทพลาสต์ที่ใช้สนามไฟฟ้ารูปพัลส์ความเข้ม 5 kV/cm จำนวน 10 พัลส์ พบว่าจะเกิดโคโลนีลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *C.oleophila* ที่มีค่า Potency Index สูง และเกิดเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ที่มีค่า Potency Index สูงในสารละลายสำหรับหลอมโปรโทพลาสต์ ที่มีแคลเซียมอออนและแมกนีเซียมอออน ความเข้มข้นค่อนข้างสูง

3. สำหรับโคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่างเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิดในการหลอมโปรโทพลาสต์ ทั้งที่สนามไฟฟ้าสูงและต่ำ จะพบทั้งในสารละลายสำหรับหลอมโปรโทพลาสต์ ที่มีความเข้มข้นของเกลือแคลเซียมอออนและแมกนีเซียมอออน ต่างๆ กันโดยไม่มีแนวโน้มที่ชัดเจน

4. ในการศึกษาที่ภาวะการหลอมโปรโทพลาสต์ด้วยไฟฟ้าที่ภาวะกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้า 5 kV/cm จะเกิดโคโลนีลูกผสมมีจำนวนมากกว่าที่ภาวะการหลอมโปรโทพลาสต์ด้วยสนามไฟฟ้า 2 kV/cm

5. อย่างไรก็ตามไม่พบลูกผสมที่มีความสามารถทั้งในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดอะมิโนได้

จากผลการทดลอง พบโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อยีสต์ *C.oleophila* และสามารถให้บริเวณใสในอาหาร C ขนาดกว้างกว่าเชื้อเดิมทำให้คาดว่าเกิดการหลอมโปรโทพลาสต์ ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* กับ เชื้อ *C.oleophila* เอง และยังพบโคโลนีที่เหมือนเชื้อยีสต์ *E.fibuligera* ที่สามารถย่อยแป้งได้สูงขึ้น ซึ่งอาจจะเกิดจาก เชื้อยีสต์ *E.fibuligera* อาจจะผสมกันเองเช่นกัน