

บทที่ 7

สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการหลอมโพรโทพลาสต์ของเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 ซึ่งสามารถผลิตกรดอะมิโนได้กับเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ที่สามารถย่อยแป้งได้โดยวิธีการใช้สารเคมีคือ Polyethylene glycol (PEG) เปรียบเทียบกับการหลอมโพรโทพลาสต์โดยวิธี อิเล็กโทรฟิวชัน จากเครื่องมือที่ประดิษฐ์ขึ้นในห้องปฏิบัติการ สามารถสรุปผลโดยย่อได้ดังต่อไปนี้

1. ในการเตรียมโพรโทพลาสต์ สำหรับการทำอิเล็กโทรฟิวชัน พบว่าภาวะที่เหมาะสมของการเตรียมโพรโทพลาสต์ ของเชื้อยีสต์ *C.oleophila* ใช้เอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.4 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนานประมาณ 30 นาที และการเตรียมโพรโทพลาสต์ ของเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* ใช้เอนไซม์ Zymolyase ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. ระยะเวลาบ่มนาน 30 นาที

2. จากผลการหลอมโพรโทพลาสต์ด้วย PEG - น้ำหนักโมเลกุล 4000 ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ใน 50 mM $CaCl_2$ พบว่าเกิดโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *C.oleophila* และให้กรดอะมิโนได้สูงขึ้นชนิดเดียวเท่านั้น โดยภาวะที่ได้ค่า fusion frequency สูงที่สุดคือ หลอมที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เวลานาน 20 นาที โดยได้ค่า fusion frequency เท่ากับ 0.2

3. ภาวะที่หลอมโพรโทพลาสต์ของยีสต์ ที่สนามไฟฟ้าแรงดันต่ำ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพบโคโลนีที่มีลักษณะเด่นกว่าเชื้อพ่อแม่คือภาวะที่ทำการกระตุ้น โพรโทพลาสต์ ด้วยไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์ความเข้มสนามไฟฟ้า 150 V /cm ความถี่ 1 MHz ตามด้วยกระแสไฟฟ้ากระแสตรงคลื่นรูปสี่เหลี่ยม ความเข้มสนามไฟฟ้า 2 kV/cm จำนวน 4 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 10 μ s/พัลส์ การหลอมโพรโทพลาสต์ที่ภาวะนี้ จะเกิดโคโลนีขึ้น 3 ลักษณะคือ

3.1 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อยีสต์ *C.oleophila* และสามารถผลิตกรดอะมิโนได้สูงขึ้นโดยได้จากการหลอมโพรโทพลาสต์ ในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสต์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้นสูงในช่วง 0.5 - 0.9 mM และความเข้มข้นแมกนีเซียมคลอไรด์สูงในช่วง 0.5 - 0.9 mM โดยภาวะที่ให้ค่า fusion frequency สูงที่สุดคือสารละลายที่ใช้หลอม

โพโรโทพลาสท์ที่มีแคลเซียมไอออนความเข้มข้น 0.5 mM และแมกนีเซียมไอออนความเข้มข้น 0.9 mM โดยจะได้ค่า fusion frequency เท่ากับ 0.2

3.2 โคโลนีที่มีลักษณะเหมือนเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* และสามารถย่อยแป้งได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า โดยพบในสารละลายสำหรับหลอมโพโรโทพลาสท์ ที่มีแคลเซียมไอออนและแมกนีเซียมไอออน ความเข้มข้นต่ำ ภาวะที่ได้ค่า fusion frequency สูงคือภาวะที่มีแมกนีเซียมไอออนความเข้มข้น 0.3 mM เพียงชนิดเดียวโดยมีค่า fusion frequency เท่ากับ 0.17

3.3 โคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่างเชื้อยีสต์ *C. oleophila* NNU 62 และเชื้อยีสต์ *E. fibuligera* โดยมีโคโลนีของ *C. oleophila* เจริญอยู่ด้านล่าง และโคโลนีของเชื้อ *E. fibuligera* เจริญเป็นเส้นใยฟูขาวอยู่ด้านบน และพบว่าจะสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้แต่ผลิตภัณฑ์มวลได้น้อยจากการสังเกตเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสบนอาหารวันที่มี CaCO_3 จะเห็นไม่ชัดเจน บางโคโลนีจะแสดงลักษณะย่อยแป้งได้แต่ไม่สร้างกรด โคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่างเชื้อยีสต์นี้จะเกิดกระจายอยู่ในสารละลายสำหรับหลอมโพโรโทพลาสท์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ และมีจำนวนน้อย อีกทั้งมีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างโคโลนีของเชื้อ *C. oleophila* และเชื้อ *E. fibuligera* ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะของยีนแตกต่างกันมาก ทำให้เมื่อเกิดการรวมกันของโพโรโทพลาสท์แล้วไม่สามารถเกิดเป็นลูกผสมที่คงตัวได้ เมื่อผ่านขบวนการเจริญการแบ่งเซลล์ จึงเกิด spontaneous segregation แยกตัวออกจากกัน กลายเป็นลักษณะโคโลนีผสมที่เชื้อทั้ง 2 ชนิดอาศัยอยู่ในบริเวณเดียวกัน *E. fibuligera* มีลักษณะคล้ายเชื้อรา จึงเจริญเป็นเส้นใยฟูอยู่ด้านบนโคโลนี *C. oleophila* ซึ่งจากรายงานของ Provost และคณะ(1978) ได้รายงานผลการหลอมโพโรโทพลาสท์ *C. tropicalis* กับ *E. fibuligera* โดยใช้ PEG พบว่าจะได้ลูกผสมที่ไม่คงตัวเกิดการแยกออกจากกันในการเจริญรุ่นที่ 2 เนื่องจากเชื้อทั้งสองชนิดมีอนุกรมวิธานที่ต่างกันมาก อีกทั้งมีค่า fusion frequency ต่ำประมาณ 10^{-5} ลักษณะโคโลนีผสมที่พบในงานวิจัยนี้ก็มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจนเช่นกัน

4. เมื่อศึกษาการหลอมโพโรโทพลาสท์ ที่สนามไฟฟ้าแรงดันสูง ภาวะการกระตุ้นให้โพโรโทพลาสท์มาเรียงตัวกัน โดยใช้ภาวะเหมือนการหลอมโพโรโทพลาสท์ที่ สนามไฟฟ้าแรงดันต่ำ คือ ใช้ไฟฟ้ากระแสสลับคลื่นรูปไซน์มีสนามไฟฟ้าขนาด 150 V/cm ความถี่ 1 MHz และกระตุ้นให้หลอมรวมกันโดยใช้ ไฟฟ้ากระแสตรงคลื่นรูปพัลส์ความเข้มสนามไฟฟ้า 5 kV/cm กระตุ้น 10 ครั้ง พบว่าที่ภาวะนี้จะเกิดโคโลนีที่มีลักษณะเด่นกว่าพ่อแม่ซึ่งสามารถผลิตภัณฑ์มวลได้สูงที่ภาวะมีแคลเซียมไอออนค่อนข้างสูงและแมกนีเซียมไอออนในสารละลายสำหรับ

โพโทพลาสท์ ความเข้มข้น 0.5-0.9 mM โดยได้ค่า fusion frequency สูงที่สุด เท่ากับ 0.2 ในสารละลายที่ใช้ห่อมโพโทพลาสท์ที่มีแคลเซียมอออนความเข้มข้น 0.7 mM และแมกนีเซียมอออนความเข้มข้น 0.1 mM ในภาวะนี้ยังพบเชื้อ *E.fibuligera* ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงที่ภาวะสารละลายสำหรับห่อมโพโทพลาสท์ ที่มีแคลเซียมอออน 0.5 mM และแมกนีเซียมความเข้มข้น 0.7 mM โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุดเท่ากับ 7×10^{-2}

5. จากผลการทดลองการห่อมโพโทพลาสท์ที่ภาวะสนามไฟฟ้าความเข้มสูง พบว่าเกิดโคโลนีที่มีลักษณะผสมที่แสดงเช่นเดียวกับการห่อมโพโทพลาสท์ที่ภาวะกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าความเข้มต่ำแต่จะมีจำนวนสูงกว่า อย่างไรก็ตามการห่อมโพโทพลาสท์ *C.oleophila* กับ *E. fibuligera* โดยวิธีอิเล็กโทรฟิวชัน ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่า เกิดลูกผสมที่สามารถผลิตทั้งเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดอะมิโนได้ แต่จากการทดลองที่สามารถพบโคโลนีที่มีลักษณะผสมระหว่างเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิด ในภาวะการห่อมโพโทพลาสท์ ที่แรงดันสูง (ความเข้มสนามไฟฟ้า 5 kV/cm) และแรงดันต่ำ (ความเข้มสนามไฟฟ้า 2 kV/cm) ซึ่งไม่พบโคโลนีลักษณะผสมนี้ในการห่อมโพโทพลาสท์ด้วยสารเคมี จึงมีแนวโน้มว่าสามารถพัฒนา การห่อมโพโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิดต่อไปได้ โดยการพัฒนาประสิทธิภาพของเครื่องมือที่ใช้กำเนิดไฟฟ้ากระแสตรง แรงดันสูง ห้องบรรจุเซลล์ และภาวะของการละลายที่ใช้สำหรับห่อมโพโทพลาสท์

6. จากผลการทดลองห่อมโพโทพลาสท์ *C. oleophila* กับ *E. fibuligera* แล้วเกิดลูกผสมลักษณะเหมือนเชื้อพ่อแม่ แต่สามารถให้คุณสมบัติขึ้นนั้นคาดว่าอาจเกิดจากการห่อมรวมกันของโพโทพลาสท์เชื้อยีสต์ชนิดเดียวกัน จึงได้ทำการทดสอบโดยห่อมโพโทพลาสท์ *C. oleophila* ด้วย ความเข้มสนามไฟฟ้า 5 kV/cm กระตุ้น 10 ครั้ง พบว่าเกิดลูกผสมที่มีลักษณะเหมือน *C. oleophila* และสามารถสร้างกรดอะมิโนได้สูงขึ้น โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุด เท่ากับ 0.27 ในทำนองเดียวกันจากการทดลองห่อมโพโทพลาสท์ของ *E. fibuligera* ด้วยสนามไฟฟ้าความเข้ม 5 kV/cm พบว่าเกิดโคโลนีลูกผสมที่สามารถย่อยแป้งได้ดีขึ้น โดยมีค่า fusion frequency สูงที่สุด เท่ากับ 0.5

7. จากข้อสรุปที่ 5 และ 6 อาจกล่าวได้ว่าลูกผสมที่ได้กล่าวถึงในข้อสรุปที่ 3.1 และ 3.2 นั้นเกิดจากการห่อมรวมตัวกันเองของ เชื้อ *C.oleophila* กับ *C.oleophila* และ *E. fibuligera* กับ *E. fibuligera* ตามลำดับ

8. จากข้อสรุปที่ 2 และข้อสรุปที่ 3 อาจกล่าวได้ว่า ค่า fusion frequency ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่การห่อมโพโทพลาสท์โดยวิธีอิเล็กโทรฟิวชันจะให้ลูกผสมที่มีลักษณะหลากหลายกว่าการห่อมโดยใช้ PEG