

การศึกษาการเบรกดาวน์ของเยื่อหุ้มเซลล์พืชภายใต้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ถูกควบคุม



นายธนภัทร โทณะพันธ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY ON THE MEMBRANE BREAKDOWN OF PLANT CELLS UNDER CONSTRICTED
PULSED ELECTRIC FIELD

Mr. Thanaphat Tonapan



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering Program in Electrical Engineering
Department of Electrical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการเบรกตาวอร์นของเยื่อหุ้มเซลล์พืชภายใต้ สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ถูกควบคุม
โดย	นายธนภัทร โทณะพันธ์
สาขาวิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.อดิสร เตื่อนตรานนท์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เอื้ออาภรณ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คมสัน เพ็ชรรัักษ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.อดิสร เตื่อนตรานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีรวุฒิ ยุทธโกวิท)

ธนภัทร โทณะพันธ์ : การศึกษาการเบรกดาวน์ของเยื่อหุ้มเซลล์พืชภายใต้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ถูกควบคุม (STUDY ON THE MEMBRANE BREAKDOWN OF PLANT CELLS UNDER CONSTRICTED PULSED ELECTRIC FIELD) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. บุญชัย เตชะอำนาจ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.อดิสร เตื่อนตรานนท์, 52 หน้า.

วิทยานิพนธ์นี้ศึกษาการเกิดเบรกดาวน์ของเยื่อหุ้มเซลล์พืชภายใต้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ถูกควบคุมโดยศึกษาลักษณะการเบรกดาวน์ของเซลล์พืชในระดับเซลล์เดียว. ผู้วิจัยทดลองโดยนำระบบของไหลขนาดไมโครซึ่งภายในช่องทางเดินสารมีกำแพงฉนวนและช่องเปิดที่ช่วยควบคุมสนามไฟฟ้า. การทดลองทำโดยป้อนแรงดันรูปคลื่นไซน์ขนาด $10 V_p$, พัลส์ไฟฟ้าความถี่ต่ำ (f_L) = 10, 20, 33, 50, 100 และ 200 kHz, เวลาคงอยู่ของพัลส์ความถี่ต่ำ (t_L) = 1, 3, 5, 10 และ 100 ms โดยมีสภาพนำของสารละลายภายนอกเซลล์อยู่ในช่วง 45-150 mS/m. ผู้วิจัยใช้โพรโทพลาสต์ที่สกัดจากลำต้นไคววาระและกลีบดอกอัญชัน. ผลการทดลองพบว่า ที่เวลาคงอยู่ของพัลส์ความถี่ต่ำ = 10 ms การป้อนพัลส์ไฟฟ้าความถี่ต่ำเท่ากับความถี่วิกฤต (f_C) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีอัตราการเกิดเบรกดาวน์ถึง 78% ในขณะที่การป้อนพัลส์ไฟฟ้าความถี่ต่ำที่ 5 เท่าของความถี่วิกฤตไม่เกิดเบรกดาวน์ของเยื่อหุ้มเซลล์. เมื่อป้อนพัลส์ด้วยความถี่น้อยกว่าความถี่วิกฤตทำให้อัตราการเกิดเบรกดาวน์ของทั้งเยื่อหุ้มเซลล์เพิ่มสูงถึง 91.7% และมีโอกาสเบรกดาวน์จนถึงเยื่อหุ้มแควคิวโอลสำหรับโพรโทพลาสต์ที่สกัดจากดอกอัญชัน. นอกจากนี้ยังพบว่า ที่เวลาคงอยู่ของพัลส์ความถี่ต่ำที่ 1 ms อัตราการเกิดเบรกดาวน์เหลือ 20% และ 0% สำหรับพัลส์ความถี่ต่ำที่ 100 และ 200 kHz ตามลำดับ.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5570215021 : MAJOR ELECTRICAL ENGINEERING

KEYWORDS: PULSED ELECTRIC FIELD / PROTOPLAST / PDMS / MICROFLUIDIC

THANAPHAT TONAPAN: STUDY ON THE MEMBRANE BREAKDOWN OF PLANT CELLS UNDER CONSTRICTED PULSED ELECTRIC FIELD. ADVISOR: PROF. BOONCHAI TECHAUMNAT, Ph.D., CO-ADVISOR: ADISORN TUANTRANONT, Ph.D., 52 pp.

This thesis studies the membrane breakdown of plant cells under constricted pulsed electric field by studying membrane breakdown of plant single cell. The author did the experiments by using a microfluidic system with insulating walls and orifices which can constrict the electric field. The author applied $10 V_p$ of sinusoidal wave, pulses of low frequency (f_L) = 10, 20, 33, 50, 100 and 200 kHz for the duration (t_L) of low frequency pulses = 1, 3, 5, 10 and 100 ms. The extracellular conductivity of solution is between 45-150 mS/m. The author used two kinds of protoplasts which are extracted from Kaiware and Butterfly pea. The experiment results showed that for low frequency pulse equal to the critical frequency and $t_L = 10$ ms, breakdown probability was 78%. For low frequency pulse equal to 5 times of the critical frequency ($t_L = 10$ ms), cell membrane breakdown did not occur. For pulse frequency lower than the critical frequency, probability of cell membrane breakdown was 91.7% and vacuole membrane breakdown might occur for protoplasts extracted from Butterfly pea. Moreover, when $t_L = 1$ ms, the probabilities were 20% and 0% for $f_L = 100$ and 200 kHz, respectively.

Department: Electrical Engineering

Field of Study: Electrical Engineering

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.บุญชัย เตชะอำนาจ อาจารย์ที่ปรึกษาและควบคุมการวิจัยสำหรับคำแนะนำในงานวิจัยนี้ ตลอดจนการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเรียบร้อย. ขอขอบคุณ ดร.อดิสร เตื่อนตรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมสำหรับคำแนะนำในด้านระบบของไหล และขอขอบคุณ ดร.รณรงค์ หอมหวล สำหรับคำแนะนำในการสกัดโพรโทพลาสต์. นอกจากนี้ยังขอขอบคุณ คุณธิติมา มธุรส ที่ให้ความช่วยเหลือในกระบวนการ sputtering สำหรับชิ้นงานอิเล็กทรอนิกส์.

นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยรวมถึงทุกท่านที่มีส่วนให้ความช่วยเหลือในการค้นคว้าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์.



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	4
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	4
1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1.3 วัตถุประสงค์	8
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	8
1.5. ระเบียบวิธีวิจัย.....	9
1.6. ขอบเขตของการวิจัย.....	9
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	10
2.1 โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์พีช	10
2.2 เบรกดาวน์ทางไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์.....	12
2.3 สนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมการกระจาย	13
2.4 เทคนิคการผลิตชิ้นงานขนาดไมโครสำหรับทดลอง	14
2.4.1 วิธี Soft lithography	14
2.4.2 วิธี Lift-off.....	15
บทที่ 3 การทดลอง	17
3.1 การผลิตแขนขนาดไมโคร.....	17
3.2 การผลิตอิเล็กโทรด	18
3.3 การประกอบชิ้นงานสำหรับทดลอง	19

3.4 การสกัดโพรโทพลาสต์	20
3.4.1 การสกัดโพรโทพลาสต์จากลำต้นไควาเระ	20
3.4.2 การสกัดโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน	22
3.5 การทดลอง.....	23
3.5.1 การเชื่อมต่อระบบของไหล	23
3.5.2 รูปคลื่นแรงดันไฟฟ้า	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	25
4.1 การเบรกดาว์นของโพรโทพลาสต์จากลำต้นไควาเระ	25
4.2 การเบรกดาว์นของโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน	29
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	35
5.1 ความถี่วิกฤต	35
5.2 การเบรกดาว์นของโพรโทพลาสต์จากลำต้นไควาเระ	36
5.3 การเบรกดาว์นของโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน	37
5.4 ผลของความถี่ไฟฟ้า	38
5.5 ผลของเวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำ.....	38
บทที่ 6 สรุป.....	40
รายการอ้างอิง	41
ก) การสกัดโพรโทพลาสต์จากลำต้นไควาเระ	44
ข) การสกัดโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน	47
ค) ขั้นตอนเตรียมพร้อมระบบของไหลก่อนทดลอง	51
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	52

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์พีช [14].....	10
รูปที่ 2 แบบจำลองของเซลล์เมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า.....	12
รูปที่ 3 สนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมด้วยช่องเปิด (orifice) บนกำแพงฉนวน.....	14
รูปที่ 4 ขั้นตอนการทำไมโครแซนเนลด้วยวิธี Soft lithography.....	15
รูปที่ 5 ขั้นตอนการสร้างอิเล็กโทรดด้วยวิธี lift-off.....	16
รูปที่ 6 รูปของแม่พิมพ์ไมโครแซนเนลที่สร้างจากฟิล์มไวแสง.....	17
รูปที่ 7 รูปภายในของไมโครแซนเนลที่ได้.....	17
รูปที่ 8 ภาพร่างของไมโครแซนเนล.....	18
รูปที่ 9 อิเล็กโทรดที่ได้จากกระบวนการ lift-off.....	19
รูปที่ 10 ภาพถ่ายอิเล็กโทรดจากกล้องจุลทรรศน์.....	19
รูปที่ 11 อิเล็กโทรดอยู่ระหว่างช่องทางของไหล.....	20
รูปที่ 12 ซึ้นงานทดลอง (ก) ซึ้นงานจริง (ข) ภาพร่างซึ้นงาน.....	20
รูปที่ 13 ต้นไคววาระ.....	21
รูปที่ 14 โพรโทพลาสต์ที่หลุดออกมาจากลำต้นไคววาระ.....	21
รูปที่ 15 ดอกอัญชัน.....	22
รูปที่ 16 โพรโทพลาสต์ที่หลุดออกมาจากกลีบดอกอัญชัน.....	22
รูปที่ 17 การเชื่อมต่อขณะทดลอง.....	23
รูปที่ 18 ภาพร่างการเชื่อมต่อระหว่างไมโครแซนเนลกับอุปกรณ์ทดลอง.....	23
รูปที่ 19 รูปคลื่นในการทดลอง.....	24
รูปที่ 20 เซลล์เบรกตาวัวขณะทดลอง.....	25
รูปที่ 21 อัตราการเกิดเบรกตาวัวเมื่อสารละลายมีสภาพนำ = 150 mS/m.....	26
รูปที่ 22 อัตราการเกิดเบรกตาวัวเมื่อสารละลายมีสภาพนำ = 98 mS/m.....	27

รูปที่ 23 อัตราการเกิดเบรกดาวนเมื่อสารละลายมีสภาพนำของ = 45-55 mS/m	27
รูปที่ 24 อัตราการเกิดเบรกดาวนที่ทุกสภาพนำของของสารละลาย	28
รูปที่ 25 เบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์	29
รูปที่ 26 เบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโอล.....	30
รูปที่ 27 อัตราการเกิดเบรกดาวนเมื่อสารละลายมีสภาพนำ 45-55 mS/m	31
รูปที่ 28 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตามความถี่ต่ำ f_L และลักษณะการเกิดเบรกดาวน.....	31
รูปที่ 29 อัตราการเกิดเบรกดาวนเปรียบเทียบระหว่างความถี่ต่ำ $f_L = f_C$ และ $5f_C$	32
รูปที่ 30 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และลักษณะการเกิดเบรกดาวนที่ $f_L = 100$ kHz.	33
รูปที่ 31 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และขนาดเซลล์ ($f_L = 100$ kHz).....	33
รูปที่ 32 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และลักษณะการเกิดเบรกดาวนที่ $f_L = 200$ kHz.	34
รูปที่ 33 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และขนาดเซลล์ ($f_L = 200$ kHz).....	34
รูปที่ 34 ความสัมพันธ์ระหว่าง f_C และรัศมีของเซลล์.....	35
รูปที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่าง V_M และ f_L/f_C	36
รูปที่ 36 ต้นไควาระที่ถูกฉีดด้วยเอทานอล 70%.	44
รูปที่ 37 การซึบเอทานอลลำต้นไควาระด้วยกระดาษซับ.....	44
รูปที่ 38 ลำต้นไควาระที่ถูกหั่นฝอย.....	44
รูปที่ 39 ลำส่วนต้นไควาระในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.....	45
รูปที่ 40 การกรองแยกโพรโทพลาสต์ลำต้นไควาระ (ก) ด้วยตะแกรงสเตนเลส (ข) ด้วยตาข่าย ไนลอน.	45
รูปที่ 41 โพรโทพลาสต์ไควาระ (ก) หลังจากปั่นแยกส่วน (ข) หลังจากดูดสารละลายที่ไม่ ต้องการ.....	46
รูปที่ 42 โพรโทพลาสต์ไควาระสำหรับนำไปทดลอง.	46
รูปที่ 43 ดอกอัญชัน (ก) ก่อนตัดก้านดอก (ข) หลังตัดก้านดอก.	47
รูปที่ 44 กลีบดอกอัญชันที่ถูกคลี่.....	47

รูปที่ 45 กลีบดอกอัญชันที่ถูกฉีดด้วยเอทานอล 70% ทั้งสองด้าน.....	47
รูปที่ 46 การซับกัลีบดอกอัญชันด้วยกระดาษซับ.....	48
รูปที่ 47 การหั่นกลีบดอกอัญชัน (ก) หั่นเป็นฝอยในชั้นแรก (ข) หั่นตามขวางอีกรอบ.....	48
รูปที่ 48 กลีบดอกอัญชันหั่นฝอยแช่ใน wash solution.....	48
รูปที่ 49 กลีบดอกอัญชันหั่นฝอยแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.....	49
รูปที่ 50 การกรองแยกโพรโทพลาสต์ดอกอัญชัน (ก) ด้วยตะแกรงสเตนเลส (ข) ด้วยตาข่ายไนลอน.....	49
รูปที่ 51 โพรโทพลาสต์ดอกอัญชัน (ก) หลังจากปั่นแยกส่วน (ข) หลังจากดูดสารละลายที่ไม่ต้องการ.....	50
รูปที่ 52 โพรโทพลาสต์ดอกอัญชันสำหรับนำไปทดลอง.....	50



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันโลกมีความต้องการทางด้านอาหารสูงขึ้นเนื่องจากจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตสินค้าทางการเกษตร เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค. ไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีผลผลิตหลักเป็นสินค้าทางด้านเกษตรและผลิตภัณฑ์แปรรูปทางการเกษตรจึงมีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและแปรรูปสินค้าเกษตรให้ทันความต้องการของตลาด และสามารถแข่งขันกับนานาชาติได้. การวิจัยเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพกระบวนการผลิตและคุณภาพของผลิตภัณฑ์มีวิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือ การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (Pulsed Electric Field, PEF).

PEF คือ กระบวนการที่ป้อนไฟฟ้าแบบพัลส์ในช่วงเวลาสั้นๆ (อยู่ระหว่างไมโครวินาที จนถึงมิลลิวินาที) ให้กับสารที่อยู่ระหว่างขั้วอิเล็กโทรด. แรงดันไฟฟ้าทำให้เกิดสนามไฟฟ้าระหว่างขั้วอิเล็กโทรด โดยสารที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าเป็นเซลล์สิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์พืชหรือแบคทีเรีย. สนามไฟฟ้าที่มีขนาดสูงเพียงพอจะทำให้สภาพซึมผ่านได้ (permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง ทำให้สารที่อยู่ภายในเซลล์สามารถผ่านออกมาสู่ภายนอกหรือสารภายนอกสามารถซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ [1]. จากหลักการที่กล่าวมา จึงมีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์กับอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเกษตร โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการผลิต เช่น การทำน้ำผลไม้ การสกัดสาร การควบคุมและรักษาคุณภาพของสินค้า เช่น การฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น.

1.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

N. Grimi, F. Mamouni, N. Lebovka, E. Vorobiev และ J. Vaxelaire ได้ทดลองเปรียบเทียบลักษณะเฉพาะของน้ำแอปเปิลที่ได้จากการผลิตด้วยกรรมวิธีปกติ กับน้ำแอปเปิลที่ได้จากการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ช่วยในการผลิต. การทดลองทำโดยป้อนสนามไฟฟ้าความเข้ม 400 V/cm และให้ความดัน 3 bar แก่ตัวอย่าง 3 ชนิด คือ น้ำแอปเปิลที่ได้จากกรรมวิธีปกติ น้ำแอปเปิลที่ได้จากการป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ให้กับผลแอปเปิลก่อนที่จะนำผลแอปเปิลไปผ่านและน้ำแอปเปิลที่ได้จากการป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ให้กับผลแอปเปิลถูกผ่านแล้ว. ผลที่ได้พบว่า กรรมวิธีปกติให้น้ำ

แอปเปิล 44 กรัมต่อเนื้อแอปเปิล 100 กรัม ในขณะที่วิธีป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ให้ผลแอปเปิล ก่อนที่จะนำไปฝานให้น้ำแอปเปิล 58 กรัมต่อเนื้อแอปเปิล 100 กรัม และผลที่ได้จากการฝานผล แอปเปิลก่อนป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์คือ 64 กรัมต่อเนื้อแอปเปิล 100 กรัม [2].

T. Gachovska, D. Cassada, S. Jeyamkondam, M. Hanna, H. Thippareddi และ D. Snow ได้เปรียบเทียบผลการสกัดสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) จากกะหล่ำปลีสีแดงด้วยวิธีที่ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ กับผลที่ได้จากวิธีที่ไม่ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์. คณะผู้วิจัยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ขนาด 2.5 kV/cm ที่มีความกว้างของพัลส์ 15 μ s จำนวน 50 พัลส์. พลังงานจำเพาะที่ใช้ต่อมวล (specific energy) เท่ากับ 15.63 J/g . ผลการทดลองพบว่าสารแอนโทไซยานินที่สกัดด้วยวิธีที่ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีมากกว่าแบบที่ไม่ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ถึง 2.15 เท่า [3].

I. Aguilo-Aguayo, M. Montero-Calderon, R. Soliva-Fortuny และ O. Martin-Belloso ได้เปรียบเทียบคุณภาพของน้ำแตงโมระหว่างวิธีที่ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ความเข้มสูง (HIPEF) ในการฆ่าเชื้อ กับการใช้ความร้อน 90 °C เป็นเวลา 30 หรือ 90 วินาที. ในการทดลองนี้ คณะผู้วิจัยได้เปรียบเทียบจากปริมาณสารประกอบที่มีผลต่อกลิ่นหอมของน้ำแตงโมที่คงเหลือภายหลังจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 56 วัน. ผลที่ได้รับแสดงว่าน้ำแตงโมที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีที่ใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ความเข้มสูงมีปริมาณความเข้มข้นของ hexanal, (E)-2-nonenal, nonanal, 6-methyl-5-hepten-2-one และ geranylacetone ซึ่งมีผลต่อกลิ่นหอมของน้ำแตงโม มากกว่าน้ำแตงโมที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีการใช้ความร้อน. นอกจากนี้ที่กล่าวมาแล้วยังพบว่า ในระหว่างฆ่าเชื้อ การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ความเข้มสูงลดการระเหยของน้ำแตงโม และสารประกอบในระหว่างกระบวนการมากกว่า การฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อน [4].

K. V. Loginova, M. V. Shynkaryk, N. I. Lebovka และ E. Vorobiev ได้ศึกษาผลกระทบ ต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารที่ได้จากเนื้อเยื่อของต้น chicory ที่ได้จากการใช้ความร้อนและ สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ โดยใช้ความสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มตั้งแต่ 100–600 V/cm ในช่วงเวลา 1 ms–50 s อุณหภูมิ 20–80 °C. ผลการศึกษาแสดงว่า การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีผลทำให้ปริมาณ สารที่ได้จากเนื้อเยื่อของต้น chicory มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่สกัดด้วยวิธีที่ไม่ใช้ สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ใช้อุณหภูมิเดียวกัน. ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า การใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ทำให้อัตราการแพร่ของสารภายในเนื้อเยื่อต้น chicory ออกมาภายนอกเซลล์มีมากขึ้นทำให้สกัด สารได้มากขึ้นแม้ว่าจะอยู่ในอุณหภูมิเพียง 20–40 °C. นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยพบว่าการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ช่วยในการสกัดสารสามารถลดพลังงานที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาได้เมื่อเทียบการใช้ พลังงานความร้อนในการสกัดเพียงอย่างเดียว [5].

K. V. Loginova, N. I. Lebovka และ E. Vorobiev ได้ศึกษาการสกัดสีจากบีทสีแดง (red beet) ด้วยวิธีการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์และวิธีแบบทั่วไป โดยป้อนพัลส์แบบรูปคลื่นสี่เหลี่ยมชั่วเดียว (monopolar rectangular) ที่มีความกว้างพัลส์ 100 μs และมีความเข้มสนามไฟฟ้าตั้งแต่ 375–1500 V/cm เป็นเวลา 0–0.2 วินาที ที่อุณหภูมิ 30–80 °C. ผลที่ได้แสดงว่าสนามไฟฟ้าแบบพัลส์มีผลกระทบต่ออัตราเร่งของการสกัด betalains ทำให้เวลาที่ใช้ในการสกัดสารดังกล่าวลดลง [6].

งานวิจัยที่ได้กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า เมื่อนำสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ไปใช้ในการผลิต จะมีประโยชน์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดสารต่างๆจากพืช และต่อการรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทำให้ประสิทธิภาพของการผลิตสูงขึ้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น.

ในการใช้งานสนามไฟฟ้าแบบพัลส์กับกระบวนการจัดการผลิตภัณฑ์อาหารจากพืชเราต้องเข้าใจถึงตัวแปรที่มีผลกระทบต่อเซลล์ที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า. G. Saulis ได้อธิบายกระบวนการที่เกิดขึ้นต่อเซลล์เมื่อได้รับสนามไฟฟ้าจากภายนอก โดยแบ่งออกได้เป็น 4 ขั้นตอน [1] คือ

- 1) เกิดศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์
- 2) เกิดช่องเปิด (pore) หรือรูขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์
- 3) จำนวนของรูเล็กและขนาดของรูเพิ่มขึ้น ในระหว่างการป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์
- 4) หลังจากหยุดป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ เซลล์จะกลับคืนสู่สภาพเดิมในกรณีที่เกิดช่องเปิดไม่ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เบรกดาวน์โดยสมบูรณ์.

จากกระบวนการข้างต้นจะพบว่า สิ่งที่สำคัญในที่ควบคุมการเกิดเบรกดาวน์ของเซลล์คือการควบคุมสภาพซึมผ่านได้ (permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์ จึงมีงานวิจัยหลายชิ้นได้ค้นคว้าความสัมพันธ์และเงื่อนไขต่างๆ เพื่ออธิบายตัวแปรที่มีผลต่อสภาพซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ภายใต้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์.

S. Ersus และ D. M. Barrett ได้ศึกษาผลของความเข้มของสนามไฟฟ้าและจำนวนของพัลส์ต่อเซลล์ของเนื้อเยื่อหอมหัวใหญ่ เพื่อทำความเข้าใจการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพืชหลังจากได้รับสนามไฟฟ้าแบบพัลส์. คณะผู้วิจัยได้ป้อนสนามไฟฟ้าที่มีค่าความเข้มของสนามคงที่ 2 ค่า (167 และ 333 V/cm) ความกว้างพัลส์ 100 μs ความถี่ 1 Hz และใช้จำนวนพัลส์ตั้งแต่ 1–100 พัลส์ ให้แก่หอมหัวใหญ่ชนิด sabroso ที่ผ่านเป็นแผ่นกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 mm หนา 4 mm แล้ววัดผลการทดลองจากการรั่วไหลของไอออนและการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (สังเกตความเปลี่ยนแปลงด้วยการย้อมสีแดง). ผลการทดลองพบว่า เมื่อป้อนสนามไฟฟ้าความเข้ม 167 V/cm การรั่วไหลของไอออนมีเพิ่มมากขึ้น และจากการส่องกล้องจุลทรรศน์พบว่าเซลล์ยังไม่เกิดการรั่ว แต่ช่องว่างอากาศระหว่าง

แต่ละเซลล์ได้หายไปเนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์. คณะผู้วิจัยพบว่าการป้อนสนามไฟฟ้าความเข้ม 333 V/cm ทำให้เซลล์เกิดการรั่วและไม่สามารถกลับคืนสภาพเดิมได้ และเมื่อเพิ่มจำนวนของพัลส์ทำให้จำนวนของเซลล์ที่รั่วเพิ่มมากขึ้นจนมีจำนวนถึง $92.2 \pm 5.9\%$ ของเซลล์ทั้งหมดเมื่อจำนวนพัลส์ที่ป้อนมีจำนวน 100 พัลส์ [7].

S. Asavasanti, W. Ristenpart, P. Stroeve, และ D. M. Barrett ได้ศึกษาผลกระทบจากความถี่ของพัลส์ต่อความสมบูรณ์เนื้อเยื่อหัวหอม โดยใช้ปริมาณการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเฉพาะทางไฟฟ้า การรั่วไหลของไอออน ตัวแปรของเนื้อสาร และเปอร์เซ็นต์ของการสูญเสียน้ำหนักเป็นตัวชี้วัด. ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยได้ป้อนสนามไฟฟ้าที่มีค่าความเข้มของสนามและจำนวนของพัลส์เป็นค่าคงตัวแล้วทดลองปรับค่าความถี่ของสนามไฟฟ้าตั้งแต่ 1–5000 Hz. ผลการทดลองพบว่าการป้อนสนามไฟฟ้าความถี่ต่ำ (น้อยกว่า 1 Hz) มีผลทำให้ความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อหัวหอมลดลงมากกว่าการป้อนสนามไฟฟ้าความถี่สูง [8].

E. Puertolas, N. Lopez, G. Saldana, I. Alvarez และ J. Raso ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสนามไฟฟ้าแบบพัลส์แบบต่อเนื่องมาใช้ในการปรับปรุงกระบวนการสกัดสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) และฟีนอล (phenol) จากกระบวนการหมักไวน์. ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยได้ทดลองในห้องปฏิบัติการโดยทดลองป้อนสนามไฟฟ้าต่อเนื่องที่มีความเข้ม 2, 5 และ 7 kV/cm ตามลำดับ ให้กับห้องฆ่าเชื้อแบบ colinear และใช้อุ่นแดงจำนวน 3 สายพันธุ์ (cabernet sauvignon, syrah และ merlot) เพื่อศึกษาผลของการสกัดสาร. ผลการทดลองพบว่า การเพิ่มความเข้มของสนามไฟฟ้าตั้งแต่ 2–7 kV/cm ทำให้อัตราการสกัดสารแอนโทไซยานิน และฟีนอลที่ได้จากการป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ให้กับอุณหภูมิทั้ง 3 สายพันธุ์มีค่าเพิ่มขึ้น. นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยยังพบอีกว่าหลังจากการป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ให้กับอุณหภูมิทั้ง 3 สายพันธุ์ อุณหภูมิ cabernet sauvignon มีผลการสกัดสารแอนโทไซยานินและฟีนอลสูงกว่าอุณหภูมิ syrah และ merlot [9].

F. Sampedro, A. Rivas, D. Rodrigo, A. Martinez และ M. Rodrigo ได้ศึกษาผลกระทบของความเข้มของสนามไฟฟ้า ระยะเวลาในการป้อนสนามไฟฟ้า อุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการและความกว้างของพัลส์ ที่มีต่อการใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ในการยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ที่มีอยู่ในนมรสส้ม. การวิจัยได้ป้อนสนามไฟฟ้าความเข้ม 35×10^5 V/m และ 40×10^5 V/m. เวลาในการป้อนสนามไฟฟ้าคือ 40–130 μ s และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 35–55 °C. ผลการศึกษาพบว่าการป้อนสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงมีผลในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียมากกว่าการป้อนสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มต่ำ โดยค่าที่ยับยั้งแบคทีเรียสูงที่สุดคือ ที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 40×10^5 V/m เวลาในการป้อน 130 μ s และอุณหภูมิต่ำกว่า 55 °C. นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการ (ใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 35–55 °C) มีผลยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียมากขึ้น

ทำให้ลดการใช้พลังงานลง แต่การเพิ่มความกว้างของพัลส์จาก 2.5 μs เป็น 4 μs ไม่พบว่ามีส่วนต่อการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรีย [10].

งานวิจัยที่กล่าวมาพบว่า ในการป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ให้กับเซลล์ ความเข้มของสนามไฟฟ้าที่ป้อน ระยะเวลาในการป้อนสนามไฟฟ้า จำนวนของพัลส์ที่ใช้และความถี่ของสนามไฟฟ้าที่ป้อนมีผลต่อผลการทดลองที่ได้รับ แต่ยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีต่อผลการทดลองได้อย่างชัดเจน. นอกจากนี้งานวิจัยแต่ละงานมีรูปแบบใช้ในการทดลองกับเซลล์แตกต่างกัน รวมทั้งชนิดของเซลล์ที่ใช้ก็แตกต่างกัน ทำให้เงื่อนไขที่ใช้จึงแตกต่างกัน และงานวิจัยส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในภาพรวมเป็นหลัก โดยเน้นไปที่ผลการทดลองที่ได้รับเมื่อป้อนค่าพารามิเตอร์ต่างๆให้กับเซลล์ที่ทำการทดลองแต่ไม่ได้เจาะลึกถึงระดับเซลล์เดียว. อีกทั้งการศึกษาในภาพรวมทำให้แรงดันไฟฟ้าที่ป้อนจึงมีค่ามากตามไปด้วย. วิทยานิพนธ์นี้จะทดลองป้อนสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ให้กับเซลล์พืชในระดับเซลล์เดียวผ่านช่องทางการไหลของเซลล์ขนาดไมโครที่ภายในแกนเนลถูกออกแบบให้เป็นฉนวนไฟฟ้าเพื่อควบคุมสนามไฟฟ้าที่เกิดขึ้นภายในแกนเนล. สนามไฟฟ้าที่เกิดขึ้นภายในแกนเนลจะช่วยควบคุมตำแหน่งในการเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สามารถแรงดันไฟฟ้าที่มีค่าน้อย [11, 12]. หลังจากนั้น สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พืชภายใต้เงื่อนไขต่างๆของพัลส์สนามไฟฟ้า.

1.3 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของพารามิเตอร์ต่างๆในการป้อนสนามไฟฟ้าต่อการเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์ในระดับเซลล์เดียว โดยอาศัยเทคนิคทางการผลิตขนาดไมโครสร้างรูปแบบของการกระจายสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมในช่องทางการไหลของเซลล์ขนาดไมโคร เพื่อเป็นพื้นฐานสำหรับการใช้งานวิธี PEF ในระดับมหภาคต่อไป.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 พัฒนาแพลตฟอร์มสำหรับการศึกษาผลของสนามไฟฟ้าในระดับเซลล์เดียว.
- 1.4.2 ได้องค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญเกี่ยวกับการเกิดเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์.

1.5. ระเบียบวิธีวิจัย

1.5.1 ศึกษาพื้นฐานเกี่ยวกับโครงสร้างของเซลล์และบทความวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคสนามไฟฟ้าแบบพัลส์.

1.5.2 ศึกษาทฤษฎีเกี่ยวกับการเกิดเบรกดาวน์ของเยื่อหุ้มเซลล์และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.

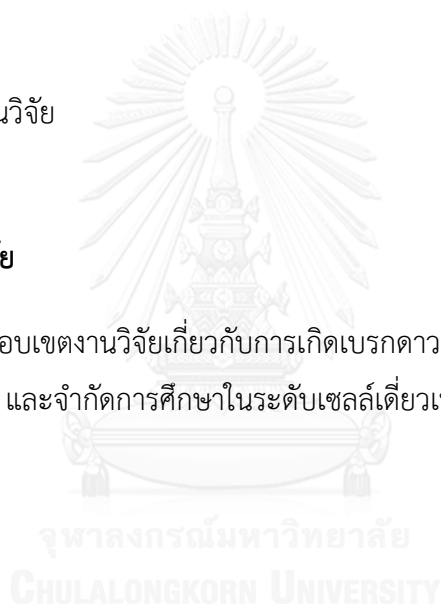
1.5.3 ศึกษาเทคนิคการผลิตชิ้นงานแบบไมโคร จัดทำไมโครแขนเนลสำหรับสารละลายเซลล์ที่จะใช้ในการทดลอง และสร้างอิเล็กทรอนิกส์ที่มีลักษณะรูปร่างเหมาะสม.

1.5.4 ทำการทดลองบนแพลตฟอร์มที่ผลิตขึ้นโดยใช้โพรโทพลาสต์ที่แยกมาจากพืชและวิเคราะห์ผลที่ได้เมื่อแปรค่าพารามิเตอร์ทางไฟฟ้า เช่น ความถี่ เวลาคงอยู่ของพัลส์ จำนวนพัลส์ เป็นต้น.

1.5.5 สรุปผลงานวิจัย

1.6. ขอบเขตของการวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้มีขอบเขตงานวิจัยเกี่ยวกับการเกิดเบรกดาวน์ของเซลล์พืชซึ่งมีขนาดซึ่งมีขนาดปกติตั้งแต่ 20 μm ขึ้นไป และจำกัดการศึกษาในระดับเซลล์เดี่ยวเป็นหลัก.



บทที่ 2

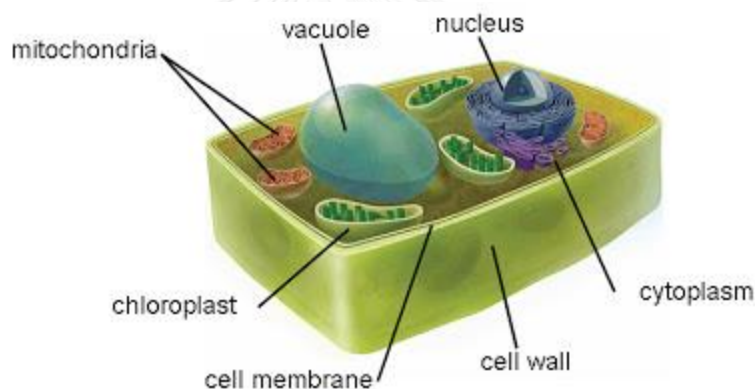
ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์พืช

เซลล์ คือ หน่วยย่อยที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิต. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นพืชหรือสัตว์ล้วนประกอบขึ้นจากเซลล์. เซลล์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด [13] คือ

1) เซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส (Prokaryotic cells) เซลล์ชนิดนี้จะมีขนาดเล็ก โดยทั่วไปได้แก่ เซลล์พืชชั้นต่ำ เซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เซลล์แบคทีเรีย เป็นต้น.

2) เซลล์ที่มีนิวเคลียส (Eukaryotic cells) เซลล์ชนิดนี้จะมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ในชนิดแรกได้แก่ เห็ด รา เซลล์ของพืชและสัตว์ทั่วไป.



รูปที่ 1 โครงสร้างพื้นฐานของเซลล์พืช [14].

เซลล์พืชประกอบด้วยโครงสร้างสำคัญ 4 อย่างได้แก่

1) ผนังเซลล์ (Cell Wall) เป็นส่วนที่อยู่ภายนอกสุดของเซลล์พืชโดยทำหน้าที่ห่อหุ้มเซลล์พืชไว้. โครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบขึ้นมาจากเซลลูโลส เพกทิน ลิกนิน ที่เชื่อมต่อกันเป็นโครงข่าย. ผนังเซลล์จะพบเฉพาะในเซลล์พืช แบคทีเรีย สาหร่ายและรา.

2) เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) เป็นส่วนที่สำคัญต่อการคงอยู่ของเซลล์. เยื่อหุ้มเซลล์ทำหน้าที่กำหนดขอบเขตของเซลล์ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้และรักษาสภาพความแตกต่างระหว่างภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์. เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นเยื่อหุ้มบางประกอบด้วยชั้นไขมันและ

โปรตีน. เยื่อหุ้มเซลล์มีรูเล็กๆ ทำให้สามารถจำกัดขนาดของโมเลกุลของสารที่จะผ่าน. เยื่อหุ้มเซลล์จึงมีสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน (Semipermeable membrane).

3) ไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) ประกอบด้วยส่วนที่เป็นของเหลว (Cytosol) และส่วนที่เป็นอวัยวะเซลล์ (Organelles) ลอยอยู่ภายใน. ส่วนที่เป็นของเหลว (Cytosol) เป็นแหล่งสังเคราะห์และย่อยสลายโปรตีนและเป็นศูนย์กลางการเกิดเมแทบอลิซึม. ส่วนที่เป็นอวัยวะเซลล์หรือออร์แกเนลล์ที่ลอยอยู่ภายในของเหลวประกอบด้วย

3.1) ร่างแหเอนโดพลาสซึม (Endoplasmic reticulum) เป็นแหล่งสังเคราะห์ไขมันและโปรตีนแล้วส่งต่อไปยังกอลจิแอปพาราตัส (Golgi apparatus).

3.2) กอลจิแอปพาราตัส (Golgi apparatus) เป็นแหล่งสะสมโปรตีนและไขมันที่รับมาจากร่างแหเอนโดพลาสซึมและส่งออกไปยังภายนอกเซลล์.

3.3) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เป็นแหล่งสร้างพลังงานให้แก่เซลล์.

3.4) พลาสทิด (Plastid) เป็นอวัยวะเซลล์ที่พบเฉพาะในพืช. พลาสทิดที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ คลอโรพลาสต (Chloroplast) ที่ช่วยในกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช.

3.5) ไลโซโซม (Lysosomes) เป็นแหล่งสะสมเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลายอวัยวะเซลล์ที่เสื่อมสภาพ.

3.6) เพอร์ออกซิโซม (Peroxisomes) เป็นแหล่งสะสมเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลาย H_2O_2 ที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชัน (Oxidation).

3.7) แวคิวโอล (Vacuole) พบในพืชและเชื้อรา. แวคิวโอลมีลักษณะเป็นถุงมีของเหลวอยู่ภายในประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิด. ในเซลล์พืชแวคิวโอลจะทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น เป็นแหล่งสะสมสารอาหารที่สำคัญและของเสียที่เกิดขึ้น เป็นแหล่งกำจัดส่วนที่เสื่อมสภาพของเซลล์ ควบคุมการเพิ่มขนาดของเซลล์และควบคุมแรงดันออสโมติก.

4) นิวเคลียส (Nucleus) เป็นแหล่งสะสม DNA และสารพันธุกรรม. นิวเคลียสถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มนิวเคลียสซึ่งมี 2 ชั้นและมีลักษณะเป็นรูพรุน. สำหรับเซลล์ทั่วไป นิวเคลียสจะมีปริมาตรประมาณ 10% ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมด.

2.2 เบรกดาวนัทางไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์

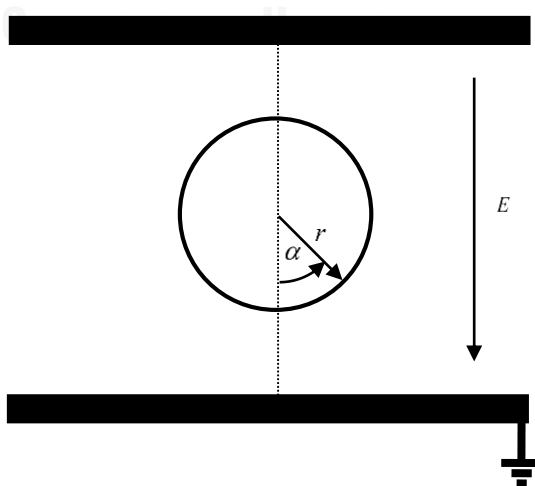
เมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า เซลล์สิ่งมีชีวิตจะเกิดศักย์ไฟฟ้าตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากการอัดประจุที่ด้านทั้งสองของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีสภาพนำไฟฟ้าต่ำกว่าตัวกลางด้านในและด้านนอกมาก. ในสภาวะคงตัวภายใต้สนามไฟฟ้าสม่ำเสมอแบบกระแสดตรง E จะได้ความสัมพันธ์ของแรงดันตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ V_M เป็น [15]

$$V_M = 1.5rE \cos\alpha \quad (1)$$

โดยที่ r คือ รัศมีของเซลล์ และ α คือ มุมที่รัศมีของเซลล์กระทำต่อทิศทางของสนามไฟฟ้า อ้างอิงตามรูปที่ 2.

สมการที่ (1) แสดงว่า V_M มีขนาดสูงสุดที่บริเวณขั้วด้านบนและขั้วด้านล่าง ($\alpha = 0$ หรือ π) โดยสมการที่ (1) สมมติให้เซลล์มีลักษณะเป็นทรงกลมและละเลยสภาพนำของเยื่อหุ้มเซลล์. เมื่อแรงดันไฟฟ้า V_M สูงกว่าค่าวิกฤติค่าหนึ่ง จะเกิดการเบรกดาวนัของเยื่อหุ้มเซลล์ขึ้น. การเบรกดาวนัอาจเป็นแบบชั่วคราวซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์สามารถคืนสภาพนวนไฟฟ้าได้หลังจากตัดสนามไฟฟ้าออกไปแล้ว หรือเป็นการเบรกดาวนัแบบถาวรซึ่งทำให้เซลล์ตายได้ (Cell lysis).

การเบรกดาวนัแบบชั่วคราวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในทางการเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้า (Electrofusion) หรือการฉีดสารเข้าสู่เซลล์ด้วยไฟฟ้า (Electroinjection). การเบรกดาวนัแบบถาวรสามารถนำไปใช้งานในด้านการยับยั้งการเติบโตของเซลล์แบคทีเรีย (Inactivation) การสกัดสาร (Extraction) การขจัดน้ำ (Dehydration).



รูปที่ 2 แบบจำลองของเซลล์เมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้า.

ในกรณีที่สนามไฟฟ้าที่ป้อนให้กับเซลล์เป็นแบบกระแสสลับรูปคลื่นไซน์ มีความถี่เชิงมุม ω แรงดันตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดขึ้นจะมีค่าตามความสัมพันธ์ [15]

$$V_M = \frac{1.5rE \cos\alpha}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} \quad (2)$$

โดยที่ τ คือ ค่าคงตัวของเวลาของการอัดประจุเซลล์ (Relaxation time).

สำหรับกรณีที่ละลายสภาพนำของเยื่อหุ้มเซลล์ ค่าคงตัวของเวลาของการอัดประจุเซลล์จะเป็นไปตามความสัมพันธ์[15]

$$\tau = rC_m \left(\rho_i + \frac{\rho_e}{2} \right) \quad (3)$$

โดยที่ C_m คือ ความจุไฟฟ้าจำเพาะของเยื่อหุ้มเซลล์ (Specific membrane capacitance).

ρ_i คือ สภาพต้านทานของตัวกลางภายในเซลล์.

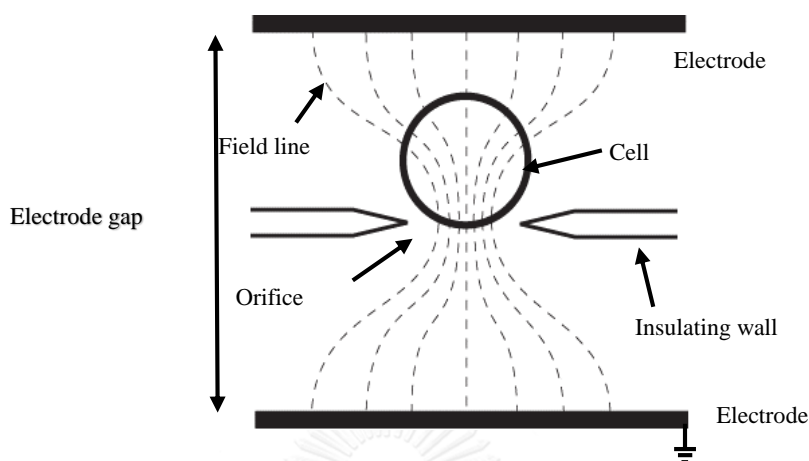
ρ_e คือ สภาพต้านทานของตัวกลางภายนอกเซลล์.

ปกติแล้วเยื่อหุ้มเซลล์โดยทั่วไปจะเบรกดาวนที่แรงดันประมาณ 1 V [15]. หากพิจารณาเซลล์ที่มีรัศมี 10 μm สภาพนำของตัวกลางภายในเซลล์มีค่าเป็น 1 S/m [12] สภาพนำของตัวกลางภายนอกเซลล์มีค่าเป็น 50 mS/m ค่าความจุไฟฟ้าจำเพาะของเยื่อหุ้มเซลล์เป็น 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ จากความสัมพันธ์ตามสมการที่ (3) จะได้ค่าคงตัวของเวลาของการอัดประจุเซลล์ $\tau = 1.1 \mu\text{s}$. เมื่อใช้แรงดันรูปคลื่นความถี่ 1 kHz สร้างสนามไฟฟ้า E จะต้องใช้ค้ายอดของสนามไฟฟ้าเท่ากับ 66.67 kV/m เพื่อให้ได้ $V_M = 1 \text{ V}$ ที่ขั้วของเซลล์ ($\alpha = 0$ หรือ π) ตามสมการที่ (2).

2.3 สนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมการกระจาย

เพื่อที่จะลดแรงดันที่ป้อนให้เซลล์ในการกระตุ้นให้เกิดการเบรกดาวน ผู้วิจัยจึงได้นำระบบของไหลขนาดไมโคร (microfluidics) เข้ามาช่วย. ภายในช่องทางของไหลสารละลายเซลล์จะมีกำแพงฉนวน (insulating wall) กั้นตรงกลางของช่องทางของไหล และจะมีช่องเปิด (orifice) ที่อยู่ระหว่างกำแพงฉนวนดังแสดงในรูปที่ 3. ช่องเปิดที่อยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าจากขั้วอิเล็กโทรดดังแสดงในรูปที่ 3 ควบคุมทิศทางกรไหลของกระแสไฟฟ้าภายในช่องทางเดินสาร ทำให้บริเวณช่องเปิดนี้มีความหนาแน่นกระแสสูงมาก และหากเซลล์อยู่ในตำแหน่งดังกล่าว ความหนาแน่นกระแสสูงจะช่วยให้การอัดประจุไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว. สนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมนี้ลดแรงดันที่ต้องป้อน

ให้แก่เซลล์. สังเกตว่า สำหรับผลของสนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมที่ช่วยการอัดประจุที่เยื่อหุ้มเซลล์ ช่องเปิดควรมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เพื่อลดการรั่วไหลของกระแสไฟฟ้าระหว่างเซลล์และกำแพงฉนวน.



รูปที่ 3 สนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมด้วยช่องเปิด (orifice) บนกำแพงฉนวน.

2.4 เทคนิคการผลิตชิ้นงานขนาดไมโครสำหรับทดลอง

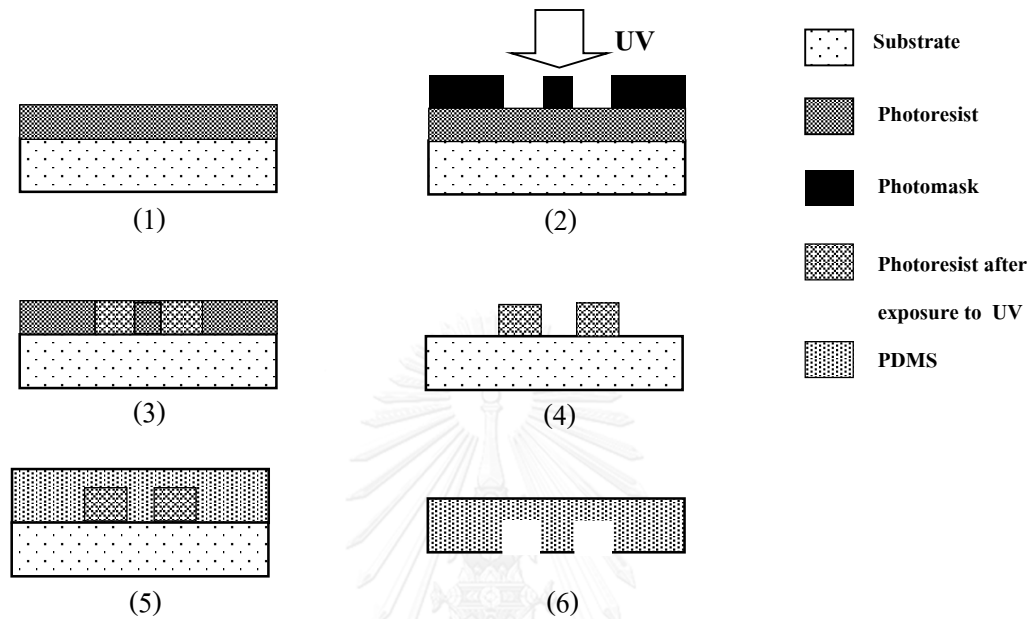
2.4.1 วิธี Soft lithography

Soft lithography เป็นวิธีที่ใช้ในการผลิตชิ้นงานขนาดไมโคร และมีบทบาทสำคัญในระบบของไหลขนาดไมโคร. Soft lithography สามารถใช้สร้างได้ตั้งแต่แขนเนลรูปแบบพื้นฐานอย่างง่ายไปจนถึงไมโครแขนเนลขนาดเล็กที่ซับซ้อน [16]. Soft lithography เริ่มต้นจากการสร้างแม่พิมพ์บนแผ่นแก้วหรือซิลิคอนด้วยวิธี photolithography [17] และนำแม่พิมพ์ไปสร้างไมโครแขนเนลด้วยสารพอลิเมอร์ต่างๆ เช่น polydimethylsiloxane (PDMS). ขั้นตอนการทำไมโครแขนเนลในวิทยานิพนธ์นี้สามารถอธิบายแบบย่อตามรูปที่ 4 ดังนี้.

- (1) ติดฟิล์มไวแสง (photoresist) กับฐานรอง (substrate) ซึ่งทำมาจากแผ่นแก้วสไลด์.
- (2) นำฟิล์มไวแสงไปฉายแสง UV โดยควบคุมตำแหน่งของฟิล์มที่ได้รับแสงด้วย photomask ซึ่งแสดงรูปร่างของไมโครแขนเนล.
- (3) ฟิล์มไวแสงส่วนที่ได้รับแสง UV จะเปลี่ยนสภาพในกรณีที่เป็นฟิล์มไวแสงแบบลบ (negative photoresist).
- (4) Develop ฟิล์มที่ผ่านการฉายแสง UV ทำให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นรูปร่างของแขนเนลที่จะนำไปทำแม่พิมพ์ต่อไป.

(5) เท PDMS ซึ่งเป็นยางซิลิโคนชนิดหนึ่งลงใส่แม่พิมพ์ และนำไปอบเพื่อให้ PDMS แข็งตัว.

(6) ลอก PDMS ที่แห้งแล้วออกจากแม่พิมพ์ จะได้ไมโครเซนเนล



รูปที่ 4 ขั้นตอนการทำไมโครเซนเนลด้วยวิธี Soft lithography.

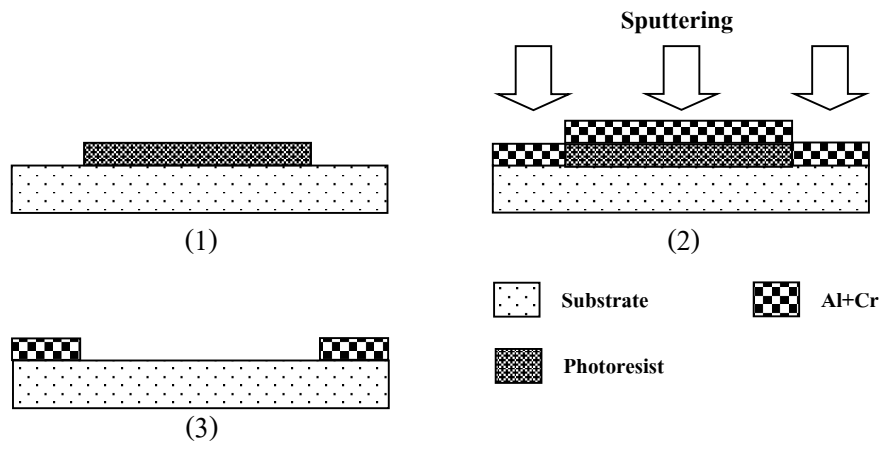
2.4.2 วิธี Lift-off

Lift-off เป็นวิธีหนึ่งสำหรับสร้างชั้นฟิล์มบางของวัสดุที่ต้องการบนเป้าหมาย ซึ่งวิทยานิพนธ์นี้ใช้สร้างอิเล็กทรอนิกส์สำหรับป้อนสนามไฟฟ้าให้กับเซลล์ไมโครเซนเนล. วิธี lift-off เริ่มจากการสร้างรูปแบบของอิเล็กทรอนิกส์จากฟิล์มไวแสงตามขั้นตอนที่ (1) ถึง (4) ในหัวข้อ 2.3.1 หลังจากนั้นจึงสร้างชั้นฟิล์มบางของอะลูมิเนียมลงบนฟิล์มไวแสงอีกชั้นหนึ่ง. ขั้นตอนการสร้างอิเล็กทรอนิกส์ด้วยวิธี lift-off สามารถอธิบายได้ตามรูปที่ 5.

(1) สร้างรูปร่างของฟิล์มไวแสงให้เหลือเฉพาะส่วนที่เป็นแก๊วระหว่างสำหรับอิเล็กทรอนิกส์โดยใช้ขั้นตอนที่คล้ายคลึงกับในหัวข้อ 2.3.1.

(2) นำไปเคลือบฟิล์มโลหะ (Al และ Cr) ด้วยวิธี sputtering ทับลงบนชิ้นงาน.

(3) ขจัดฟิล์มไวแสงออกด้วยสารละลายที่เหมาะสม จะได้รูปแบบของอิเล็กทรอนิกส์ที่ต้องการ.



รูปที่ 5 ขั้นตอนการสร้างอิเล็กทรอนิกส์ด้วยวิธี lift-off.

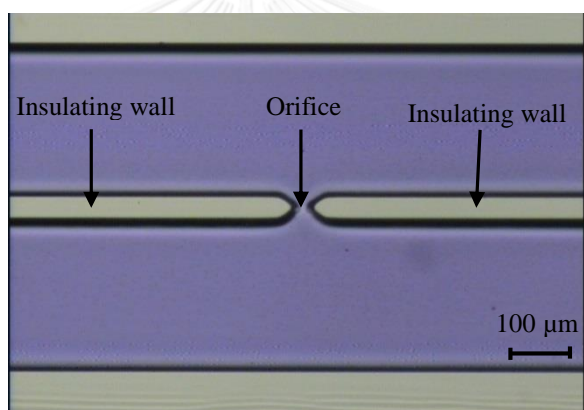


บทที่ 3

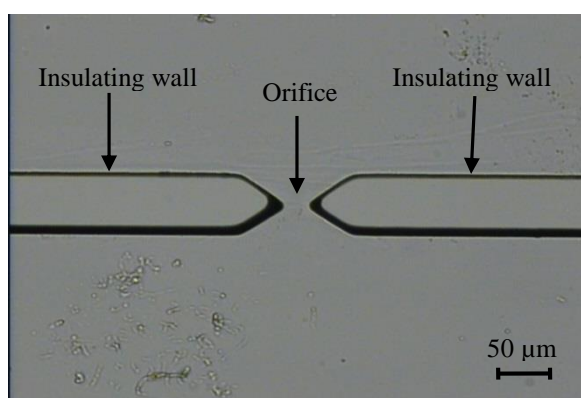
การทดลอง

3.1 การผลิตเซนเนลขนาดไมโคร

ผู้ทำวิทยานิพนธ์ได้ผลิตเซนเนลขนาดไมโครโดยใช้ฟิล์มไวแสงชนิดลบ (RY-3315EE, Hitachi Chemical) ซึ่งมีความหนา 15 μm ติดกับแผ่นแก้วสะอาดเป็นจำนวน 2 ชั้น แล้วนำไปฉายแสงผ่าน photomask ที่มีความกว้างของเซนเนล 650 μm ด้วยแสง UV นาน 10 วินาที. หลังจากนั้นใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 1% โดยมวลเป็น developer. แม่พิมพ์สำหรับการหล่อไมโครเซนเนลที่ได้แสดงดังรูปที่ 6 โดยบริเวณของช่องตรงกลางของแม่พิมพ์จะเป็นส่วนที่เป็นกำแพงฉนวน (Insulating wall) และบริเวณรอยต่อของกำแพงฉนวนคือช่องเปิด (Orifice).

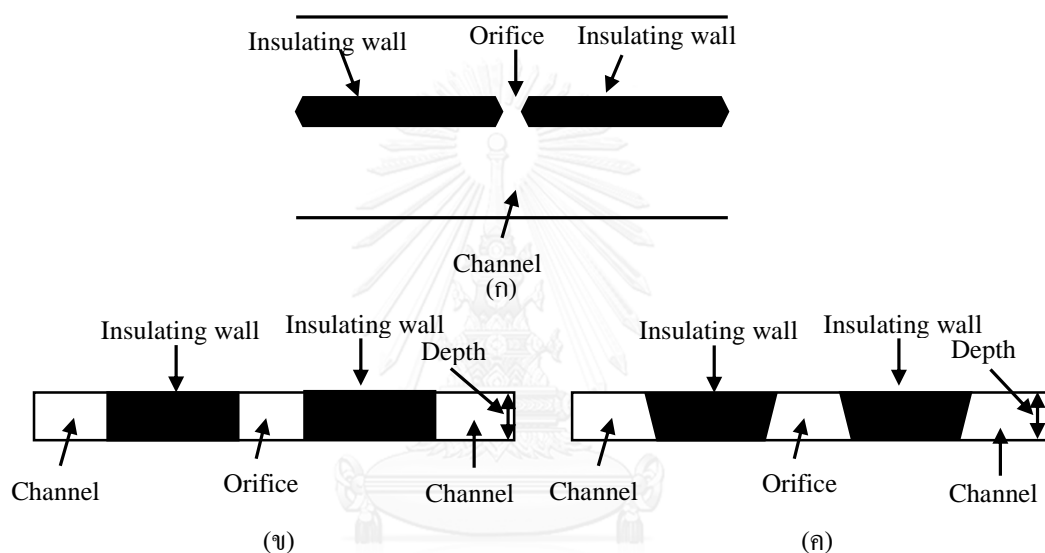


รูปที่ 6 รูปของแม่พิมพ์ไมโครเซนเนลที่สร้างจากฟิล์มไวแสง.



รูปที่ 7 รูปภายในของไมโครเซนเนลที่ได้.

งานวิจัยนี้ใช้ PDMS (KE-106, Shin-Etsu) ที่ผสมกับสารบ่ม (CAT-RG, Shin-Etsu) ในอัตราส่วน 10:1 โดยมีอุณหภูมิในการบ่ม 120 °C อย่างน้อย 12 ชั่วโมงเป็นสารซิลิโคนที่ขึ้นรูปเป็นไมโครแชนเนล. รูปที่ 7 แสดงภาพถ่ายภายใต้ไมโครแชนเนลที่ผลิตได้จริงโดยกำหนดความกว้าง 60 μm ช่องเปิดกว้าง 20 μm และมีความลึก 30 μm . รูปที่ 8 (ก) แสดงภาพร่างมุมมองด้านบนของไมโครแชนเนล (ข) แสดงภาพร่างมุมมองด้านข้างของไมโครแชนเนลที่ควรผลิตได้ตามแบบ photomask (ค) แสดงภาพร่างมุมมองด้านข้างของไมโครแชนเนลที่ได้จากการผลิต. จะพบว่าช่องเปิดที่ผลิตได้จริงจะมีขนาดกว้างกว่าเมื่อเทียบกับ photomask ซึ่งเป็นผลจากการ develop ฟิล์มไวแสงในขั้นตอนการสร้างแม่พิมพ์.



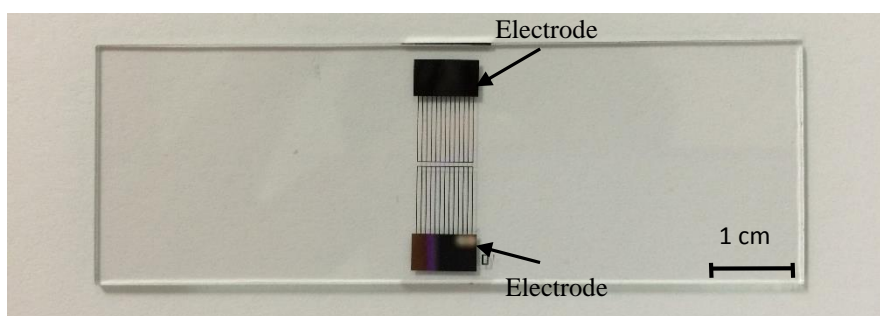
รูปที่ 8 ภาพร่างของไมโครแชนเนล.

(ก) มุมมองด้านบน (ข) มุมมองด้านข้างตาม photomask (ค) มุมมองด้านข้างที่ผลิตได้.

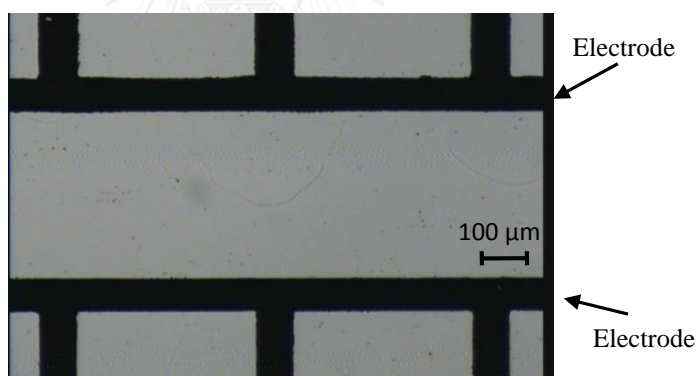
3.2 การผลิตอิเล็กทรอนิกส์

นำฟิล์มไวแสงชนิดลบ (RY-3315EE, Hitachi Chemical) ที่มีความหนา 15 μm ติดกับแผ่นแก้วสะอาด แล้วนำไปฉายแสง UV ผ่าน photomask ซึ่งมีรูปร่างของมัลติอิเล็กโทรดที่มีแคบ 400 μm เป็นเวลานาน 5 วินาที. ใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 1% โดยมวลเป็น developer จะได้แผ่นแก้วที่มีรูปร่างตามอิเล็กโทรดที่ต้องการ. นำแผ่นแก้วดังกล่าวไปเคลือบฟิล์มโครเมียมและอะลูมิเนียมด้วยกระบวนการ Sputtering. โดยขั้นตอนการ sputtering เริ่มต้นจากการทำความสะอาดผิวหน้าด้วย plasma ที่ 75 W เป็นเวลา 5 นาที. หลังจากนั้นจึงเคลือบชั้นฟิล์มโครเมียมโดยใช้ปรับกระแสเป็น 0.3 A เป็นเวลา 12 นาที แล้วจึงเคลือบชั้นฟิล์มอะลูมิเนียมโดยปรับ

กระแส 0.2 A เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 รอบ. ในการเคลือบชั้นอะลูมิเนียมแต่ละรอบ เมื่อครบ 5 นาที จะต้องพักเครื่องไว้อย่างน้อย 5 นาทีเพื่อป้องกันความร้อนที่เกิดในกระบวนการซึ่งจะทำให้ฟิล์มไวแสงหดตัว. เมื่อเสร็จกระบวนการ sputtering แล้วลอก photoresist ออกด้วยแอซีโตน. อิเล็กโทรดที่ผลิตได้จะมีความหนาของชั้นโครเมียมและอะลูมิเนียมทั้งหมดประมาณ 200 nm และมีระยะห่างระหว่างขั้วอิเล็กโทรดเป็น 400 μm . รูปที่ 9 แสดงรูปของแผ่นแก้วและอิเล็กโทรดที่ผลิตได้. รูปที่ 10 แสดงภาพถ่ายอิเล็กโทรดด้วยกล้องจุลทรรศน์.



รูปที่ 9 อิเล็กโทรดที่ได้จากกระบวนการ lift-off.

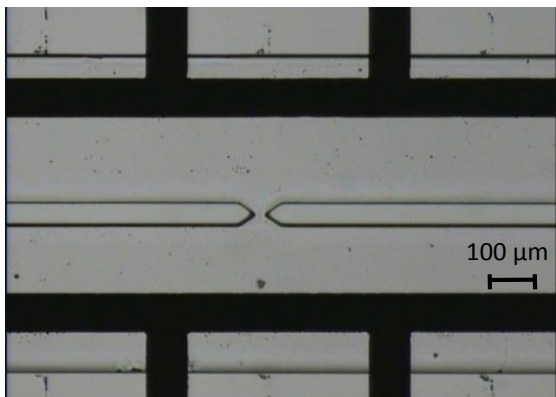


รูปที่ 10 ภาพถ่ายอิเล็กโทรดจากกล้องจุลทรรศน์.

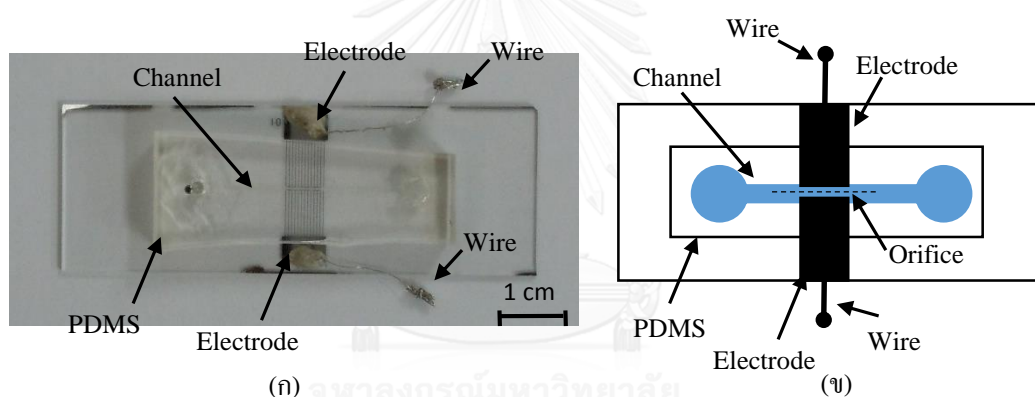
3.3 การประกอบชิ้นงานสำหรับทดลอง

ไมโครเซนเนลที่ได้ถูกปรับสภาพพื้นผิวด้วยเครื่องโคโรนาดีสชาร์จ (BD-20V, Electro Technic) แล้วจึงประกอบเข้าด้วยกันกับอิเล็กโทรด. ในการประกอบนั้น ต้องให้ขั้วอิเล็กโทรดยื่นเข้าไปภายในระหว่างช่องทางของไหลดังแสดงในรูปที่ 11 และรอยต่อของไมโครเซนเนลและแผ่นแก้วอิเล็กโทรดต้องไม่มีรอยร้าว. หลังจากประกอบชิ้นงานเข้าด้วยกันแล้วจึงนำไปต่อกับลวดตัวนำด้วย

อีพ็อกซีนำไฟฟ้า(Circuitworks, Chemtronic). รูปที่ 12 แสดงชิ้นงานจริงเปรียบเทียบกับภาพร่างของชิ้นงานโดยแสดงชิ้นส่วนต่างๆที่ประกอบขึ้นเป็นชิ้นงานทดลอง.



รูปที่ 11 อิเล็กโทรดอยู่ระหว่างช่องทางของไหล.



รูปที่ 12 ชิ้นงานทดลอง (ก) ชิ้นงานจริง (ข) ภาพร่างชิ้นงาน.

3.4 การสกัดโปรโทพลาสต์

โปรโทพลาสต์ที่ใช้ในการทดลองสกัดได้จากพืช 2 ชนิด ได้แก่ ไควาเระ และดอกอัญชัน โดยวิธีการสกัดจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของพืชที่ใช้.

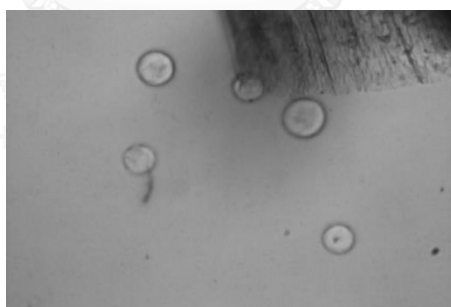
3.4.1 การสกัดโปรโทพลาสต์จากต้นไควาเระ

ผู้วิจัยได้สกัดโปรโทพลาสต์จากต้นไควาเระโดยนำเฉพาะส่วนลำต้นของไควาเระมาหั่นเป็นฝอยขนาดเล็กประมาณ 0.5 mm ด้วยใบมีดโกน แล้วจึงนำส่วนที่หั่นเสร็จแล้วไปแช่ไว้ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES เป็นเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อย่อยสลายส่วนผนังเซลล์และให้เซลล์หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยว. สารละลายบัฟเฟอร์ MES สำหรับสกัดโปรโทพลาสต์จากต้นไควาเระประกอบด้วย Cellulase R-10

(Yakult Pharmaceutical) 1.5% โดยมวล, Macerozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical) 0.75% โดยมวล, Mannitol 0.6 M และ MES 10 mM และมีค่า pH ของสารละลายเท่ากับ 5.7. รูปที่ 14 แสดงโพรโทพลาสต์ที่หลุดออกมาจากลำต้นของไคววาระภายหลังแช่สารละลายบัฟเฟอร์ MES นาน 4 ชั่วโมง. หลังจากนั้นนำไปกรองส่วนที่ไม่ต้องการทิ้งด้วยตะแกรงอลูมิเนียมขนาดช่อง 106 และ 63 μm ตามลำดับ. กรองชั้นสุดท้ายด้วยตาข่ายไนลอนขนาด 50 μm . โพรโทพลาสต์ที่กรองได้จะถูกแยกจากสารละลายโดยใช้การปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (LMC-3000, Biosan) ที่อัตราเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง. โพรโทพลาสต์ที่ถูกแยกออกมาจากสารละลายจะถูกรักษาสภาพด้วยสารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.6 M ที่มีค่า pH = 5.7.



รูปที่ 13 ต้นไคววาระ.



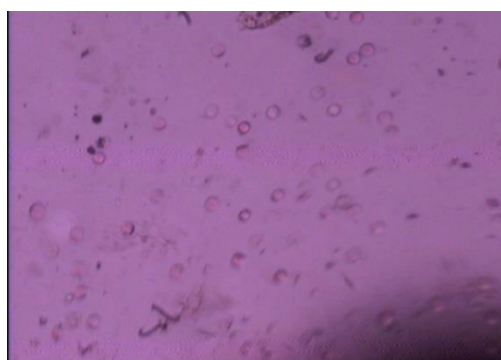
รูปที่ 14 โพรโทพลาสต์ที่หลุดออกมาจากลำต้นไคววาระ.

3.4.2 การสกัดโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน



รูปที่ 15 ดอกอัญชัน.

ผู้วิจัยได้สกัดโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) โดยหั่นกลีบดอกอัญชันเป็นฝอยขนาดเล็ก และนำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ MES นาน 4 ชั่วโมงเพื่อย่อยส่วนผนังเซลล์ และให้เซลล์หลุดออกมาเป็นเซลล์เดี่ยวโดยโพรโทพลาสต์ที่หลุดออกมาแสดงดังรูปที่ 16. สารละลายบัฟเฟอร์ MES สำหรับใช้สกัดโพรโทพลาสต์จากกลีบดอกอัญชันประกอบด้วย Cellulase R-10 (Yakult Pharmaceutical) 3 % โดยมวล, Macerozyme R-10 (Yakult Pharmaceutical) 0.5 % โดยมวล, CaCl_2 0.055% , Mannitol 0.4 M และ MES 10 mM และมีค่า pH ของสารละลายเป็น 5.6. หลังจากนั้นนำสารละลายและโพรโทพลาสต์ที่แช่ไว้ไปกรองด้วยตะแกรงอลูมิเนียมขนาดช่อง 106 และ 63 μm แล้วกรองด้วยตาข่ายไนลอนขนาด 50 μm . โพรโทพลาสต์ที่กรองเสร็จแล้วจะถูกแยกออกจากสารละลายโดยการปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (LMC-3000, Biosan) ด้วยอัตราเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง. โพรโทพลาสต์ที่แยกสำเร็จแล้วจะถูกนำมาศึกษาสภาพในสารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.4 M และ CaCl_2 ความเข้มข้น 0.0276 % และมีค่า pH = 5.6.

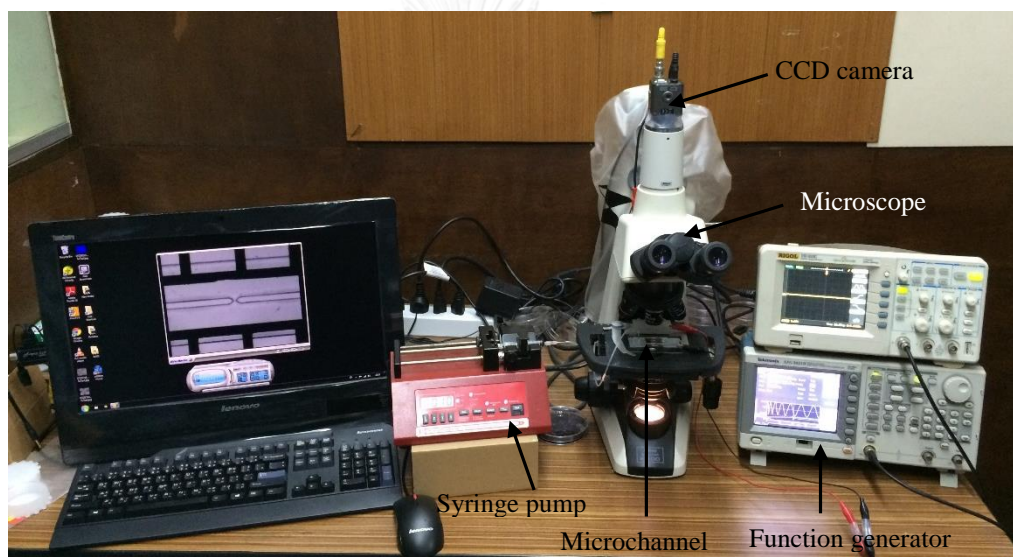


รูปที่ 16 โพรโทพลาสต์ที่หลุดออกมาจากกลีบดอกอัญชัน.

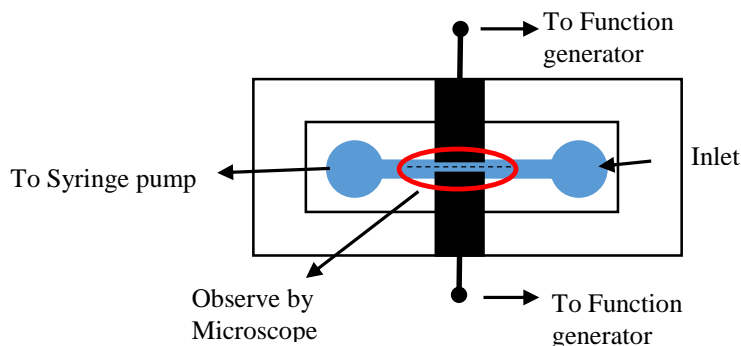
3.5 การทดลอง

3.5.1 การเชื่อมต่อระบบของไหล

การเชื่อมต่อขณะทดลองแสดงดังรูปที่ 17 โดยโพโรโทพลาสติกจะถูกป้อนเข้าสู่ไมโครแชนเนลด้วยปั๊มกระบอกฉีดยา (NE-1000, New era pump system) ผ่านทางช่องทางเข้า (inlet). เมื่อเซลล์หรือโพโรโทพลาสติกอยู่ภายใต้บริเวณอิเล็กโทรดแล้ว เซลล์จะถูกป้อนแรงดันรูปคลื่นไซน์ด้วยเครื่องกำเนิดสัญญาณ (AFG 3201B, Tektronix). ผู้วิจัยสังเกตและบันทึกผลการเกิดเบรกดาวนของเซลล์ขณะทดลองโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (E200, Nikon) ที่ต่อเข้ากับกล้อง CCD (WAT-231S2, Watec) เพื่อบันทึกภาพการทดลอง. รูปที่ 18 แสดงภาพร่างการเชื่อมต่อระหว่างไมโครแชนเนลกับอุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง.

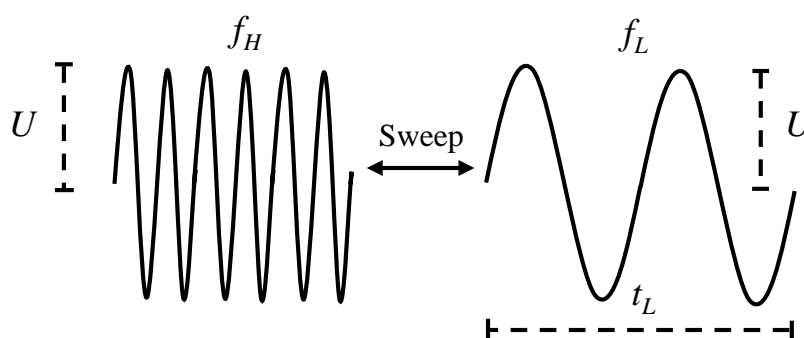


รูปที่ 17 การเชื่อมต่อขณะทดลอง.



รูปที่ 18 ภาพร่างการเชื่อมต่อระหว่างไมโครแชนเนลกับอุปกรณ์ทดลอง

3.5.2 รูปคลื่นแรงดันไฟฟ้า



รูปที่ 19 รูปคลื่นในการทดลอง.

ผู้วิจัยใช้คลื่นรูปไซน์ในการทดลองแสดงดังรูปที่ 19 โดยมีค่าพารามิเตอร์ดังต่อไปนี้

U คือ ขนาดแอมพลิจูดของคลื่นไซน์ที่ใช้ทดลอง

f_H คือ คลื่นความถี่สูง (ใช้เพื่อดึงดูดเซลล์หรือโปรโทพลาสต์เข้าสู่ orifice)

f_L คือ คลื่นความถี่ต่ำ (ใช้เพื่อกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเบรกดาวน)

t_L คือ ช่วงเวลาการคงอยู่ของคลื่นความถี่ต่ำ.

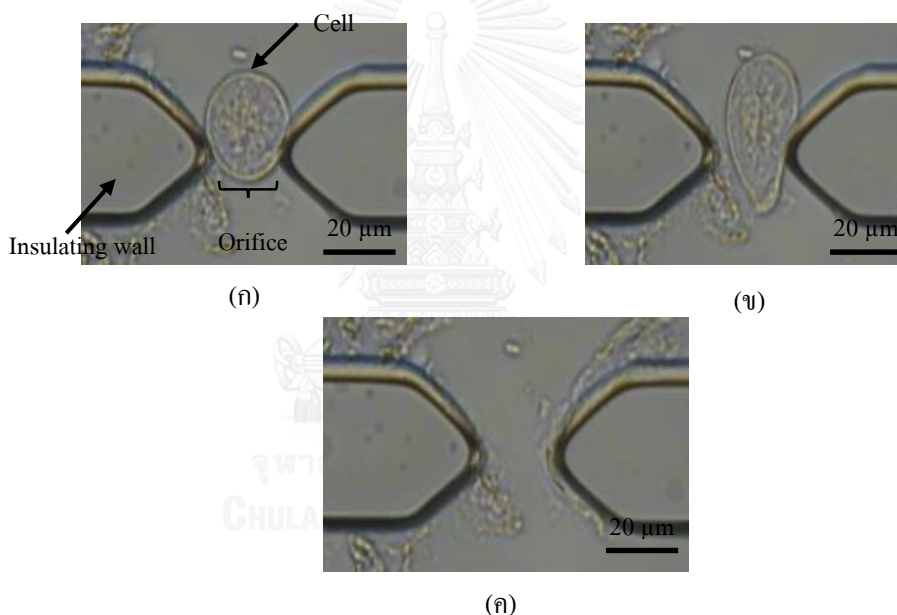
ขั้นตอนในการทดลองจะเริ่มต้นเมื่อเซลล์หรือโปรโทพลาสต์เข้ามาสู่บริเวณภายใต้อิเล็กโตรด. ผู้วิจัยได้ป้อนแรงดันรูปคลื่นไซน์ความถี่สูง f_H เพื่อดึงดูดเซลล์หรือโปรโทพลาสต์เข้ามายังบริเวณ orifice ด้วยแรงไดอิเล็กโตรโฟรีติก (dielectrophoretic force). เมื่อเซลล์เข้าสู่ orifice อย่างสมบูรณ์ แรงดันรูปคลื่นไซน์ความถี่ต่ำ f_L จะถูกป้อนให้กับเซลล์ทดลองด้วยการใช้ sweep mode ของเครื่องกำเนิดสัญญาณเพื่อกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเบรกดาวน. ในการทดลองแต่ละเซลล์นั้น ผู้วิจัยจะป้อนคลื่นความถี่ต่ำจะถูกป้อนให้แต่ละเซลล์สูงสุดเพียง 3 ครั้งต่อเซลล์. การเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ที่เห็นได้อย่างชัดเจน เช่น พบเปลือกของเยื่อหุ้มเซลล์ลอกออกมาจากเซลล์ หรือ ปริมาตรเซลล์ทดลองมีขนาดลดลงอย่างเห็นได้ชัด เป็นต้น.

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเบรกดาวนของโพรโทพลาสต์จากลำต้นไคววาเร

ผู้วิจัยได้ป้อนแรงดันไฟฟ้ารูปคลื่นไซน์โดยมีเงื่อนไขคือ ขนาด $10 V_p$, ความถี่สูง $f_H = 5 \text{ MHz}$ และความถี่ต่ำ $f_L = 10, 33, 50, 100$ หรือ 200 kHz โดยมีเวลาคงอยู่ t_L ของแรงดันความถี่ต่ำ = 10 ms . สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายที่ใช้ทดลองมีค่าอยู่ในช่วง $45\text{--}155 \text{ mS/m}$. ผลการทดลองจากกลุ่มเซลล์ตัวอย่างพบว่าจากเงื่อนไขการทดลองข้างต้นสามารถกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเบรกดาวนได้. ลักษณะของการเบรกดาวนที่เกิดขึ้นในการทดลองสามารถอธิบายได้ดังรูปที่ 20.



รูปที่ 20 เซลล์เบรกดาวนขณะทดลอง

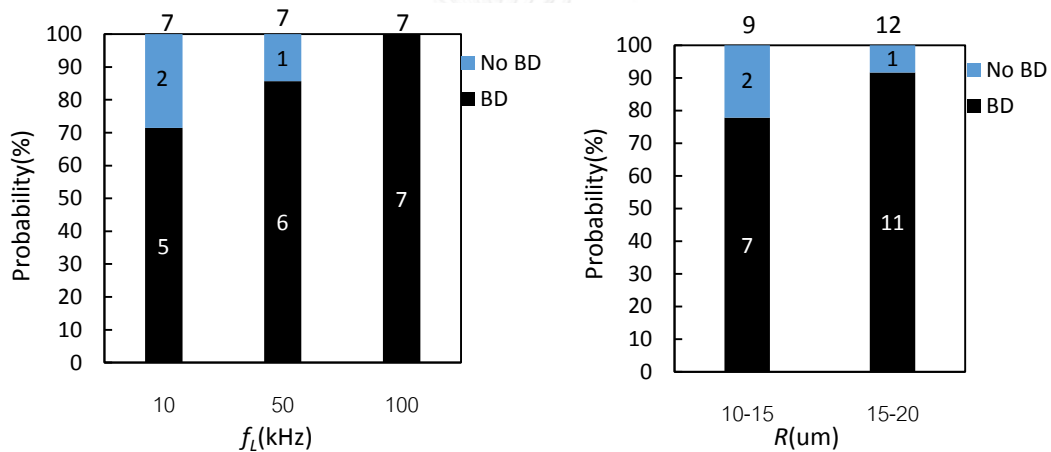
(ก) เซลล์ยึดกับช่องเปิด (orifice) (ข) เซลล์ขณะกำลังเกิดเบรกดาวน (ค) ภายหลังเกิดการเบรกดาวน.

เมื่อผู้วิจัยป้อนแรงดันความถี่สูง f_H เซลล์จะถูกดึงดูดเข้าสู่ช่องเปิด (orifice) ด้วยแรงไดอิเล็กโตรโพรติก (dielectrophoretic force) ดังรูปที่ 20(ก). หลังจากนั้น เซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดเบรกดาวนด้วยแรงดันความถี่ต่ำ f_L . รูปที่ 20(ข) แสดงภาพขณะที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดการเบรกดาวน. หากความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าในขณะนั้นมีมากพอที่จะทำให้เกิดแรงดันตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์มาก เบรกดาวนที่เกิดขึ้นจะรุนแรงมากจนเซลล์เสียสภาพอย่างสมบูรณ์ดังรูปที่ 20(ค). สำหรับการ

เบรกคาว์นของโพรโทพลาสต์จากลำต้นไควาเร่ ผู้วิจัยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ และปริมาตรที่ลดลงของเซลล์ที่พบอย่างชัดเจนเท่านั้น.

สภาพหน้าของสารละลาย 150 mS/m

รูปที่ 21 แสดงผลของอัตราการเกิดเบรกคาว์นเมื่อสารละลายมีสภาพหน้า 150 mS/m เมื่อป้อนแรงดัน 10 V_p, ความถี่ต่ำ $f_L = 10, 50$ และ 100 kHz ที่ $t_L = 10$ ms โดยตัวเลขที่อยู่ด้านบน อัตราการเกิดเบรกคาว์นแสดงถึงจำนวนเซลล์ทดลองทั้งหมดของเบรกคาว์นที่ถูกแยกตามความถี่ต่ำ f_L และรัศมีเซลล์. รูปที่ 21(ก) แสดงว่าอัตราการเกิดเบรกคาว์นสูงที่สุดที่ความถี่ต่ำ $f_L = 100$ kHz. รูปที่ 21(ข) แสดงว่าเซลล์ที่มีรัศมีในช่วง 15–20 μm มีอัตราการเกิดเบรกคาว์นมากกว่าเซลล์ที่มีรัศมีในช่วง 10–15 μm .



(ก)

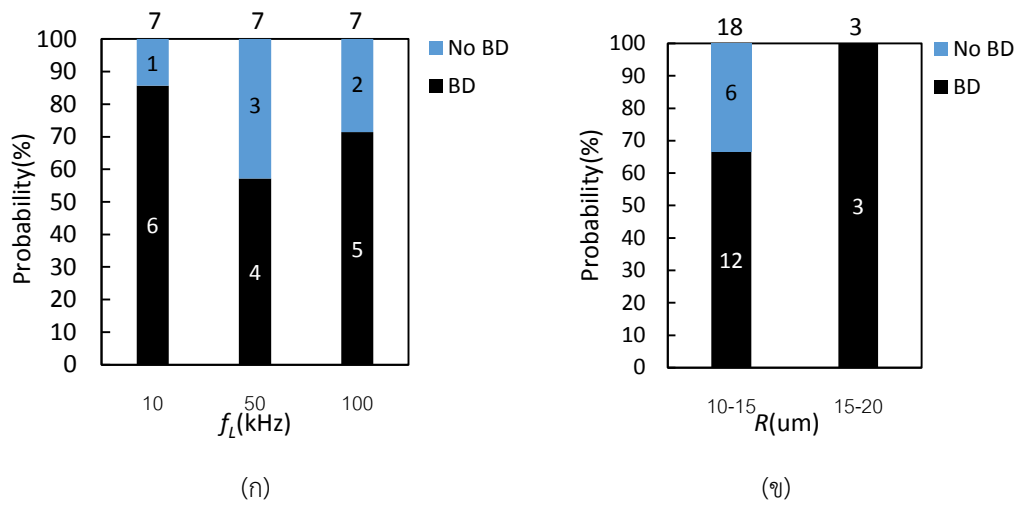
(ข)

รูปที่ 21 อัตราการเกิดเบรกคาว์นเมื่อสารละลายมีสภาพหน้า = 150 mS/m

แยกตาม (ก) ความถี่ต่ำ f_L (ข) ขนาดเซลล์.

สภาพหน้าของสารละลาย 98 mS/m

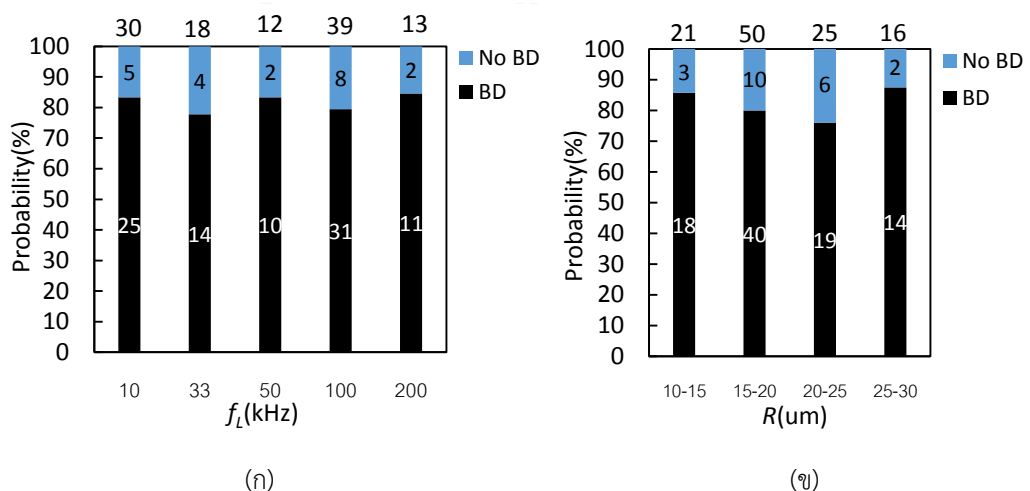
รูปที่ 22 แสดงผลของอัตราการเกิดเบรกคาว์นเมื่อสารละลายมีสภาพหน้า 98 mS/m เมื่อป้อนแรงดัน 10 V_p, ความถี่ต่ำ $f_L = 10, 50$ และ 100 kHz ที่ $t_L = 10$ ms โดยตัวเลขที่อยู่ด้านบน อัตราการเกิดเบรกคาว์นแสดงถึงจำนวนเซลล์ทดลองทั้งหมดของเบรกคาว์นที่ถูกแยกตามความถี่ต่ำ f_L และรัศมีเซลล์. รูปที่ 22(ก) แสดงว่าอัตราการเกิดเบรกคาว์นสูงที่สุดที่ความถี่ต่ำ $f_L = 50$ kHz. รูปที่ 22(ข) แสดงว่าเซลล์ที่มีรัศมีในช่วง 15–20 μm มีอัตราการเกิดเบรกคาว์นมากกว่าเซลล์ที่มีรัศมีในช่วง 10–15 μm .



รูปที่ 22 อัตราการเกิดเบรกดาวน์เมื่อสารละลายมีสภาพนำ = 98 mS/m
แยกตาม (ก) ความถี่ต่ำ f_L (ข) ขนาดเซลล์.

สภาพนำของสารละลายในช่วง 45–55 mS/m

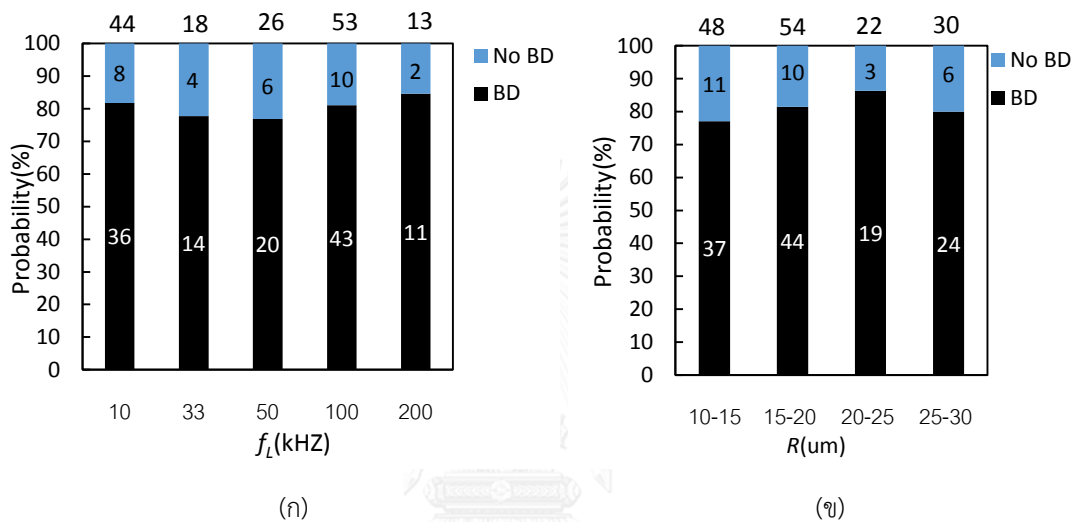
รูปที่ 23 แสดงผลของอัตราการเกิดเบรกดาวน์เมื่อสารละลายมีสภาพนำในช่วง 45–55 mS/m เมื่อป้อนแรงดัน 10 V_p, ความถี่ต่ำ $f_L = 10, 33, 50, 100$ และ 200 kHz ที่ $t_L = 10$ ms โดยตัวเลขที่อยู่ด้านบนอัตราการเกิดเบรกดาวน์แสดงถึงจำนวนเซลล์ทดลองทั้งหมดของเบรกดาวน์ที่ถูกแยกตามความถี่ต่ำ f_L และรัศมีเซลล์. รูปที่ 23(ก) แสดงว่าอัตราการเกิดเบรกดาวน์ทุกความถี่ต่ำ f_L มีค่าใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วง 77.8–84.6%. รูปที่ 23(ข) แสดงว่าเซลล์ที่มีรัศมีในช่วง 25–30 μm มีอัตราการเกิดเบรกดาวน์สูงที่สุดที่ 87.5%.



รูปที่ 23 อัตราการเกิดเบรกดาวน์เมื่อสารละลายมีสภาพนำของ = 45–55 mS/m
แยกตาม (ก) ความถี่ต่ำ f_L (ข) ขนาดเซลล์.

ผลการทดลองรวมทุกค่าสภาพนำ

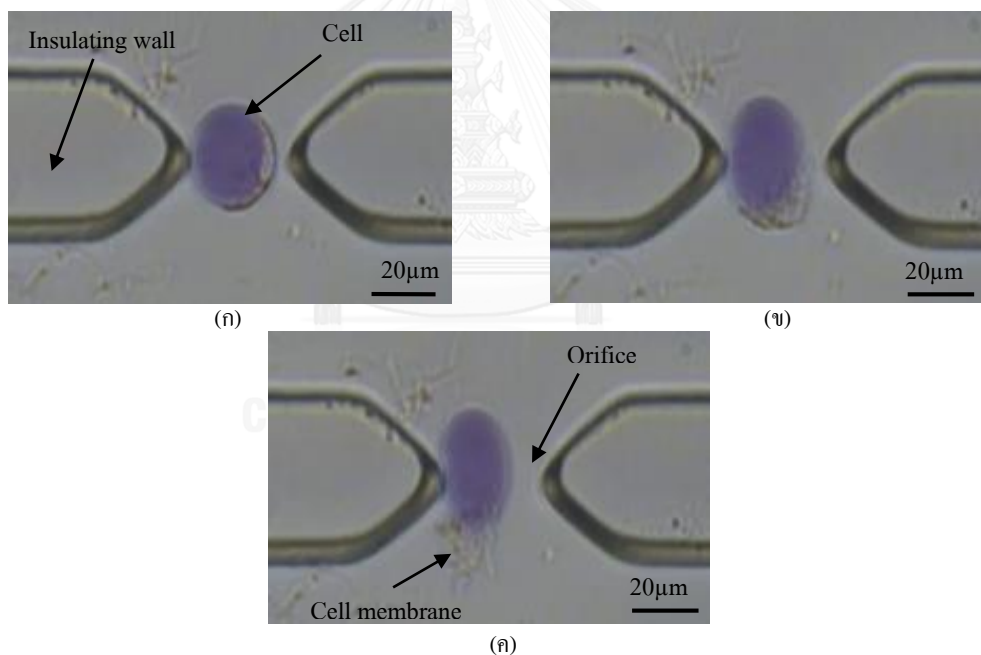
รูปที่ 24 แสดงผลการทดลองรวมจากเซลล์ทั้งหมดที่ใช้ทดลองจำนวน 154 เซลล์ โดยไม่แบ่งตามสภาพนำของสารละลายซึ่งตัวเลขที่อยู่ด้านบนอัตราการเกิดเบรกดาวน์แสดงถึงจำนวนเซลล์ทดลองทั้งหมดของเบรกดาวน์ที่ถูกแยกตามความถี่ต่ำ f_L และรัศมีเซลล์. (ก) แสดงว่าทุกความถี่ต่ำ f_L ที่ป้อนมีอัตราการเกิดเบรกดาวน์ใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วง 76.9–81.8%. (ข) แสดงว่าช่วงขนาดของเซลล์ที่ใช้มีอัตราการเกิดเบรกดาวน์ไม่ต่างกันมากโดยมีค่าอยู่ในช่วง 77.1–86.4%.



รูปที่ 24 อัตราการเกิดเบรกดาวน์ที่ทุกสภาพนำของของสารละลาย
แยกตาม (ก) ความถี่ต่ำ f_L (ข) ขนาดเซลล์.

4.2 การเบรกดาวนของโพโรพลาสต์จากดอกอัญชัน

ผู้วิจัยทดลองกับโพโรพลาสต์ที่สกัดจากกลีบดอกอัญชัน (*Clitoria ternatea* L.) โดยป้อนแรงดันขนาด 10 V_p, ความถี่สูง $f_H = 5$ MHz, ความถี่ต่ำ $f_L = 10, 20, 33, 100$ และ 200 kHz โดย $t_L = 1, 10$ และ 100 ms. สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายที่ใช้ทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 45–55 S/m. ผลการทดลองกับเซลล์พบว่า เงื่อนไขการทดลองข้างต้นสามารถกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเบรกดาวนได้. ลักษณะของการเบรกดาวนในการทดลองแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะคือ เบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ และ เบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวคิวโอล (Tonoplast). รูปที่ 25 แสดงการเกิดเบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ (ก) เซลล์ถูกยึดกับช่องเปิด (Orifice) (ข) เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความถี่ต่ำจนเยื่อหุ้มเซลล์เบรกดาวน (ค) สภาพเซลล์ภายหลังเบรกดาวน. ภายหลังจากเกิดเบรกดาวนจะพบเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกมาอย่างชัดเจน.

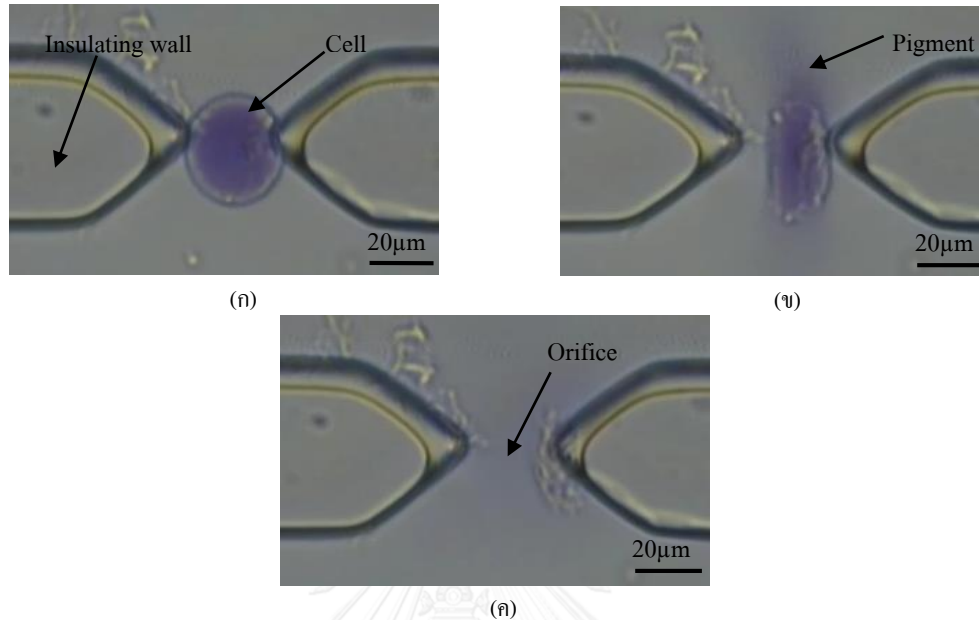


รูปที่ 25 เบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์

(ก) เซลล์ยึดกับช่องเปิด (orifice) (ข) เซลล์ขณะกำลังเกิดเบรกดาวน (ค) ภายหลังจากเกิดการเบรกดาวน.

รูปที่ 26 แสดงการเกิดเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแวคิวโอล (ก) เซลล์ยึดติดกับช่องเปิด (Orifice) ด้วยความถี่สูง f_H (ข) เซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดเบรกดาวนที่เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อ

หุ้มแควิวโวลซึ่งสามารถสังเกตเห็นสารสี (Pigment) หลุดออกมาจากแควิวโวล (ค) สภาพเซลล์หลังเกิดเบรกดาวน.

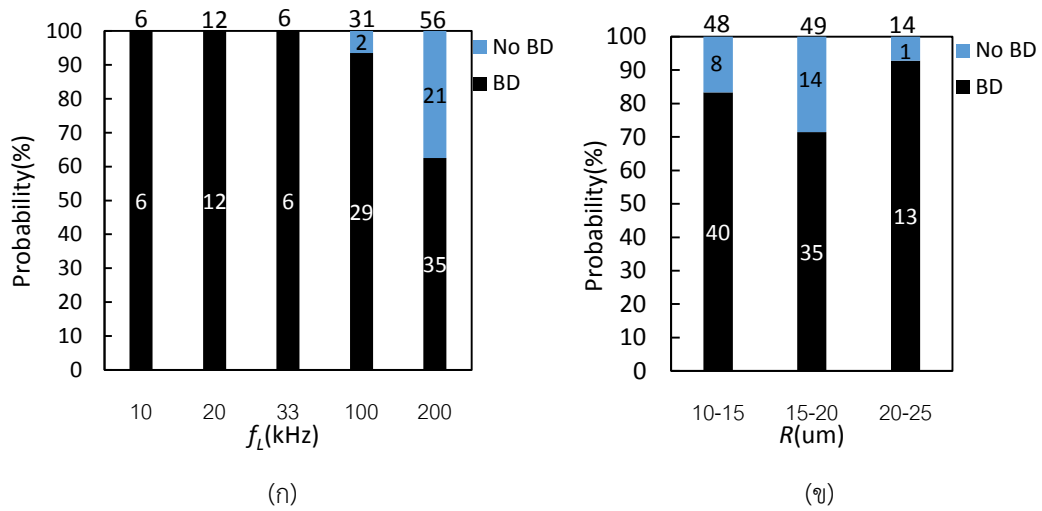


รูปที่ 26 เบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโวล

(ก) เซลล์ยึดกับช่องเปิด (orifice) (ข) เซลล์ขณะเกิดเบรกดาวน (ค) ภายหลังเกิดการเบรกดาวน.

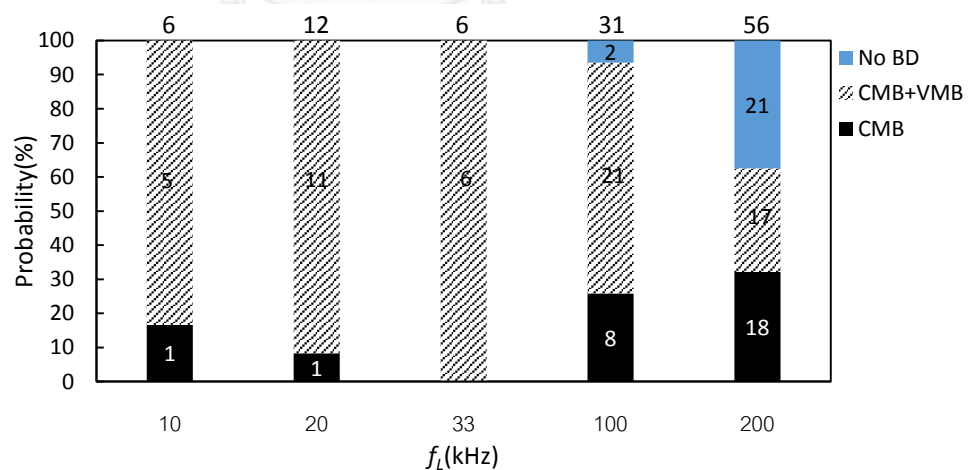
ผลการทดลองที่ $f_L = 10-200$ kHz

รูปที่ 27 แสดงผลของอัตราการเกิดเบรกดาวนเมื่อป้อนแรงดันขนาด $10 V_p$, ความถี่ต่ำ $f_L = 10, 20, 33, 100$ และ 200 kHz ที่ $t_L = 10$ ms โดยตัวเลขที่อยู่ด้านบนอัตราการเกิดเบรกดาวนแสดงถึงจำนวนเซลล์ทดลองทั้งหมดของเบรกดาวนที่ถูกแยกตามความถี่ต่ำ f_L และรัศมีเซลล์. จากจำนวนเซลล์ทั้งหมด 111 เซลล์ รูปที่ 27(ก) แสดงว่าอัตราการเกิดเบรกดาวนที่ $f_L = 200$ kHz มีค่าน้อยที่สุด ขณะที่ $f_L = 10-33$ kHz มีอัตราการเกิดเบรกดาวน 100%. รูปที่ 27(ข) แสดงว่าเซลล์ที่มีรัศมีอยู่ในช่วง $15-20$ µm มีอัตราการเกิดเบรกดาวนน้อยที่สุดที่ 71.4%. ผู้วิจัยทดลองโดยใช้แรงดัน $10 V_p$, ความถี่ต่ำ $f_L = 10, 20, 33, 100$ และ 200 kHz โดยมี $t_L = 10$ ms.



รูปที่ 27 อัตราการเกิดเบรกดาวนเมื่อสารละลายมีสภาพนำ 45-55 mS/m
แยกตาม (ก) ความถี่ต่ำ f_L (ข) ขนาดเซลล์.

รูปที่ 28 แบ่งการเกิดเบรกดาวนตามลักษณะการเกิดเบรกดาวน. เบรกดาวนที่เกิดขึ้นส่วนมากเป็นเบรกดาวนของทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโอล. จากรูปแสดงว่าความถี่ต่ำ $f_L = 200$ kHz มีอัตราการเกิดเบรกดาวนของทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโอลน้อยที่สุดที่ 30.4% เมื่อเทียบกับ f_L ค่าอื่น.



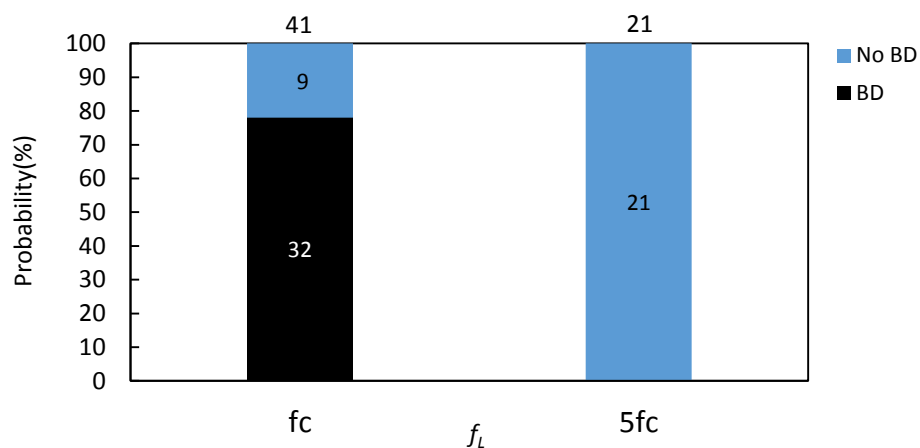
รูปที่ 28 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตามความถี่ต่ำ f_L และลักษณะการเกิดเบรกดาวน

นอกจากนี้แล้ว ผู้วิจัยได้ทดลองป้อน $f_L = f_C$ โดยที่ f_C คือความถี่วิกฤติที่คำนวณจาก $\omega\tau = 1$ ในสมการที่ (2) โดยที่ใช้

$$2\pi f_C \tau = 1 \quad (4)$$

เมื่อ τ คือ ค่าคงตัวเวลาการอัดประจุเซลล์. จากสมการที่ (4) ค่า f_C ขึ้นอยู่กับค่าคงตัวเวลาการอัดประจุเซลล์ ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดเซลล์และสภาพนำของสารละลายภายนอกเซลล์. เมื่อเปรียบเทียบกับสมการ (3) จะพบว่า f_C จะลดลงเมื่อเซลล์มีขนาดใหญ่หรือสารละลายมีสภาพนำสูงขึ้น.

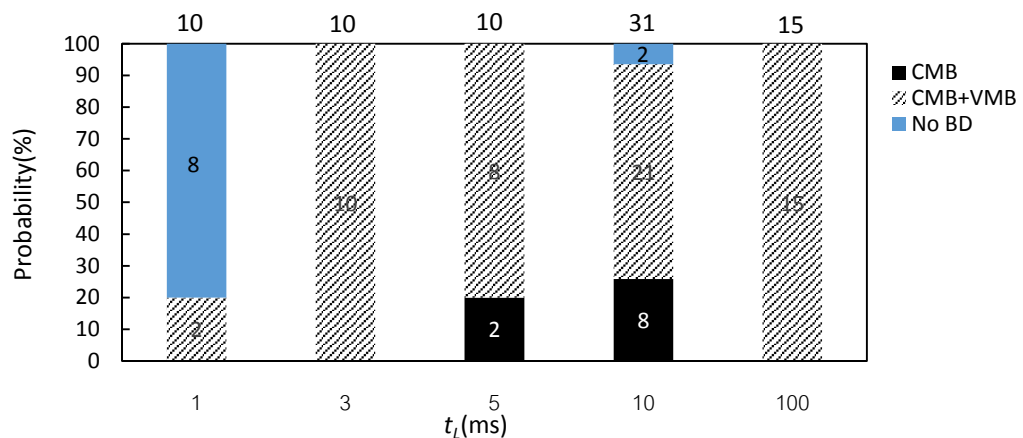
ผู้วิจัยทดลองโดยป้อนแรงดัน 10 V_p, ความถี่ต่ำ $f_L = f_C$ และ $5f_C$ ที่ $t_L = 10$ ms. รูปที่ 29 แสดงผลการทดลองจากเซลล์ตัวอย่างทั้งหมด 62 เซลล์ว่าที่ $f_L = f_C$ มีอัตราเบรกดาวน 78% ในขณะที่ $f_L = 5f_C$ ไม่เกิดเบรกดาวน. ผลการทดลองนี้ผู้วิจัยคิดรวมเบรกดาวนทั้ง 2 ลักษณะ และตัวเลขที่แสดงที่ด้านบนแผนภูมิแท่งคือจำนวนเซลล์ทดลอง.



รูปที่ 29 อัตราการเกิดเบรกดาวนเปรียบเทียบระหว่างความถี่ต่ำ $f_L = f_C$ และ $5f_C$.

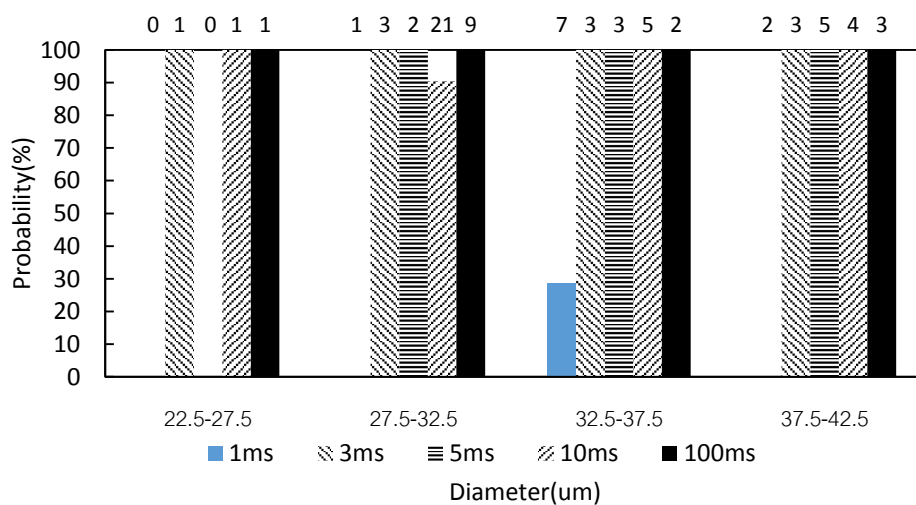
ผลการทดลองที่เวลาคงอยู่ของแรงดันแตกต่างกัน

ผู้วิจัยทดลองโดยป้อนแรงดัน 10 V_p, ความถี่ต่ำ $f_L = 100$ kHz และ $t_L = 1, 3, 5, 10$ และ 100 ms ตามลำดับ. รูปที่ 30 แสดงอัตราการเกิดเบรกดาวนโดยแยกตามเวลาคงอยู่ของแรงดันและลักษณะการเกิดเบรกดาวนที่ $f_L = 100$ kHz. ที่ $t_L = 3, 5$ และ 100 ms เกิดเบรกดาวนของทั้ง 2 ลักษณะ 100% ขณะที่ $t_L = 1$ ms มีอัตราการเกิดเบรกดาวนเพียง 20 %.



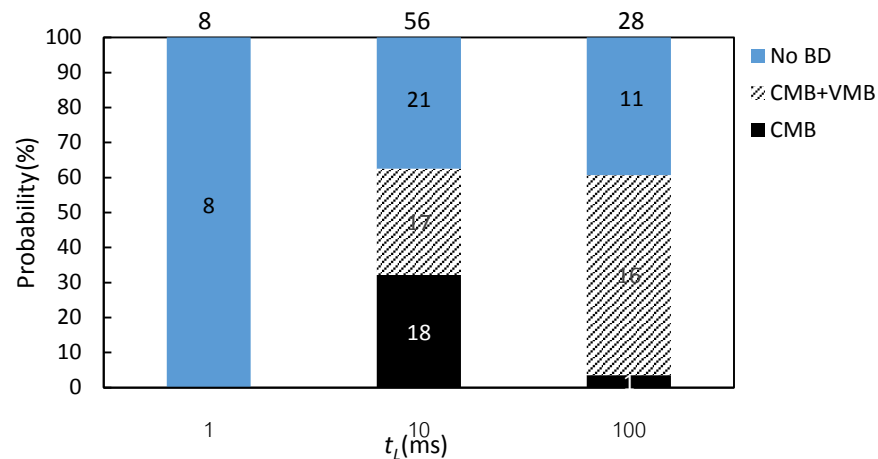
รูปที่ 30 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และลักษณะการเกิดเบรกดาวนที่ $f_L = 100$ kHz.

รูปที่ 31 แสดงผลการเกิดเบรกดาวนรวมทั้งเบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์และเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโวลที่ความถี่ต่ำ $f_L = 100$ kHz แบ่งตาม t_L และขนาดเซลล์ โดยที่ตัวเลขด้านบนบนแผนภูมิแท่งคือจำนวนเซลล์ทดลอง. ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าหากมีการป้อน f_L ให้กับเซลล์ $t_L = 1$ ms มีอัตราการเกิดเบรกดาวนน้อยที่สุด.



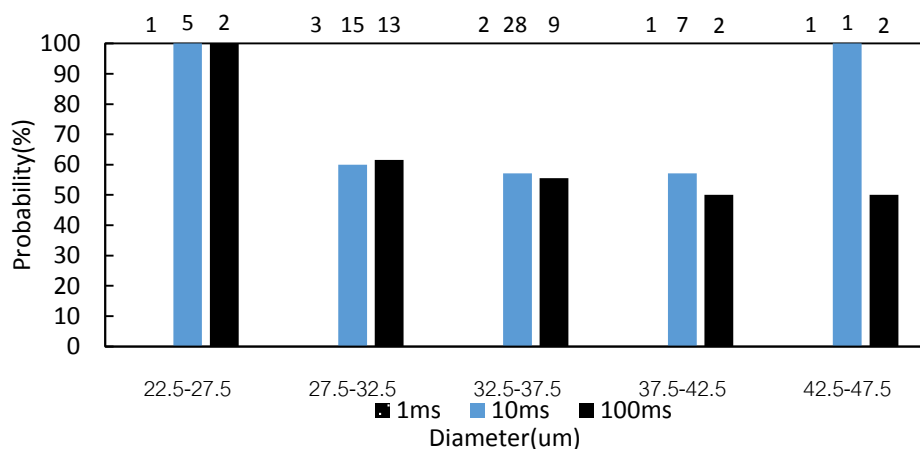
รูปที่ 31 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และขนาดเซลล์ ($f_L = 100$ kHz).

ผู้วิจัยทดลองโดยป้อนแรงดัน $10 V_p$, ความถี่ต่ำ $f_L = 200$ kHz และ $t_L = 1, 10$ และ 100 ms ตามลำดับ. รูปที่ 32 แสดงอัตราการเกิดเบรกดาวนที่ $f_L = 200$ kHz โดยแบ่งตามเวลาคงอยู่ของแรงดัน. จากรูปพบว่า $t_L = 10$ และ 100 ms มีอัตราการเกิดเบรกดาวนในทุกกรณีใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วง 60.7–62.5% แต่ t_L ที่ 100 ms เกิดเบรกดาวนของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโอลมากกว่า $t_L = 10$ ms ในอัตรา 57.1% ต่อ 30.4%. ในขณะที่ $t_L = 1$ ms ไม่พบเบรกดาวน.



รูปที่ 32 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และลักษณะการเกิดเบรกดาวนที่ $f_L = 200$ kHz.

รูปที่ 33 แสดงผลการเกิดเบรกดาวนรวมทั้งเบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์และเบรกดาวนของทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโอลที่ความถี่ต่ำ $f_L = 200$ kHz แบ่งตาม t_L และขนาดเซลล์ โดยที่ตัวเลขด้านบนบนแผนภูมิแท่งคือจำนวนเซลล์ทดลอง. ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า t_L ที่ 10 และ 100 ms จะมีอัตราการเกิดเบรกดาวนในแต่ละช่วงขนาดเซลล์ใกล้เคียงกัน ยกเว้นอัตราการเกิดเบรกดาวนที่เซลล์ขนาด $42.5\text{--}47.5$ μm ขณะที่ $t_L = 1$ ms ไม่เกิดเบรกดาวน.



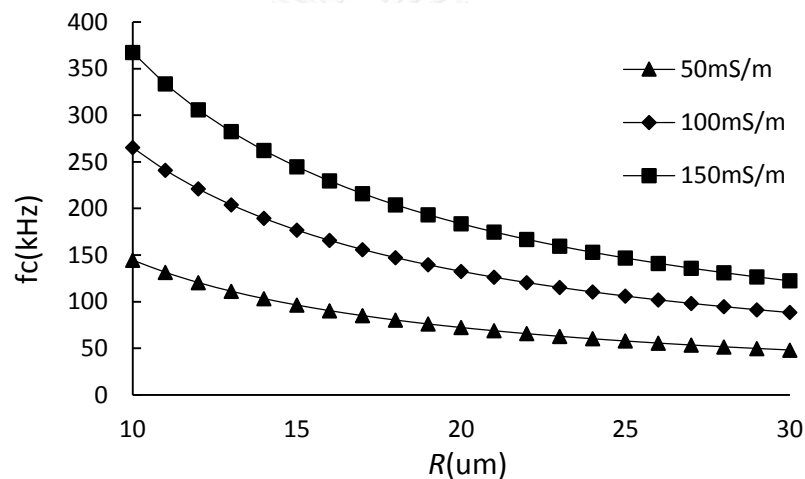
รูปที่ 33 อัตราการเกิดเบรกดาวนแบ่งตาม t_L และขนาดเซลล์ ($f_L = 200$ kHz)

บทที่ 5

วิเคราะห์ผลการทดลอง

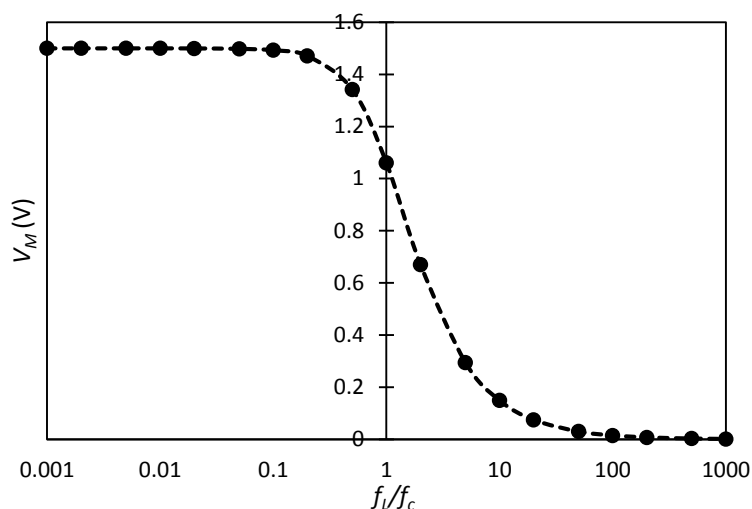
5.1 ความถี่วิกฤต

จากสมการที่ (2) ในหัวข้อที่ 2.2 กำหนดให้ f_c คือความถี่วิกฤตที่ทำให้ $2\pi f_c \tau = 1$. รูปที่ 34 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง f_c และรัศมีเซลล์เมื่อสภาพนำของสารละลายมีค่า 50, 100 และ 150 mS/m. ที่สภาพนำของสารละลายสูงกว่าจะมี f_c สูงกว่าหากเซลล์มีรัศมีเท่ากัน. นอกจากนี้ ที่สภาพนำเท่ากัน เซลล์ที่มีรัศมีเพิ่มขึ้นจะมี f_c ลดลง. การป้อนความถี่ต่ำ $f_L \leq f_c$ จะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีโอกาสเกิดเบรกดาวนได้มากกว่าการป้อน $f_L > f_c$.



รูปที่ 34 ความสัมพันธ์ระหว่าง f_c และรัศมีของเซลล์.

รูปที่ 35 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแรงดันตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ V_M และอัตราส่วน f_L/f_c . ผู้วิจัยคำนวณโดยใช้สมการที่ (2) โดยคิดที่เซลล์รัศมี 10 μm สภาพนำของสารละลายเป็น 50 mS/m และความเข้มสนามไฟฟ้าเป็น 100 kV/m. จากรูปสามารถแบ่งได้ 3 ช่วงตามความชันของกราฟความสัมพันธ์. ช่วงแรกเมื่อ $f_L < 0.1f_c$ การเปลี่ยนแปลงของ V_M มีค่าน้อยมาก โดยค่า V_M จะมีค่าใกล้เคียงค่าสูงสุดและขึ้นอยู่กับรัศมีมากกว่าความถี่. ช่วงที่สองเมื่อ f_L อยู่ในช่วง $0.1f_c - 10f_c$ ค่า V_M จะเปลี่ยนแปลงตาม f_L และรัศมีเซลล์. ในช่วงนี้เมื่อ $f_L > f_c$ ค่า V_M จะน้อยกว่า 1 V ซึ่งไม่ทำให้เกิดเบรกดาวน. ขณะที่ $f_L > 10f_c$ จะไม่มีผลต่อการเกิดเบรกดาวนเลยเนื่องจาก V_M มีค่าน้อยมาก.



รูปที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่าง V_M และ f_L/f_c .

5.2 การเบรกดาวนซ์ของโพโรโทพลาสติกจากลำต้นไคววาระ

รูปที่ 21 แสดงผลการเบรกดาวนซ์ของโพโรโทพลาสติกที่สภาพนำของสารละลายอยู่ในช่วง 150 mS/m โดยขนาดของเซลล์ที่ใช้อยู่ในช่วง 10–20 μm . ความถี่วิกฤต f_c อยู่ในช่วง 185–370 kHz (รูปที่ 34). จากเงื่อนไขทดลองซึ่ง $f_L < f_c$ อัตราการเกิดเบรกดาวนซ์ที่ได้น่าจะมีค่าที่สูง. ผลการทดลองที่ได้มีอัตราการเกิดเบรกดาวนซ์ 85.7% จากทั้งหมด 21 เซลล์. เมื่อแยกผลการทดลองตามความถี่ต่ำ f_L ดังรูปที่ 21(ก) พบว่าที่ $f_L = 10$ kHz มีอัตราการเบรกดาวนซ์น้อยที่สุดที่ 71.4% ซึ่งไม่สอดคล้องกับทฤษฎี. ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุน่าจะมาจากแรงดัน V_M บางเซลล์ในกรณี $f_L = 10$ kHz มีค่าไม่เพียงพอ ถึงแม้ว่า $f_L < 0.1f_c$. เมื่อแยกผลการทดลองตามรัศมีเซลล์พบว่าเซลล์ขนาดใหญ่มีอัตราการเบรกดาวนซ์สูงกว่าเซลล์ขนาดเล็กซึ่งเป็นไปตามเงื่อนไข ในช่วงความถี่ที่ทดลองนี้ที่ V_M ขึ้นอยู่กับรัศมีเซลล์มากกว่า f_L .

รูปที่ 22 แสดงผลการเบรกดาวนซ์ของโพโรโทพลาสติกที่สภาพนำของสารละลายอยู่ในช่วง 100 mS/m โดยเซลล์มีรัศมีอยู่ในช่วง 10–20 μm . ความถี่วิกฤต f_c อยู่ในช่วง 132–265 kHz (รูปที่ 34). จากเงื่อนไขทดลองพบว่า f_L ที่ป้อนอยู่ในช่วง $0.1f_c < f_L < f_c$. ผลการทดลองที่ได้มีอัตราการเกิดเบรกดาวนซ์ทั้งหมด 71.4% จากทั้งหมด 21 เซลล์. เมื่อแยกผลการทดลองตามความถี่ต่ำ f_L พบว่าที่ $f_L = 50$ kHz มีอัตราการเกิดเบรกดาวนซ์น้อยที่สุดที่ 57.1%. ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุที่เป็นเช่นนี้น่าจะมาจากแรงดัน V_M ของเซลล์นั้นๆไม่เพียงพอ. เมื่อแยกผลการทดลองตามรัศมีเซลล์พบว่าขนาดใหญ่มีอัตราการเบรกดาวนซ์สูงกว่าเซลล์ขนาดเล็ก แต่จากผลการทดลองดังรูปที่ 22(ข) พบว่าจำนวนเซลล์

ทดลองในแต่ละช่วงขนาดเซลล์มีค่าต่างกันมาก ผู้วิจัยจึงคิดว่าผลการทดลองตามเงื่อนไขนี้ไม่สามารถสรุปได้ว่าขนาดเซลล์มีผลต่อการเกิดเบรกดาวน.

รูปที่ 23 แสดงผลการเบรกดาวนที่สภาพนำของสารละลาย 50 mS/m โดยเซลล์มีรัศมีอยู่ในช่วง 10–30 μm . ความถี่วิกฤต f_c อยู่ในช่วง 48–144 kHz (รูปที่ 34). ความถี่ต่ำ f_L ตามเงื่อนไขจะมี 2 กรณีคือ 1) $0.1f_c < f_L < f_c$ (สำหรับ $f_L = 10, 33$ และ 50 kHz) และ 2) $f_c < f_L < 10f_c$ ($f_L = 200$ kHz และ $f_L = 100$ kHz บางเซลล์). ผลการทดลองมีอัตราการเกิดเบรกดาวนทั้งหมด 81.5% จาก 112 เซลล์. เมื่อแยกผลการทดลองตามความถี่ต่ำ f_L พบว่ากรณีแรก ($0.1f_c < f_L < f_c$) และกรณีที่สอง ($f_c < f_L < 10f_c$) มีอัตราการเกิดเบรกดาวนที่สูงและมีค่าใกล้เคียงกันที่ 81.7% กับ 80.8%. ผลการทดลองในกรณี 1) พบว่าสอดคล้องกับทฤษฎีเนื่องจากการป้อน f_L ที่น้อยกว่าความถี่วิกฤตขณะที่กรณี 2) พบว่าขัดแย้งกับทฤษฎีเนื่องจากการป้อน f_L ที่มากกว่าความถี่วิกฤตแต่มีอัตราการเกิดเบรกดาวนมีค่าสูงใกล้เคียงกับกรณี 1). ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุน่าจะมาจากการทดลองโดยใช้สนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุม. ผลของสนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมจะทำให้มีกระแสไฟฟ้าซาร์จที่เยื่อหุ้มเซลล์อย่างรวดเร็ว ทำให้แรงดันตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ V_M จะมีค่าเกินกว่าค่าวิกฤตมาก. เมื่อ V_M มีค่ามากแล้ว คาบเวลาของแรงดันที่ป้อนถึงแม้จะมีค่าน้อยกว่าค่าคงตัวเวลาการอัดประจุเซลล์ก็ยังสามารถทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดเบรกดาวนได้. เมื่อแยกผลการทดลองตามรัศมีเซลล์ พบว่าช่วงขนาดเซลล์ไม่มีผลต่ออัตราการเกิดเบรกดาวนซึ่งเป็นไปตามเงื่อนไขการป้อนในช่วง $0.1f_c < f_L < 10f_c$. การเกิดเบรกดาวนในช่วงนี้จะขึ้นอยู่กับทั้งรัศมีเซลล์และ f_L ดังนั้นรัศมีเซลล์เพียงอย่างเดียวจึงไม่น่าจะมีผลต่อการเบรกดาวน.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

5.3 การเบรกดาวนของโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน

รูปที่ 27 แสดงผลการเบรกดาวนของโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชันโดยมีสภาพนำของสารละลาย 50 mS/m. เซลล์ที่ใช้มีรัศมีอยู่ในช่วง 10–25 μm ซึ่งมีความถี่วิกฤต f_c อยู่ในช่วง 57–144 kHz ดังรูปที่ 34. ความถี่ต่ำ f_L ตามเงื่อนไขจะมี 2 กรณีคือ 1) $0.1f_c < f_L < f_c$ (สำหรับ $f_L = 10, 20$ และ 33 kHz) และ 2) $f_c < f_L < 10f_c$ ($f_L = 200$ kHz และ $f_L = 100$ kHz บางเซลล์). ผลการทดลองให้อัตราการเกิดเบรกดาวนทั้งหมด 79.3% จาก 111 เซลล์. เมื่อแยกผลการทดลองตามความถี่ต่ำ f_L พบว่ากรณี 1) ให้อัตราการเบรกดาวน 100%. กรณี 2) พบว่ามีอัตราการเกิดเบรกดาวนรวม 73.6% ซึ่งน้อยกว่ากรณีแรก และความถี่ 200 kHz ที่มากกว่าค่าความถี่วิกฤต f_c มีอัตราการเกิดเบรกดาวน 62.5% ซึ่งน้อยกว่าความถี่ต่ำ f_L ค่าอื่น. ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการป้อน $f_L < f_c$ ทำให้เซลล์มีอัตราการเกิดเบรกดาวนสูงกว่าการป้อน $f_L > f_c$. เมื่อแยกผลการทดลองตามรัศมี

เซลล์พบว่าไม่สามารถระบุผลต่ออัตราการเกิดเบรกดาวน์เนื่องจากขนาดเซลล์ได้อย่างชัดเจน. ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุน่าจะมาจากการป้อน f_L เงื่อนไขอยู่ในช่วง $0.1fc < f_L < 10fc$. การเกิดเบรกดาวน์ในช่วงนี้จะขึ้นอยู่กับทั้งรัศมีเซลล์และ f_L ดังนั้น รัศมีเซลล์เพียงอย่างเดียวจึงไม่น่าจะมีผลต่อการเบรกดาวน์.

5.4 ผลของความถี่ไฟฟ้า

ผลการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการป้อนความถี่ต่ำ f_L ด้วย fc กับ $5fc$ ในหัวข้อ 4.2 (อ้างอิงตามรูปที่ 29) แสดงให้เห็นว่าการป้อนแรงดันด้วยความถี่ fc ให้แก่เซลล์ทดลองจะมีอัตราการเกิดเบรกดาวน์สูงขณะที่การป้อนความถี่ $5fc$ ไม่ทำให้เกิดเบรกดาวน์. ผลการทดลองตามเงื่อนไขนี้สอดคล้องกับผลคำนวณดังรูปที่ 34. กรณีที่ป้อน $f_L \leq fc$ ให้แก่เซลล์จะให้อัตราการเกิดเบรกดาวน์สูงเนื่องจากคาบเวลาของคลื่นที่มากกว่าค่าคงตัวการอัดประจุของเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีโอกาสถูกชาร์จประจุจนเต็มและเกิดเบรกดาวน์.

5.5 ผลของเวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำ

ผลการเปรียบเทียบโดยเงื่อนไขเวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำ $f_L = 100$ kHz (อ้างอิงตามรูปที่ 30) พบว่า $t_L = 3, 5, 10$ และ 100 ms ให้อัตราการเกิดเบรกดาวน์ใกล้เคียงกันในช่วง 93.5–100% โดยที่ $t_L = 1$ ms มีอัตราการเกิดเบรกดาวน์ต่ำสุดที่ 20%. สาเหตุที่เวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำมีผลต่ออัตราการเกิดเบรกดาวน์ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะการเพิ่ม t_L จะเป็นการเพิ่มโอกาสเบรกดาวน์ถาวรของเยื่อหุ้มเซลล์. เงื่อนไขในการเกิดเบรกดาวน์จะขึ้นอยู่กับกรชาร์จประจุเยื่อหุ้มเซลล์ให้ V_M มากกว่าค่าวิกฤตด้วยเวลาที่มากกว่าค่าคงตัวเวลาการอัดประจุเซลล์. การชาร์จประจุเยื่อหุ้มเซลล์ในบางครั้งเยื่อหุ้มเซลล์อาจเกิดเบรกดาวน์แต่ไม่สามารถสังเกตได้อย่างชัดเจน ดังนั้นการเพิ่มเวลาคงอยู่ t_L ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายเพิ่มขึ้นจนเกิดเบรกดาวน์ที่สังเกตได้ชัดเจนและยังมีโอกาสทำให้เยื่อหุ้มแควิวโอลที่อยู่ด้านในเสียหายเพิ่มขึ้น. มีค่าการเพิ่มขึ้นของเวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำอาจไม่มีผลต่อการเบรกดาวน์ของเซลล์เลยหากความถี่ต่ำ f_L ที่ป้อนมีค่าสูงกว่าค่าความถี่วิกฤต fc มากๆ. ผลการทดลองเมื่อแยกตามรัศมีเซลล์ดังรูปที่ 31 พบว่าทุกขนาดเซลล์มีอัตราการเกิดเบรกดาวน์ที่สูงและไม่ต่างกันมากนักเนื่องจากความถี่ต่ำ f_L ส่วนใหญ่ต่ำกว่า fc ยกเว้นเซลล์ที่ถูกป้อนด้วย $t_L = 1$ ms.

ผลการเปรียบเทียบโดยเงื่อนไขเวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำ $f_L = 200$ kHz (อ้างอิงตามรูปที่ 32) พบว่า $t_L = 1$ ms ไม่ทำให้เกิดเบรกดาวน์. สาเหตุน่าจะมาจากเวลาคงอยู่ t_L น้อยเกินไปทำให้เยื่อ

หุ้มเซลล์ไม่เสียสภาพจนสังเกตได้. ขณะที่ $t_L = 10$ และ 100 ms มีอัตราการเกิดเบรกดาวนของทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโวลทั้ง 2 แบบใกล้เคียงกัน. เมื่อแยกตามลักษณะการเกิดเบรกดาวนและ t_L พบว่า $t_L = 100$ ms มีอัตราการเกิดเบรกดาวนของเยื่อหุ้มแควิวโวลสูงกว่า $t_L = 10$ ms. สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่ม t_L ทำให้เซลล์มีโอกาสเสียหายเพิ่มขึ้นจากการเบรกดาวน. เมื่อแยกผลการทดลองที่ได้ตามรัศมีเซลล์ดังรูปที่ 33 พบว่าในช่วงเซลล์ขนาดเดียวกัน $t_L = 10$ ms จะมีอัตราการเกิดเบรกดาวนของทั้งเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มแควิวโวลใกล้เคียงกับ $t_L = 100$ ms แต่จะมีอัตราการเกิดเบรกดาวนของเยื่อหุ้มแควิวโวลน้อยกว่า. ผู้วิจัยคาดว่าสาเหตุการเกิดเบรกดาวนขึ้นอยู่กับความถี่ต่ำ f_L เป็นหลัก หากความถี่ต่ำ f_L ไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดเบรกดาวน การเพิ่ม t_L จะไม่ทำให้เกิดเบรกดาวน.

ผลการทดลองในหัวข้อ 4.2 ที่มีการแบ่งลักษณะการเกิดเบรกดาวนออกเป็นสองกรณี. ในกรณีการแบ่งการเกิดเบรกดาวนออกเป็นตามลักษณะเบรกดาวนที่พบ. ผลการทดลองดังรูปที่ 28 พบว่าการใช้ความถี่ต่ำ $f_L = 200$ kHz มีอัตราการเกิดเบรกดาวนน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ f_L ค่าอื่น. เมื่อคิดเฉพาะเบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์กลับพบว่ามีอัตราการเกิดเบรกดาวนในลักษณะนี้สูงที่สุด. สาเหตุการเกิดเบรกดาวนลักษณะนี้อาจมาจากการป้อน f_L ด้วยค่าที่มากกว่า f_C เล็กน้อยทำให้มีการชาร์จประจุและเกิดเบรกดาวนเฉพาะที่ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์. เมื่อพิจารณาความถี่ต่ำ $f_L = 10, 20$ และ 33 kHz ซึ่งมีค่าน้อยกว่า f_C มาก พบว่าอัตราการเกิดเบรกดาวนเฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์ต่ำซึ่งคาดว่ามาจากค่าที่ป้อนน้อยกว่า f_C มาก. ผลของ f_L ที่ต่ำกว่า f_C มากทำให้เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ถูกชาร์จประจุอย่างรวดเร็วจนเกิดเบรกดาวนแล้วยังสามารถชาร์จเข้าไปถึงเยื่อหุ้มแควิวโวลที่อยู่ภายในเซลล์ได้. นอกจากนี้ผลการทดลองจากรูปที่ 30 และ 32 จากเงื่อนไขผลของเวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำ f_L ยังแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้น t_L ทำให้เซลล์มีอัตราการเกิดเบรกดาวนเพิ่มมากขึ้นหากความถี่ต่ำ f_L มีค่าเพียงพอ.

บทที่ 6

สรุป

จากผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้กล่าวมา ผู้วิจัยได้ทดลองศึกษาการเบรกดาวน์ของเยื่อหุ้มเซลล์พืชโดยใช้โพรโทพลาสต์ที่สกัดจากลำต้นของไควาเรและดอกอัญชัน. ภายใต้เงื่อนไขตัวแปรที่ใช้ทดลองและความเข้มข้นสูงสุดของสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ที่ใช้มีค่าเพียงพอที่จะทำให้แรงดันตกคร่อมเยื่อหุ้มเซลล์ V_M มีค่าสูงกว่าค่าวิกฤติ ผู้วิจัยสามารถสรุปผลการทดลองที่ได้จากการทดลองเงื่อนไขต่าง ๆ ดังนี้.

1) การป้อนความถี่ต่ำ $f_L = f_C$ ทำให้เซลล์จะมีอัตราการเกิดเบรกดาวน์ 78% ซึ่งสูงกว่าการป้อน $f_L = 5f_C$ ที่ไม่ทำให้เกิดเบรกดาวน์. หาก f_L มีค่าต่ำกว่าค่าวิกฤตมาก (10–33 kHz) เซลล์จะมีโอกาสเบรกดาวน์เข้าไปถึงภายใน เช่น เยื่อหุ้มแควคิวโอล ถึง 91.7% สำหรับโพรโทพลาสต์ที่สกัดจากกลีบดอกอัญชัน.

2) สนามไฟฟ้าที่ถูกควบคุมช่วยให้เซลล์มีโอกาสเบรกดาวน์ถึงแม้จะป้อน $f_L > f_C$ โดยมีอัตราการเกิดเบรกดาวน์ที่ $f_L = 200$ kHz เป็น 84.6% สำหรับโพรโทพลาสต์จากต้นไควาเร และ 62.5% สำหรับโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน.

3) เวลาคงอยู่ t_L ของความถี่ต่ำที่ 1 ms มีอัตราการเกิดเบรกดาวน์น้อยที่สุดคือ 20% สำหรับ $f_L = 100$ kHz และ 0% สำหรับ $f_L = 200$ kHz.

4) อัตราการเกิดเบรกดาวน์เฉพาะเยื่อหุ้มเซลล์สูงที่สุดที่ $t_L = 10$ ms โดยมีค่า 25.8% สำหรับ $f_L = 100$ kHz และมีค่า 31.1% สำหรับ $f_L = 200$ kHz.

รายการอ้างอิง

- [1] E. Puertolas, E. Luengo, I. Alvarez, and J. Raso, "Improving Mass Transfer to Soften Tissues by Pulsed Electric Fields: Fundamentals and Applications," *Annual Review of Food Science and Technology, Vol 3*, vol. 3, pp. 263-282, 2012.
- [2] N. Grimi, F. Mamouni, N. Lebovka, E. Vorobiev, and J. Vaxelaire, "Impact of apple processing modes on extracted juice quality: Pressing assisted by pulsed electric fields," *Journal of Food Engineering*, vol. 103, no. 1, pp. 52-61, Mar, 2011.
- [3] T. Gachovska, D. Cassada, J. Subbiah, M. Hanna, H. Thippareddi, and D. Snow, "Enhanced anthocyanin extraction from red cabbage using pulsed electric field processing," *J Food Sci*, vol. 75, no. 6, pp. E323-9, Aug 1, 2010.
- [4] I. Aguilo-Aguayo, M. Montero-Calderon, R. Soliva-Fortuny, and O. Martin-Belloso, "Changes on flavor compounds throughout cold storage of watermelon juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat," *Journal of Food Engineering*, vol. 100, no. 1, pp. 43-49, Sep, 2010.
- [5] K. V. Loginova, M. V. Shynkaryk, N. I. Lebovka, and E. Vorobiev, "Acceleration of soluble matter extraction from chicory with pulsed electric fields," *Journal of Food Engineering*, vol. 96, no. 3, pp. 374-379, Feb, 2010.
- [6] K. V. Loginova, N. I. Lebovka, and E. Vorobiev, "Pulsed electric field assisted aqueous extraction of colorants from red beet," *Journal of Food Engineering*, vol. 106, no. 2, pp. 127-133, Sep, 2011.
- [7] S. Ersus, and D. M. Barrett, "Determination of membrane integrity in onion tissues treated by pulsed electric fields: Use of microscopic images and ion leakage measurements," *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 11, no. 4, pp. 598-603, Oct, 2010.
- [8] S. Asavasanti, W. Ristenpart, P. Stroeve, and D. M. Barrett, "Permeabilization of Plant Tissues by Monopolar Pulsed Electric Fields: Effect of Frequency," *Journal of Food Science*, vol. 76, no. 1, pp. E98-E111, Jan-Feb, 2011.

- [9] E. Puertolas, N. Lopez, G. Saldana, I. Alvarez, and J. Raso, "Evaluation of phenolic extraction during fermentation of red grapes treated by a continuous pulsed electric fields process at pilot-plant scale," *Journal of Food Engineering*, vol. 98, no. 1, pp. 120-125, May, 2010.
- [10] F. Sampedro, A. Rivas, D. Rodrigo, A. Martinez, and M. Rodrigo, "Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk based beverage: Effect of process parameters," *Journal of Food Engineering*, vol. 80, no. 3, pp. 931-938, Jun, 2007.
- [11] B. Techaumnat, and M. Washizu, "Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells," *Journal of Physics D-Applied Physics*, vol. 40, no. 6, pp. 1831-1837, Mar 21, 2007.
- [12] B. Techaumnat, K. Tsuda, O. Kurosawa, G. Murat, H. Oana, and M. Washizu, "High-yield electrofusion of biological cells based on field tailoring by microfabricated structures," *Int Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 4, pp. 93-99, Dec, 2008.
- [13] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walters, *Molecular Biology of The Cell*, USA: Garland Science, 2002.
- [14] http://cellSandtransportation5525740602.blogspot.com/2013/04/blog-post_3217.html, 2013.
- [15] U. Zimmermann, W. M. Arnold, and W. Mehrle, "Biophysics of Electroinjection and Electrofusion," *Elsevier Science Publisher B.V., Journal of Electrostatics*, vol. 21, pp. 309-345, 1988.
- [16] P. Kim, K. W. Kwon, M. C. Park, S. H. Lee, S. M. Kim, and K. Y. Suh, "Soft lithography for microfluidics: a review," *Biochip Journal*, vol. 2, no. 1, pp. 1-11, Mar 20, 2008.
- [17] K. L. Berkowski, K. N. Plunkett, Q. Yu, and J. S. Moore, "Introduction to photolithography: Preparation of microscale polymer silhouettes," *Journal of Chemical Education*, vol. 82, no. 9, pp. 1365-1369, Sep, 2005.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ก) การสกัดโพรโทพลาสต์จากลำต้นไคววาระ

ขั้นตอนการสกัดโพรโทพลาสต์จากลำต้นไคววาระที่ใช้ทดลองในวิทยานิพนธ์นี้แสดงดังขั้นตอนต่อไปนี้.

1) นำต้นไคววาระประมาณ 50 ต้น มาทำความสะอาดด้วยเอทานอล 70% ฉีดเป็นละอองด้วยที่ฉีดสเปรย์.



รูปที่ 36 ต้นไคววาระที่ถูกฉีดด้วยเอทานอล 70%.

2) นำกระดาษซับ(Kimwipes) ซับเอทานอลเบาๆ พอให้แห้ง ดังแสดงในรูปที่ 37.



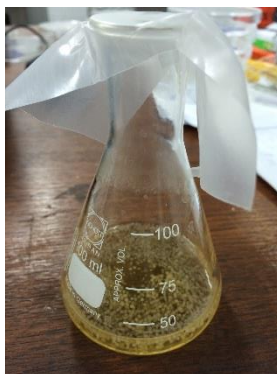
รูปที่ 37 การซับเอทานอลลำต้นไคววาระด้วยกระดาษซับ.

3) ตัดส่วนยอดและรากทิ้ง คงไว้เฉพาะส่วนลำต้นยาวประมาณ 5 cm. นำส่วนลำต้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ(ประมาณ 0.5 mm).



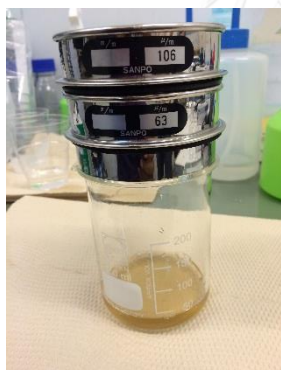
รูปที่ 38 ลำต้นไคววาระที่ถูกหั่นฝอย.

4) นำส่วนของลำต้นไควาเรที่ถูกล้างในขวดรูปชมพู่ และใส่สารละลายบัฟเฟอร์ MES ลงไป ประมาณ 25 ml. หลังจากนั้นนำเข้าไปใส่ฟองอากาศในเครื่องปั๊มสุญญากาศประมาณ 15 นาที. เมื่อเสร็จแล้วปิดฝาแล้วทิ้งไว้ให้ครบ 4 ชั่วโมง.

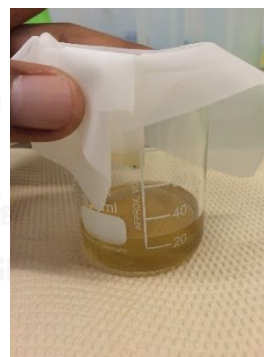


รูปที่ 39 ลำต้นต้นไควาเรในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.

5) นำโพโรโทพลาสติกที่แช่ไว้ครบ 4 ชั่วโมงมากรองด้วยตะแกรงสเตนเลส ขนาด 106, 63 μm และตาข่ายไนลอนขนาด 50 μm ตามลำดับ.



(ก)



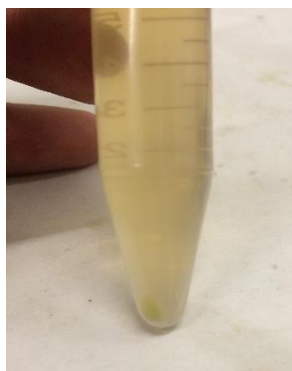
(ข)

รูปที่ 40 การกรองแยกโพโรโทพลาสติกลำต้นไควาเร (ก) ด้วยตะแกรงสเตนเลส (ข) ด้วยตาข่ายไนลอน.

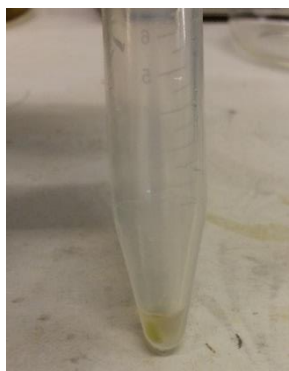
6) แบ่งสารละลายที่ได้จากข้อ 5) ใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml จำนวน 2 หลอดให้ได้ ปริมาตรเท่ากัน.

7) นำหลอดทดลองไปปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (LMC-3000, Biosan) ด้วยอัตราเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 5 นาที.

8) นำหลอดทดลองทั้งสองออกมา. สังเกตที่ก้นหลอดจะพบว่า มีตะกอนของโปรโทพลาสต์ กองอยู่. ดูดสารละลายออกทั้งหมดเหลือไว้เฉพาะโปรโทพลาสต์ที่กึ่งไว้ด้านล่างด้วย pipette.



(ก)



(ข)

รูปที่ 41 โปรโทพลาสต์ไคววาระ (ก) หลังจากปั่นแยกส่วน (ข) หลังจากดูดสารละลายที่ไม่ต้องการ.

9) ใส่ wash solution (สารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.6 M ที่มีค่า pH = 5.7) ลงไปในหลอดทดลองทั้ง 2 ประมาณหลอดละ 5 ml แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 800 rpm เป็นเวลา 5 นาที.

10) นำหลอดทดลองออกมาแล้วดูดสารละลายด้านบนออก เหลือเฉพาะโปรโทพลาสต์ด้านล่าง. เติม wash solution ลงไปในหลอดทดลองทั้งสองอีกเล็กน้อย (ประมาณหลอดละ 0.5 ml) จะได้โปรโทพลาสต์สำหรับนำไปทดลอง.



รูปที่ 42 โปรโทพลาสต์ไคววาระสำหรับนำไปทดลอง.

ข) การสกัดโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชัน

ขั้นตอนการสกัดโพรโทพลาสต์จากดอกอัญชันที่ใช้ทดลองในวิทยานิพนธ์นี้แสดงดังขั้นตอนต่อไปนี้.

- 1) นำดอกอัญชันมาตัดส่วนโคนดอกออกโดยใช้เฉาะส่วนที่เป็นกลีบดังแสดงในรูปที่ 43.



(ก)



(ข)

รูปที่ 43 ดอกอัญชัน (ก) ก่อนตัดก้านดอก (ข) หลังตัดก้านดอก.

- 2) คลี่กลีบดอกอัญชันออกมาทีละกลีบและวางไว้บนกระดาษรองจนได้ปริมาณตามที่ต้องการ (ประมาณ 20 กลีบต่อสารละลายบัฟเฟอร์ MES 25 มิลลิลิตร) ดังแสดงในรูปที่ 44.



รูปที่ 44 กลีบดอกอัญชันที่ถูกคลี่.

- 3) ทำความสะอาดกลีบดอกอัญชันโดยใช้เอทานอล 70% ฉีดเป็นละอองด้วยที่ฉีดสเปรย์. การฉีดทำความสะอาดนั้นควรฉีดให้โดนกลีบดอกทั้งสองด้าน.



รูปที่ 45 กลีบดอกอัญชันที่ถูกฉีดด้วยเอทานอล 70% ทั้งสองด้าน.

4) นำกระดาษซับ(Kimwipes) ซับกลีบดอกอัญชันทั้งสองด้านเบาๆ ทุกกลีบพอให้แห้ง ดังแสดงในรูปที่ 46.

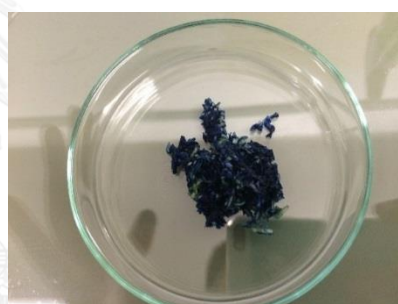


รูปที่ 46 การซับกลีบดอกอัญชันด้วยกระดาษซับ.

5) นำกลีบดอกอัญชันมาหั่นเป็นฝอยขนาดเล็กโดยหั่นเป็นฝอยบางๆด้วยใบมีดโกนตามรูปที่ 47(ก). หลังจากนั้นนำกลีบที่หั่นฝอยที่ได้มาหั่นตามขวางอีกรอบจะได้ลักษณะตามรูปที่ 47(ข).



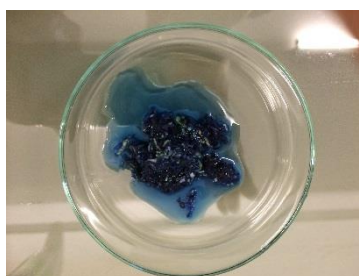
(ก)



(ข)

รูปที่ 47 การหั่นกลีบดอกอัญชัน (ก) หั่นเป็นฝอยในขั้นแรก (ข) หั่นตามขวางอีกรอบ.

6) นำ Wash solution (สารละลาย mannitol ความเข้มข้น 0.4 M และ CaCl_2 ความเข้มข้น 0.0276 % และมีค่า pH = 5.6.) มาเทใส่กลีบดอกอัญชันที่ได้จากขั้นตอนในข้อ 5) โดยใช้กลีบดอกอัญชัน 20 กลีบต่อ Wash solution 5 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อให้เซลล์ปรับสภาพ.



รูปที่ 48 กลีบดอกอัญชันหั่นฝอยแช่ใน wash solution.

7) เมื่อครบ 30 นาที เปลี่ยนภาชนะโดยใช้คีมที่สะอาดคีบเอาเฉพาะส่วนที่เป็นกลีบดอกอัญชัน มาใส่ในภาชนะใหม่. หลังจากนั้นเทสารละลายบัฟเฟอร์ MES ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไปในภาชนะใหม่ที่ใส่กลีบดอกอัญชันไว้ แล้วทิ้งไว้เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในห้องที่บสแสง.



รูปที่ 49 กลีบดอกอัญชันที่แห้งในสารละลายบัฟเฟอร์ MES.

8) นำโพรโทพลาสติกที่แช่ไว้ครบ 4 ชั่วโมงมากรองด้วยตะแกรงสเตนเลส ขนาด 106, 63 μm และตาข่ายไนลอนขนาด 50 μm ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 50.



(ก)



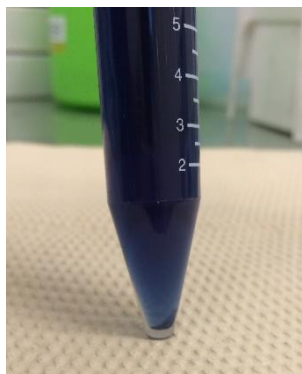
(ข)

รูปที่ 50 การกรองแยกโพรโทพลาสติกดอกอัญชัน (ก) ด้วยตะแกรงสเตนเลส (ข) ด้วยตาข่ายไนลอน.

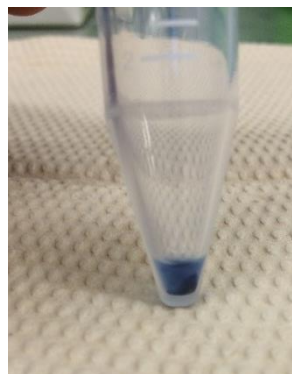
9) แบ่งสารละลายที่ได้จากข้อ 8) ใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml จำนวน 2 หลอดให้ได้ ปริมาตรเท่ากัน.

10) นำหลอดทดลองไปปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (LMC-3000, Biosan) ด้วยอัตราเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที.

11) นำหลอดทดลองทั้งสองออกมา. สังเกตที่ก้นหลอดจะพบว่ามีตะกอนของโปรโทพลาสต์กองอยู่. ดูดสารละลายออกทั้งหมดเหลือไว้เฉพาะโปรโทพลาสต์ที่กองไว้ด้านล่างด้วย pipette.



(ก)



(ข)

รูปที่ 51 โปรโทพลาสต์ดอกอัญชัน (ก) หลังจากปั่นแยกส่วน (ข) หลังจากดูดสารละลายที่ไม่ต้องการ.

12) ใส่ wash solution ลงไปในหลอดทดลองทั้ง 2 ประมาณหลอดละ 5 ml แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยอัตราเร็ว 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที.

13) นำหลอดทดลองออกมาแล้วดูดสารละลายด้านบนออก เหลือเฉพาะโปรโทพลาสต์ด้านล่าง. เติม wash solution ลงไปในหลอดทดลองทั้งสองอีกเล็กน้อย (ประมาณหลอดละ 0.5 ml) จะได้โปรโทพลาสต์สำหรับนำไปทดลอง.



รูปที่ 52 โปรโทพลาสต์ดอกอัญชันสำหรับนำไปทดลอง.

ค) ขั้นตอนเตรียมพร้อมระบบของไหลก่อนทดลอง

1) ติดตั้งกระบอกเข็มฉีดยาขนาด 3 ml และเข็มฉีดยาขนาด 1.2×2.5 mm เข้ากับปั๊มกระบอกฉีดยา (NE-1000, New era pump system).

2) นำชิ้นงานที่ผลิตได้มาต่อกับปั๊มกระบอกฉีดยาด้วยท่ออย่างซิลิโคนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 1 mm.

3) ปรับค่าปั๊มกระบอกฉีดยาโดยป้อนค่าเส้นผ่าศูนย์กลางกระบอกฉีดยาให้ตรงกับขนาดกระบอกฉีดยา. ปรับอัตราการไหลของสารเป็น $15 \mu\text{L}/\text{min}$ ทิศดึงกลับ(withdraw).

4) ป้อนน้ำ DI เข้าไปในช่องทางเดินสารโดยไม่ให้เกิดฟองอากาศภายในช่องทางเดินสารและ orifice ซึ่งสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์. หากพบว่าเกิดฟองอากาศขึ้นให้นำชิ้นงานไปไล่ฟองอากาศด้วยปั๊มสุญญากาศอย่างน้อย 5 นาทีหรือจนกว่าฟองอากาศจะหมดไป.

5) นำชิ้นงานป้อนด้วยน้ำ DI จนช่องทางเดินสารเต็มไปด้วยน้ำและไม่มีฟองอากาศจึงป้อน wash solution เข้าไปแทน. ป้อนจนสารภายในช่องทางเดินสารมีสภาพอยู่ในช่วง $45-50 \text{ mS}/\text{m}$ จึงสามารถเริ่มทดลองได้.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายธนภัทร โทณะพันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 3 กันยายน 2528 ที่อำเภอราชไศล จังหวัดศรีสะเกษ โดยได้สำเร็จการศึกษาในระดับวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาอิเล็กทรอนิกส์ จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในปี 2550.

