บทที่ 1

บทนำ

การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เพื่อสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่ดีขึ้นนั้น การผสมพันธุ์ (hybridization) จัดเป็นวิธีที่เหมาะสม การผสมพันธุ์ยีสต์ที่มีพันธุกรรมต่างกันจะทำให้ได้ลูกผสมที่มีลักษณะจีโนไทป์ (genotype) ต่างจากพ่อแม่ หรือรวมเอาลักษณะของพ่อแม่ไว้ด้วยกัน การผสมพันธุ์ด้วยวิธีการใช้เพศ (mating) ต้องอาศัยเซลล์ยีสต์ที่มีเพศต่างกัน ไม่สามารถใช้กับยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมได้ซึ่งยีสต์เหล่านี้ส่วนมากจะเป็นพวกที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เนื่องจากมีการใช้โครโมโซมแบบ aneuploid หรือ polyploid (Spencer, 1983) ทำให้วิธีการใช้เพศ ไม่สามารถใช้ในการผสมพันธุ์ยีสต์เหล่านี้ได้ ปัจจุบันมีผู้นำเทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชัน (protoplast fusion technique) มาใช้ในการผสมพันธุ์ยีสต์ ซึ่งวิธีนี้ไม่ต้องอาศัยกิจกรรมทางเพศของเซลล์พ่อแม่ สามารถใช้ผสมพันธุ์ที่มีเพศเดียวกัน ต่างเพศกัน หรือไม่มีเพศ แม้แต่เซลล์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกันมาก เช่น ต่างยีน หรือต่างสปีชีก็ใช้วิธีนี้ในการผสมกันได้ จึงมีผู้ใช้เทคนิคนี้ในการสร้างสายพันธุ์จุลินทรีย์ใหม่ๆ ซึ่งรวมเอาลักษณะเด่นของพ่อแม่ไว้ด้วยกัน (Stewart, Panchal และ Russel, 1983; Masahito, Honda และ Kobayashi, 1984; Pina, Calderon และ Benitez,1986)

โพรโทพลาสท์ฟิวชัน (Protoplast Fusion)

โพรโทพลาสท์ฟิวชัน คือการนำเซลล์ที่ลอก หรือละลายผนังเซลล์ออกที่ เรียกว่า โพรโทพลาสท์ (protoplast) หรือ สเฟียโรพลาสท์ (sphaeroplast) มาผสมกัน โพรโทพลาสท์จะหลอมรวมกัน และเกิดการรวมกันขององค์ประกอบภายใน เช่น ไมโตคอนเดรีย ไซโตพลาสซึม ตลอดจนนิวเคลียส ได้ลูกผสมที่อาจเป็น heterokaryon, synkaryon, diploid, triploid หรือ polyploidy อื่น ๆ ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดผสมกัน ลูกผสมนี้จะมีลักษณะแตกต่างจากพ่อแม่ และเรียกลูกผสมนี้ว่า recombinant หรือ fusant (Seki และ Limtong, 1983)

เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชัน แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ การเตรียมโพรโทพลาสท์ การหลอมโพรโทพลาสท์ และการสร้างผนังเซลล์ใหม่ (Peberdy, 1979)

1. การเตรียมโพรโทพลาสท์ (protoplast formation)

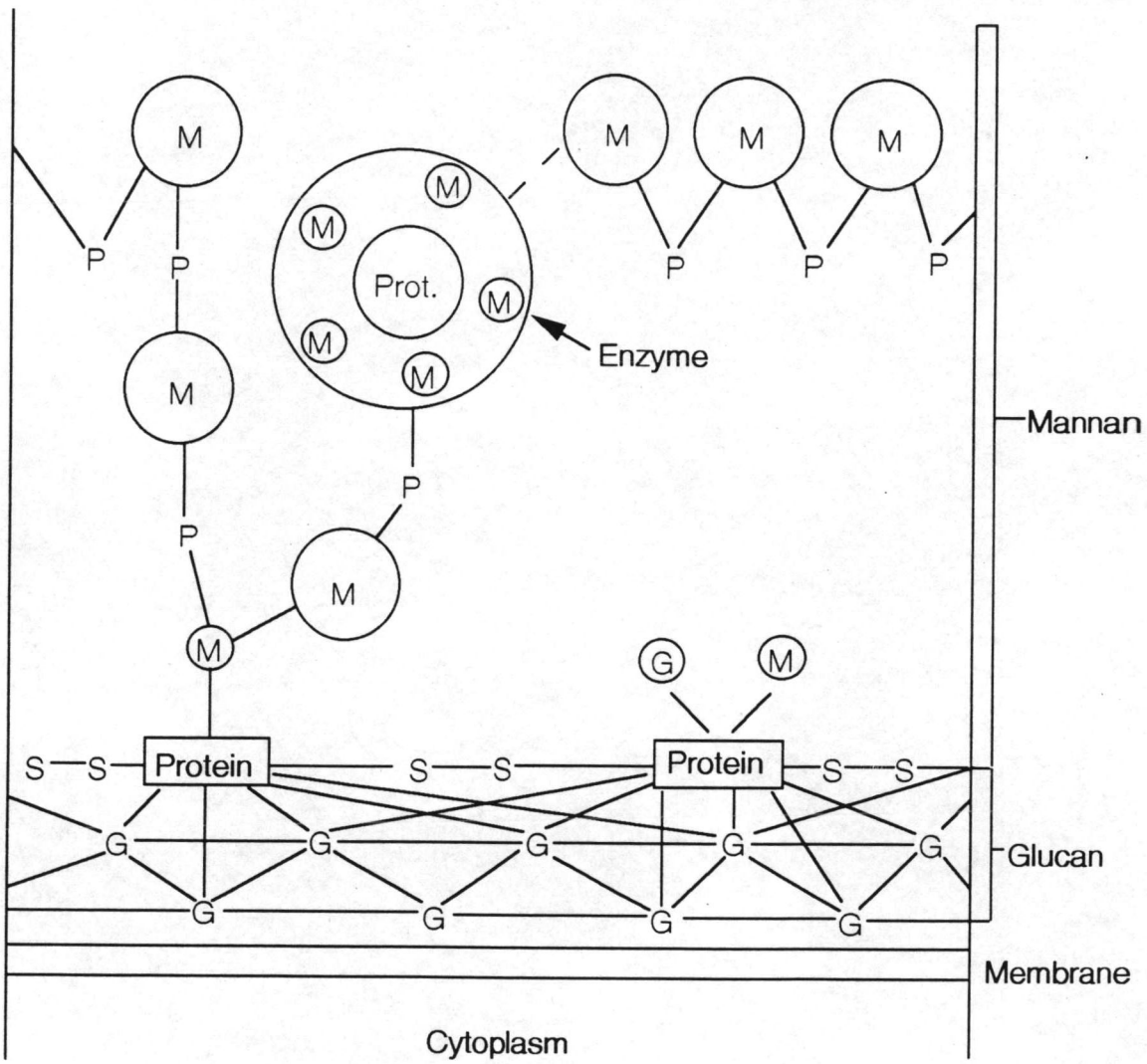
คำว่า โพรโทพลาสท์ ใช้มาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1953 โดย Weibull และคณะ เพื่อเรียกโครงสร้างของแบคทีเรียที่เหลือหลังจากลอกหรือละลายเอาผนังเซลล์ออก ต่อมาจึงนำมาใช้เรียกจุลินทรีย์ ทั้งพวกที่เป็นโปรคารีโอท (procaryote) และพวกยูคารีโอท (eucaryote) ที่อยู่ในสภาพไม่มีผนังเซลล์ซึ่งโครงสร้างที่เหลือหรือเซลล์เปลือยนี้จะไวต่อการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซีสภายนอกโพรโทพลาสท์ที่ยังคงมีส่วนเหลือของผนังเซลล์ติดอยู่ เรียกว่า สเฟียโรพลาสท์ ซึ่งแยกความแตกต่างจากโพรโทพลาสท์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาได้ยาก ดังนั้นในการเรียกโครงสร้างที่ลอกผนังเซลล์ออกแล้ว และไม่สามารถแยกความแตกต่างได้จึงทำได้ยาก จึงมีผู้ใช้ทั้งคำว่าโพรโทพลาสท์ และสเฟียโรพลาสท์ (Villanueva และ Garcia Acha, 1971) ปะปนกัน

1.1 วิธีเตรียมโพรโทพลาสท์ อาจแบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1.1.1 วิธีไม่ใช้เอนไซม์ เช่น การเขย่าเซลล์กับลูกแก้ว แต่วิธีนี้ไม่นิยมใช้เนื่องจากเซลล์ถูกทำลายได้ง่าย โพรโทพลาสท์ที่ได้จะไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ ยังมีการใช้สารเคมี เช่น 2-deoxyglucose และ $MgSO_4$ ซึ่งจะมีผลต่อเมตาบอลิซึมของขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ แต่ข้อเสียของการใช้สารเหล่านี้ คืออาจมีผลต่อเมตาบอลิซึมอื่นๆ ของเซลล์ด้วย (Foury และ Goffeau,1973)

1.1.2. วิธีการใช้เอนไซม์ โดยใช้ lytic enzyme ย่อยผนังเซลล์วิธีนี้นิยมใช้มากกว่าวิธีแรก

โครงสร้างผนังเซลล์ยีสต์ (Matile, Moor และ Robinow, 1969) มีองค์ประกอบที่สำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 1.1 ผนังเซลล์ชั้นนอกประกอบด้วย mannan ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของ Mannose ที่เชื่อมกันด้วยพันธะ α (1→2) ,α (1→3) และα (1→6) mannanจะเชื่อมกันด้วยพันธะ phosphodiester อยู่ในรูป phosphomannan และเชื่อมอยู่กับโปรตีนในรูปของ mannan-protein ส่วนผนังชั้นในประกอบด้วยสารพวก glucan ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคสที่เชื่อมด้วยพันธะ β (1→3) และ β(1 → 6) ตรงที่เกิดแขนง glucan จะอยู่ร่วมกับโปรตีนในรูป glucan-protein ซึ่งเชื่อมด้วยพันธะ disulfide นอกจากนี้ ยังมีองค์ประกอบอื่น ๆ คือ ไคติน โปรตีน และไขมัน ดังนั้นในการ เตรียมโพรโทพลาสท์ จะต้องใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะเหล่านี้ได้



รูปที่ 1.1 **แผนภาพแสดงโครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์** M, mannan ; G, glucan P, phosphate; S, sulphur.

ที่มา : Matile และคณะ (1969)

1.2 เอนไซม์ที่ใช้สำหรับเตรียมโพรโทพลาสท์

ในยีสต์แต่ละสายพันธุ์องค์ประกอบของผนังเซลล์ทั้งชนิดและปริมาณจะแตกต่างกันออกไป ดังนั้นการเลือกใช้เอนไซม์จึงต้องให้เหมาะสมกับยีสต์ชนิดนั้นๆ ซึ่งบางครั้งอาจต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน เอนไซม์ที่ใช้สำหรับย่อยผนังเซลล์เพื่อเตรียมโพรโทพลาสท์ของยีสต์มีหลายชนิด เช่น เอนไซม์จากหอยทาก (snail enzyme) จากการสังเกตของ Giaga ในปี 1914 (อ้างถึงโดย Eddy และ Williamson, 1957) พบว่าน้ำย่อยจากกระเพาะหอยทาก *Helix pomatia* สามารถย่อยผนังเซลล์ยีสต์ได้ Eddy และ Williamson (1957) จึงนำมาใช้ปรับปรุงวิธีการเตรียมโพรโทพลาสท์จาก เซลล์ยีสต์ได้สำเร็จ และจากการศึกษาของ Anderson และ Millbank (1966) พบว่าเอนไซม์จากหอยทาก เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วย endo-β - (1→3) และ endo-β - (1→6) glucanase ซึ่งสามารถย่อย glucan ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ได้ เอนไซม์จากหอยทากมีชื่อทางการค้า ที่แตกต่างกันไป เช่น helicase, glusulase, cytohelicase และ sulfatase เป็นต้น เอนไซม์นี้ใช้ได้กับยีสต์และราหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.1

เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ (microbial enzymes) มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของยีสต์และราได้ เช่น *Bacillus circulans*, *Micromonospora* sp. *Streptomyces* sp.,*Arthrobacter luteus Trichoderma viridae* และ *Trichoderma harzianum* เป็นต้น เอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่นิยมใช้กับยีสต์ คือ เอนไซม์ Zymolyase ซึ่งผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Arthrobacter luteus* เป็นเอนไซม์ที่ใช้ได้ดีกับ *Saccharomyces cerevisiae* และยีสต์ชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 1.1)

Kitamura และ Yamamoto(1981) ได้ศึกษาการทำเอนไซม์ Zymolyase (Kirin Brewery Co.) ซึ่งผลิตจาก *Arthrobacter luteus* บริสุทธิ์ โดยใช้ Biogel CM column chromatography พบว่า เอนไซม์นี้มีองค์ประกอบด้วย 2 ชนิดคือ Zymolyase A และ Zymolyase B โดยศึกษาผลของ reducing agent พบว่า 2-mercaptoethanol จะเร่งการย่อยผนังเซลล์ยีสต์ โดยเอนไซม์ Zymolyase ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับ reducing agent ตัวอื่น ๆ และจากการศึกษาผลของเกลืออนินทรีย์ พบว่า potassium chloride (KCl) จะช่วยในการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเกลืออนินทรีย์ตัวอื่น ๆ โดยนอกจากทำหน้าที่เป็น osmotic stabilizer แล้ว ยังช่วยในการปลดปล่อยเอนไซม์ acid phosphatase และ invertase ออกจากผนังเซลล์ทำให้แรงอิเล็กโทรไลท์ที่ผนังเซลล์อ่อนลง ทำให้เอนไซม์ Zymolyase ทำงานได้ง่าย

เอนไซม์จากจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง มีชื่อทางการค้าว่า Mutanase และ Novozyme 234 ประกอบด้วยเอนไซม์ชนิด α-1,3 glucanase ผลิตได้จากเชื้อ *Trichoderma harzianum* และยังประกอบด้วยเอนไซม์ cellulase, xylanase, α-1, 3 glucanase และ neutral protease ร่วมอยู่ด้วย เอนไซม์นี้ใช้ได้กับ *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Trichosporon pullulan* และ *Schwanniomyces alluvius* (Stephen และ Nasim, 1981)

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่อาจใช้ในการย่อยผนังเซลล์ได้ เช่น Streptzyme จากเชื้อ *Streptomyces* และ *Micromonospora* (Garcia Mendoza และ Villanueva, 1962) cellulase (Onozuka P 1500) จาก *Trichoderma viridae* (Takebe, Otsuki และ Aoki, 1968)

1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมโพรโทพลาสท์โดยใช้ lytic enzyme

การที่ยีสต์จะเปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ได้ดีหรือไม่นั้น นอกจากขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้แล้วยังต้องคำนึงถึงปัจจัย อื่น ๆ อีกด้วย ได้แก่

1.3.1 อายุของเชื้อ จากรายงานของ Shahin (1972) ที่ศึกษากับ *S.cerevisiae* พบว่าการเตรียมโพรโทพลาสท์มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้เชื้อที่เจริญในช่วง log phase และประสิทธิภาพจะลดลงเมื่อใช้เซลล์ที่เจริญในช่วง stationary phase Deutch และ Parry (1974) เสนอว่า การที่เซลล์ซึ่งกำลังเจริญในช่วง stationary phase ทนทานต่อ lytic enzyme เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ โดยมีการสร้างโปรตีนที่มีพันธะ disulfide หรือมีการสร้างโพลีแซคคาไรด์ ที่มีพันธะอื่น ๆ เพิ่มขึ้นอีก ซึ่งจะมีผลต่อการทำงานของ lytic enzyme

1.3.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร ซึ่งมีส่วนประกอบของกรด อะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น L-methionine และ L-homocysteine จะไวต่อการทำงานของ lytic enzyme ดีกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารธรรมดา ซึ่งบทบาทขององค์ประกอบนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจ แต่เชื่อว่า ในสภาพที่มีสารนี้อยู่เซลล์ยีสต์จะนำ ATP มาใช้ในการสังเคราะห์ S-adenosyl methionine ทำให้ขาด ATP ที่ใช้สำหรับการสร้างผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ไวต่อการย่อยของ lytic enzyme สูงขึ้น (Svihla, Schlenk และ Dainko, 1961)

1.3.3 Pretreatment มีรายงาน การนำเซลล์ยีสต์ ทำปฏิกริยากับสารบางชนิดที่มีสมบัติรีดิวซ์ก่อนการย่อยผนังเซลล์ด้วย lytic enzyme พบว่าจะช่วยเร่งการทำงานของ lytic enzyme ทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นโพรโทพลาสท์ได้ดีขึ้น สารที่ใช้กันมาก คือ thiol compound เช่น β - mercaptoethanol, 2,3 - dimercaptopropanol, 2 - mercaptoethylamine (L-homocysteine), thioglycollate (cysteine), dithiotheritol, glutathione, L-cystine และ L-methionine สารเหล่านี้จะมีผลต่อผนังเซลล์โดยตัดพันธะ disulfide ระหว่างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.1 ชนิดของยีสต์ที่ใช้เอนไซม์จากหอยทาก (snail enzymes) , เอนไซม์ Zymolyase และ เอนไซม์ Mutanase และ Novozyme 234 สำหรับย่อยผนังเซลล์เพื่อเตรียมโพรโทพลาสท์

เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
เอนไซม์จากหอยทาก (snail enzymes)	
Saccharomyces carlsbergensis	Eddy และ Williamson (1957)
Saccharomyces rouxii	Arnold และ Garrison (1979)
Saccharomyces cerevisiae	Deutch และ Parry (1974),
	Pina และคณะ (1986)
Zygosaccharomyces fermentati	Pina และคณะ (1986)
Candida utilis	Svihla และคณะ (1977)
Candida tropicalis	Fournier และคณะ (1977)
Schwanniomyces alluvius	Wilson,Khachatourians และ Ingledew(1982)
Yarrowia (Endomycopsis) lipolytica	Shah, Spiprakash และ Charttoo (1989)
เอนไซม์ Zymolyase จาก *Arthrobacter luteus*	
Saccharomyces cerevisiae	van Solingen และคณะ (1977)
	Seki และ Limtong (1983)
	Noda, Togawa และ Yamada (1990)
	Urano, Kamimura และ Washizu (1991)
	Gung และ Sakaguchi (1981)
Kluyveromyces lactis	Gung และ Sakaguchi (1981)
Kluyveromyces fragilis	Farahnak และคณะ (1986)
Candida albicans	Kitamura (1982)
Hansenula polymorpha	Schnettler และ Zimmermann (1993)
เอนไซม์ Mutanase และ Novozyme 234 จาก	
Trichoderma harzianum	
Candida fennica	Andrade, Oliveira และ Linardi (1992)
Endomycopsis fibuligera	Nga และคณะ (1992)

ทำให้ lytic enzyme สามารถเข้าไปทำงานได้ง่ายขึ้น (Davies และ Elvin 1964) thiol compound ที่นิยมใช้ คือ β-mercaptoethanol และ dithiothreitol (Bastide และคณะ, 1979; Peterson, Hawley และ Calderone, 1976)

Villanueva และ Garcia (1971) รายงานว่า เมื่อบ่มเซลล์ของ *Saccharomyces fragilis* กับ lytic enzyme และมี manitol เข้มข้น 0.8 โมลาร์ อยู่ด้วย จะไม่พบการเกิดโพรโทพลาสท์ แต่เมื่อเติม β-mercaptoethanol เข้มข้น 0.1 โมลาร์ลงไป จะมีโพรโทพลาสท์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 1 ชั่วโมง

1.3.4 Osmotic stabilizer (protoplast buffer) จากที่กล่าวมาแล้วว่าโพรโทพลาสท์เป็นโครงสร้างที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซิสภายนอกดังนั้นในการเตรียมโพรโทพลาสท์จึงต้องเติมสารละลายที่ทำหน้าที่ ปรับแรงดันออสโมซิสภายนอกโพรโทพลาสท์ ให้เท่ากับภายในโพรโทพลาสท์ สารละลายนี้เรียกว่า osmotic stabillizer หรือ protoplast buffer โพรโทพลาสท์ปกติ มีลักษณะกลมเมื่ออยู่ในของเหลวที่มีแรงดันออสโมซิส เท่ากับหรือต่ำกว่าภายในเซลล์ สารที่ใช้เป็น osmotic stabilizer ได้แก่ สารละลายของเกลืออนินทรีย์ เช่น NaCl , $MgSO_4.7H_2O$, NH_4Cl และ KCl สารละลายน้ำตาลที่ใช้ ได้แก่ sucrose, sorbose และ maltose และสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ ได้แก่ sorbitol และ mannitol เป็นต้น ความเข้มข้นของ osmotic stabilizer ที่ใช้กับยีสต์ต่างชนิดกัน จะต่างกัน เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ใช้ sorbitol ความเข้มข้น 1.0 -1.2 โมลาร์ (Stephen และ Nasim, 1981) ในขณะที่ *Saccharomyces rouxii* ซึ่งเป็น osmoticphilic yeast จะใช้ sorbitol ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ (Arnold และ Garrison, 1979) Sipiczki, Heyer และ Kohli (1985) ศึกษาความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.8, 0.9 ,1.0 , 1.1 และ 1.2 โมลาร์ จากการทดลอง พบว่า ถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 1.0 โมลาร์ โพรโทพลาสท์จะเริ่มแตก ถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 1.0 โมลาร์ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ Novozyme ลดลง และเกิดโพรโทพลาสท์ช้าขึ้น

osmotic stabilizer ที่ดีควรเหนี่ยวนำการทำงานของ lytic enzyme ได้ด้วย เช่น KCl มีผลต่อการเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ Zymolyase ได้ดีกว่าเกลืออนินทรีย์ชนิดอื่น (Kitamura และ Yamomato ,1981) osmotic stabilizer ที่นิยมใช้ได้แก่ KCl และ sorbitol ตัวอย่าง ชนิดและความเข้มข้นของ osmotic stabilizer แสดงดังตารางที่ 1.2

กลไกการเกิดโพรโทพลาสท์ของยีสต์นั้นจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ เช่น เชื้อ *Candida utilis* ผนังเซลล์จะถูกย่อยบริเวณตรงกลาง (equator) (Svihla และคณะ, 1961) บางชนิดจะถูกย่อยบริเวณขั้ว (polar) เช่น เชื้อ *Saccharomyces fragilis* หรือบริเวณ subterminal เช่น ใน *Saccharomyces cerevisiae* (Beckerich และคณะ, 1984)

ตารางที่ 1.2 แสดงชนิดและความเข้มข้นของสาร osmotic stabilizer ที่ใช้กับโพรโทพลาสท์

osmotic stalilizer	ความเข้มข้น (โมลาร์)	เชื้อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
sorbitol	1.2	*Schizosaccharomyces pombe*	Sipiczki และคณะ (1985)
	1.2	*Saccharomyces cerevisiae*	Stephen และ Nasim (1981)
	0.7	*Saccharomyces cerevisiae*	Urano และคณะ (1991)
	0.8	*Schwanniomyces alluvius*	Dhawale และ Ingledew (1983)
	0.8	*Kluyveromyces fragilis*	Farahnak และคณะ (1986)
	1.0	*Zygosaccharomyces fermentati*	Pina และคณะ (1986)
	1.0	*Saccharomyces diastaticus*	de Figueroa, de Richard และ de van Broock (1984)
	2.0	*Saccharomyces rouxii*	Arnold และ Garrison (1981)
	1.2	*Hansenula polymorpha*	Schnettler และ Zimmermann (1992)
KCl	0.6	*Kluyveromyces lactis*	Gung และ Sakaguchi (1981)
	0.6	*Saccharomyces cerevisiae*	Gung และ Sakaguchi (1981)
	0.45	*Saccharomyces cerevisiae*	Noda และคณะ (1990)
	0.4	*Saccharomyces cerevisiae*	Urano และคณะ (1991)
	0.8	*Endomycopsis lipolytica*	Shah และคณะ (1988)
	1.2	*Candida tropicalis*	Fournier และคณะ (1977)
	1.2	*Saccharomyces diastaticus*	Spencer และคณะ (1980)
	0.6	*Schizosaccharomyces pombe*	Dickinson และ Issenberg (1982)
	0.8	*Candida fennica*	Andrade และคณะ (1992)
$MgSO_4$	1.2	*Saccharomyces cerevisiae*	Shahin (1972)
	0.95	*Candida albicans*	Pesti และ Ferenczy (1982)
mannitol	0.8	*Candida utilis*	Garcia และ Villanueva (1964)
maltose	0.8	*Saccharomyces fragilis*	Davies และ Elvin (1964)

Eddy และ Williamson (1957) ได้ทดลองติดตามการปลดปล่อยโพรโทพลาสท์ออกจากผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* โดย lytic enzyme พบว่าส่วนมากเป็นบริเวณเดียวกับ budscar ซึ่งเป็นบริเวณที่ผนังเซลล์ไม่หนาเท่าส่วนอื่น (Darling, Theilade และ Birch-Anderson, 1969) โพรโทพลาสท์ที่หลุดออกมาจะมีลักษณะกลมเมื่ออยู่ใน osmotic stabilizer

2. การหลอมโพรโทพลาสท์ (protoplast fusion)

การหลอมโพรโทพลาสท์ สามารถทำได้ 2 วิธีคือ

2.1 การใช้สารเคมี เช่น สารโพลีเอธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol; PEG) ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีมีน้ำหนักโมเลกุลหลายขนาด ที่ใช้ได้ผลดีกับยีสต์ คือ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 4000 และ 6000 (van Solingen และ van der Plaat, 1977) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำการรวมตัวของโพรโทพลาสท์ของ แบคทีเรีย รา ยีสต์ และพืชชั้นสูง (Stahl , 1978) โดยทำให้โพรโทพลาสท์เกิดการรวมกลุ่ม (agglutination) มีการสลายและรวมตัวกันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดลูกผสมขึ้นได้ พบว่าการใช้ PEG ที่มีความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษกับโพรโทพลาสท์ และการบ่มโพรโทพลาสท์ใน PEG นานเกินไป จะมีผลทำให้โพรโทพลาสท์มีชีวิตรอดน้อย และมีค่า fusion frequency จะต่ำลงด้วย (Peberdy, 1979)

2.2. การใช้กระแสไฟฟ้า หรือวิธีอิเล็กโทรฟิวชัน (Electrofusion) วิธีนี้ขั้นแรกจะกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์ มาเรียงหรือเกาะกันเป็นกลุ่มก่อน หลังจากนั้นจึงกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าสัญญาณคลื่นรูปพัลส์เพื่อทำ ให้โพรโทพลาสท์หลอมรวมกัน

การทำให้โพรโทพลาสท์มาเรียงหรือเกาะกลุ่มกันสามารถทำได้ 2 แบบ คือ

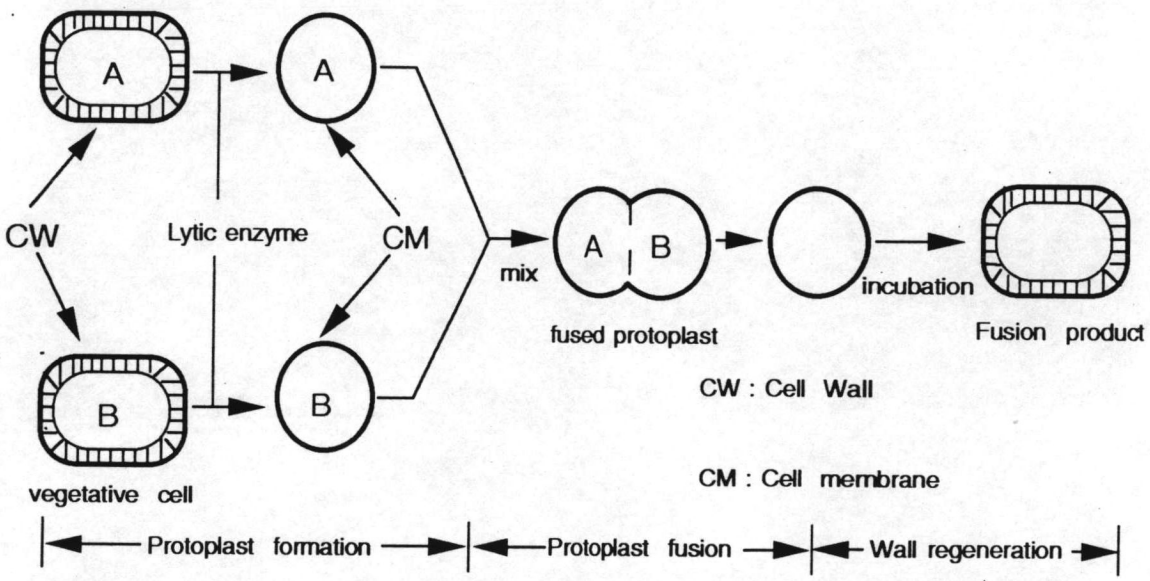
2.1.1 การใช้เทคนิคการตกตะกอน (Macro - technique with agglutination) ทำให้โพรโทลาสท์มาเกาะกลุ่มกันโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (Takahashi และคณะ, 1991) หรือการใช้สาร PEG (Chang, 1992)

2.2.2 การกระตุ้นโดยใช้สนามไฟฟ้า (Micro-technique with dielectrophoresis) เป็นวิธีที่กระตุ้นให้โพรโทพลาสท์ เข้ามาเรียงกันก่อนโดยใช้ไฟฟ้ากระแสสลับ(AC)สัญญาณคลื่นรูปไซน์ เช่น การกระตุ้นโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้คลื่นรูปไซน์ความถี่ 1 MHz และสนามไฟฟ้า 400 V/ cm (Noda และคณะ, 1990) วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์หลอมกันได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องทำการเปลี่ยนสารละลายที่ใช้สำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ และไม่เป็นพิษกับโพรโทพลาสท์เหมือนกับการใช้ PEG

หลังจากกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์เข้ามาเรียงหรือเกาะกลุ่มกันแล้วขั้นต่อไปของเทคนิคการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้าคือการกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์หลอมรวมกันสามารถเลือกใช้ไฟฟ้ากระแสตรง(DC) สัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square wave pulse) หรือคลื่นรูปพัลส์แบบเอกซ์โปเนนเชียล (Exponentially decaying pulse) (Chang, 1989) การเลือกใช้แบบใดนั้นขึ้นกับความเหมาะสมของเครื่องมือและชนิดของโพรโทพลาสท์ พบว่าการกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์แบบสี่เหลี่ยมในการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Schnettler, Zimmermann และ Emeis, 1984; Noda และคณะ , 1990; Urano และคณะ ,1991) และในการหลอมโพรโทพลาสท์ของเชื้อยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* (Vondrejs และคณะ , 1980) ซึ่งกระบวนการโพรโทพลาสท์ฟิวชัน ของเชื้อยีสต์แสดงดังรูปที่ 1.2

Emeis (1987) ได้ทำการผสมเชื้อยีสต์ *Sacchamyces cerevesiae* กับ *S. diastaticus* โดยใช้วิธีอิเล็กโทรฟิวชัน พบว่าปัจจัยทางไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการฟิวชัน นั้น ในขั้นตอนการกระตุ้นให้โพรโทพลาสท์มาเรียงตัวกัน ใช้ความเข้มข้นสนามไฟฟ้าในช่วง 0.33 - 6.7 kV/cm AC จะเป็นช่วงที่ทำให้โพรโทพลาสท์มีชีวิตรอด และมีรูปร่างคงตัว แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของสนามไฟฟ้าสูงกว่า 7.0 kV/cm AC จะทำให้โพรโทพลาสท์แตก ส่วนในขั้นตอนที่ให้โพรโทพลาสท์มาหลอมรวมกัน จะใช้สนามไฟฟ้าสูงมากขึ้นถึง 10.0 kV/cm DC

Urano และคณะ(1991) ใช้เทคนิคอิเลคโทรฟิวชัน โดยใช้เครื่องหลอมเซลล์ (Somatic Hybridizer SSH-1 ;Shimadzu Ltd.) ในการทดลองผสมพันธุ์ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* G 706 (a his4; leu2; thr4) กับ *S.cerevisiae* 0708-11-16A (a ura 1,ade 1) เพื่อให้สร้างลูกผสมที่ผลิตกรดอะมิโน 3 ชนิด และเบสนิวคลีโอไซด์ 2 ชนิด จากการทดลองพบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการหลอมโพรโทพลาสท์ คือใส่เกลือแมกนีเซียมอิออน และแคลเซียมอิออน ลงในสารละลายสำหรับหลอมโพรโทพลาสท์ ให้มีค่านำไฟฟ้า อยู่ในช่วง 40 - 50 µs/ cm และกระตุ้นด้วยความเข้มสนามไฟฟ้า 400 V/cm AC ความถี่ 1 MHz เป็นเวลา 30 วินาที และกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ความเข้มสนามไฟฟ้า 5.5 kV/cm DC ความกว้างพัลส์ 25 µs จำนวน 5 ครั้ง พบว่ามีค่า fusion frequency ประมาณ 0.01-0.02 และมีประสิทธิภาพการหลอม (fusion efficiency) ดีกว่าวิธีการใช้ PEG ประมาณ 10^4 เท่า



รูปที่ 1.2 **แผนภาพแสดงกระบวนการโพรโทพลาสท์ฟิวชันของเชื้อยีสต์**

ที่มา : Seki และ Limtong (1983)

Noda และคณะ (1990) ได้ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยไฟฟ้าของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SH 1509 กับ SH 1512 โดยใช้เครื่องหลอมเซลล์ SSH-1 (Shimadzu Ltd.) พบว่าภาวะที่เหมาะสมคือ pretreatment เซลล์ด้วยเอนไซม์ Zymolyase เข้มข้น 0.2 มก./มล. บ่มนาน 60 นาที (สำหรับสายพันธุ์ SH 1509) และ 1.0 มก./มล. บ่มนาน 90 นาที (สำหรับสายพันธุ์ SH 1512) Osmotic Stabilizer ที่ใช้เป็น sorbital เข้มข้น 0.6 โมลาร์ โดยใส่เกลือ $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นเท่ากัน 0.1 มิลลิโมลาร์ และปัจจัยทางไฟฟ้าที่เหมาะสม คือ กระตุ้นด้วยความเข้มสนามไฟฟ้า 400 V/cm AC ความถี่ 1 MHz เป็นเวลา 120 วินาที และกระตุ้นด้วยสัญญาณคลื่นรูปพัลส์ความเข้มสนามไฟฟ้า 7.0 kV/cm DC จำนวน 2 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 60 μs ซึ่งค่า fusion frequency ที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วง 2.2×10^{-5} - 6.8×10^{-5}

3. การสร้างผนังเซลล์ใหม่และการเจริญเป็นโคโลนี (protoplast regeneration and reversion)

โพรโทพลาสท์ที่หลอมรวมกันแล้วจะถูกกระตุ้นให้สร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ และสามารถเจริญต่อไปได้ สภาพที่เหมาะสมในการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของพวก budding yeast พบว่าจะต้องหุ้มโพรโทพลาสท์ด้วยอาหารแข็งที่ประกอบด้วยเจลาติน 10-30 เปอร์เซ็นต์ หรือวุ้น 2 หรือ 3 เปอร์เซ็นต์ (Beckerich, 1984) สำหรับพวก fission yeast เช่น *Schizosaccharomyces pombe* สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ และเจริญต่อไปได้ทั้งในอาหารเหลว (Necas, 1971) และอาหารแข็ง โดย Sipiczki และคณะ (1985) พบว่า โพรโทพลาสท์ของ fission yeast สามารถสร้างผนังเซลล์และเจริญได้ทั้งที่อยู่บนผิวหน้าของอาหาร และที่หุ้มด้วยอาหารแข็ง เช่นเดียวกับ budding yeast สำหรับพวก fodder yeast เช่น *Candida* กลุ่มที่ใช้ n-alkane ได้ สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ และเจริญได้ในอาหารเหลวเช่นเดียวกับ fission yeast ส่วนเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* สามารถสร้างผนังเซลล์และเจริญได้ทั้งในอาหารเหลว และอาหารแข็ง (Necas ,1971)

Necas (1971) พบว่า การสร้างผนังเซลล์ยีสต์เริ่มจากการสร้าง fibrillar network ซึ่งมี crystalline glucan เป็นองค์ประกอบสำคัญ และต่อจากนั้นจึงมีการสร้าง matrix ซึ่งมีส่วนประกอบของ mannan, amorphous glucan, protein และ lipid การที่ budding yeast ไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ และเจริญในอาหารเหลวได้นั้น เนื่องจากมีแต่การสร้าง fibrillar network เท่านั้น ไม่มีการสร้างส่วน matrix เพื่อให้เป็นผนังเซลล์ที่สมบูรณ์ ในขณะที่ fission yeast มีการสร้างส่วน fibrillar network และส่วน matrix เป็นผนังเซลล์ยีสต์ที่สมบูรณ์ได้

ประสิทธิภาพในการสร้างเซลล์ใหม่ และเจริญเป็นโคโลนีของโพรโทพลาสท์ จะแสดงในรูปของ % reversion frequency หรือ regeneration frequency (Seki และ Limtong, 1983) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% \text{ regeneration frequency} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีของโพรโทพลาสท์ที่เจริญบน complete regeneration medium}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ทั้งหมด}} \times 100$$

Shah และคณะ (1989) รายงานผลการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วย PEG ของเชื้อยีสต์ *Yarrowia (Endomycopsis) lypolytica* Type A และ Type B มีค่า reversion frequency 1.5×10^{-5} เปอร์เซ็นต์

Noda และคณะ (1990) รายงานผลการหลอมโพรโทพลาสท์ด้วยวิธีอิเล็กโทรฟิวชันของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SH 1509 และ สายพันธุ์ SH 1512 พบว่ามีค่า regeneration frequency 0.3 เปอร์เซ็นต์

การทำโพรโทพลาสท์ฟิวชัน อาจแบ่งเป็น 3 แบบ ตามชนิดของคู่เชื้อที่นำมาผสมกัน คือ

1. Intraspecific fusion เป็นการทำฟิวชันของเชื้อที่อยู่ในสปีชีเดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์หรือต่าง mating type ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันโอกาสได้ลูกผสม (fusion product หรือ fusant) ที่เกิดจากการหลอมรวมกันของนิวเคลียสด้วยจะมีมาก ลูกผสมที่ได้จะมีความคงตัว (stable) และมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมน้อย เช่น การหลอมรวมกันระหว่างโพรโทพลาสท์ของเชื้อต่อไปนี้

Saccharomyces cerevisiae (van Solingen และ van der Plaat, 1977; Ferenczy Maraz, 1977 ; Arima และ Takano, 1979; Maraz และ Subik, 1981; Noda และคณะ, 1990; Urano และคณะ 1991; Yamazaki และ Nonomura, 1994)

Schwanniomyces alluvius (Wilson และคณะ, 1982)

Candida utilis (Delgado และ Herrera, 1981)

Candida tropicalis (Fournier และคณะ, 1977)

Candida fennica (Andrade และคณะ 1992)

Candida albicans (Evan, Adeniji และ Mc Clary, 1982; Pesti และ Ferenczy, 1982)

Hensenula wingii (Svoblda, 1978)

Hansenula polymorpha (Schnettler และ Zimmermann, 1993)

Schizosaccharomyces pombe (Sipiczki และ Ferenczy, 1977)

Kluyveromyces lactis, K. ickerhamii, K. arxianus (Johannsen และ Opperman,1984)

Yarrowia (*Endomycopsis*) *lipolytica* (Shah และคณะ, 1989)

2. Interspecific fusion เป็นการทำฟิวชันของเชื้อที่อยู่ในยีนัสเดียวกัน แต่ต่างสปีชีกัน ซึ่งมีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน อาจได้ลูกผสมที่คงตัวหรือไม่คงตัว คู่ของเชื้อที่ทำฟิวชันแบบนี้ เช่น

Schwanniomyces alluvius กับ *Schw. castelli* (Dhawale และ Ingledew, 1983)

Kluyveromyces marxianus กับ *K. vanudenii* (Johannsen และคณะ, 1984)

Saccharomyces diastaticus กับ *S.cerevisiae* (de Figueroa และคณะ, 1984)

Saccharomyces uvarum กับ *S.cerevisiae* (Stewart และคณะ, 1983)

Saccharomyces diastaticus กับ *S. rouxii* (Spencer และคณะ, 1985)

Candida albicans กับ *C. tropicalis* (Corner และคณะ, 1989)

Candida albicans กับ *C. boidini* (Kobori,Takata และOsumi, 1991)

3. Intergeneric fusion เป็นการทำฟิวชันของเชื้อที่อยู่ต่างยีนัสกัน ซึ่งเชื้อจะมีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกันมากขึ้น โอกาสที่จะได้ลูกผสมที่คงตัวน้อยกว่า 2 แบบแรก ตัวอย่างของคู่เชื้อที่ทำฟิวชันแบบนี้ เช่น

Kluyveromyces lactis กับ *Saccharomyces. cervisiae* (Gung และ Sakaguchi, 1981)

Kluyveromyces fragilis กับ *Saccharomyces cerevisiae* (Farahnak และคณะ, 1986)

Candida utilis กับ *Saccharomyces cerevisiae* (de Richard และde van Broock, 1984)

Schwanniomyces alluvius กับ *Saccharomyces cerevisiae* (Wilson และคณะ, 1982)

Zygosaccharomyces fermentati กับ *Saccharomyces cerevisiae* (Svoboda, 1978; Pina และคณะ, 1986)

Endomycopsis fibuligera กับ *Candida tropicalis* (Provost และคณะ, 1978)

ประสิทธิภาพการหลอมของโพรโทพลาสท์ จะแสดงในรูป fusion frequency (Seki และ Limtong, 1983) ซึ่งหาได้จาก

$$\text{fusion frequency} = \frac{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ที่หลอมกัน}}{\text{จำนวนโพรโทพลาสท์ทั้งหมด}}$$

โดยจำนวนโพรโทพลาสท์ที่หลอมกัน คือ จำนวนโคโลนีที่เจริญบน selective regeneration medium ซึ่งมี selective marker ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำนวนโพรโทพลาสท์ทั้งหมด คือ จำนวนโคโลนีที่เจริญบน complete regeneration medium ที่ไม่มี selective marker

จากการทดลองทั่วไปพบว่า fusion frequency ของการทำ intraspecific fusion จะมีค่าสูงกว่าการทำโพรโทพลาสท์ฟิวชัน ของอีก 2 แบบ เช่น

Evan และคณะ (1982) ทำ intraspecific fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Candida albicans* ด้วยกัน พบว่ามีค่า fusion frequency 5.7×10^{-4}

Fournier และคณะ (1977) ทดลองผสมพันธุ์แบบ intraspecific fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Candida tropicalis* strain C และ strain D พบว่า มีค่า fusion frequency 3×10^{-5}

Andrade และคณะ (1992) ทำ intraspecific fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Candida fennica* 2 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า fusion frequency 5.8×10^{-5}

van Solingen และ van der Plaat (1977) ทดลองผสมพันธุ์แบบ intraspecific fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Sacchromyces cerevisiae* ด้วยกัน พบว่ามีค่า fusion frequency 1×10^{-5}

Urano และคณะ (1991) ทำ intraspecific fusion โดยวิธีอิเล็กโทรฟิวชัน ระหว่างเชื้อ *Sacchromyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า fusion frequency 0.02 และมีประสิทธิภาพการฟิวชัน ดีกว่าการใช้ PEG 10^{4} เท่า

de Figueroa และคณะ (1984) ทำ interspecific fusion โดยใช้ PEG ระหว่าง เชื้อ *Sacchromyces diastaticus* กับ *S. cerevisiae* พบว่ามีค่า fusion frequency 3.3×10^{-3}

Conner และคณะ (1989) ทดลองผสมพันธุ์แบบ interspecific fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Candida albicans* กับ *C. tropicalis* พบว่ามีค่า fusion frequency 1.5×10^{-5}

Kobori และคณะ (1991) ทำ interspecific fusion โดยวิธีอิเล็คโทรฟิวชัน ระหว่างเชื้อ *Candida albicans* กับ *C. boidini* พบว่ามีค่า fusion frequency อยู่ในช่วง 10^{-4} ถึง 10^{-5}

de Richard และ de van Broock (1984) ทำ intergeneric fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Candida utilis* กับ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีค่า fusion frequency 1.5×10^{-5}

Pina และคณะ (1986) ทดลองผสมแบบ Intergeneric fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Zygosaccharomyces fermentati* กับ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่ามีค่า fusion frequency 2×10^{-7}

Provost และคณะ (1978) ทำ Intergeneric fusion โดยใช้ PEG ระหว่างเชื้อ *Endomycopsis fibuligera* กับ *Candida tropicalis* พบว่ามีค่า fusion frequency น้อยมากประมาณ 10^{-5} และลูกผสมที่เกิดขึ้น มีความไม่คงตัว(instable) เนื่องจากเป็นการผสมระหว่างเชื้อ 2 ชนิด ที่มีอนุกรมวิธาน ต่างกันมาก โดยเชื้อ *E. fibuligera* เป็นเชื้อยีสต์ที่มีรูปร่างเป็นเส้นใย คล้ายกับเชื้อรา ส่วน *C. tropicalis* มีลักษณะเป็นรูปร่างของยีสต์ มีการแตกหน่อด้านข้างและ *E. fibuligera* มี generation time เร็วกว่า *C. tropicalis* ประมาณ 2 เท่า

4. การวิเคราะห์ลูกผสมที่ได้จากเทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชัน

การตรวจสอบว่าลูกผสมที่ได้เป็นลูกผสมที่แท้จริงหรือไม่สามารถทำได้หลายวิธี คือ

4.1 การดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีหรือเซลล์ โดยการเปรียบเทียบลักษณะโคโลนีระหว่างลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ซึ่งในยีสต์ นิยมใช้การวัดขนาดและปริมาตรของเซลล์ (Wilson และคณะ, 1982) ในการเปรียบเทียบ

4.2 การย้อมสีนิวเคลียส เพื่อดูจำนวนนิวเคลียส ทั้งนี้เพราะการหลอมโพรโทพลาสท์อาจเกิดได้มากกว่า 2 โพรโทพลาสท์ ดังนั้น ลูกผสมอาจมีจำนวนนิวเคลียสต่อเซลล์ตั้งแต่ 2, 3, 4 หรือมากกว่า ยกเว้นในกรณีที่มีการหลอมกันของนิวเคลียส จะเห็นเพียงนิวเคลียสเดียวเท่านั้น (Delgado และ Herrera, 1981)

4.3 การวัดปริมาณ DNA ทำโดยวัดปริมาณ DNA ในลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ถ้าเป็นลูกผสมจริงควรจะมีปริมาณ DNA มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ และจะมากขึ้นเมื่อมีการหลอมกันมากกว่า 2 โพรโทพลาสท์ (Farahnak และคณะ,1986) ยกเว้นถ้าเกิดการสูญหายไปของโครโมโซมอาจทำให้ปริมาณ DNA น้อยกว่าของสายพันธุ์พ่อแม่รวมกัน(Johannsen และ Opperman, 1984)

4.4. การตรวจสอบการเกิด hybridization ของโครโมโซม หรือ DNA ของลูกผสมว่าสามารถ hybridizeกับ DNA probe เช่นเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่หรือไม่ (Farahnak และคณะ,1986)

4.5 การวิเคราะห์เอนไซม์ isozyme เช่น esterase, alcohol dehydrogenase และ

glutamate dehydrogenase ลูกผสมควรจะแสดงลักษณะ isozyme pattern ของสายพันธุ์พ่อแม่รวมกัน (Farahnak และคณะ,1986)

4.6 การทดสอบความสามารถในการสร้างจำนวนสปอร์ และลักษณะของสปอร์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ (Wilson และคณะ, 1982)

4.7 Induced segregation โดยการเหนี่ยวนำลูกผสมให้เกิดการแยกของโครโมโซมด้วยสารเคมี เช่น *p*-fluorophenylalanine ถ้าโครโมโซมที่แยกมีลักษณะร่วมกันของทั้งสายพันธุ์พ่อแม่ แสดงว่า ลูกผสมเกิดการรวมกันของนิวเคลียสด้วย (Wilson และคณะ, 1982)

4.8 เปรียบเทียบการ assimilation และการหมัก (fermentation) น้ำตาล ลูกผสมที่แท้จริงควรมีความสามารถในการใช้ และหมักน้ำตาลร่วมกันระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ (de Richard และ de van Broock, 1984)

4.9 การถ่ายทอดและการรวมกันของ mitochondrial marker โดยการวิเคราะห์ mitochondrial marker ของลูกผสม เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ (Maraz และ Subik, 1981)

5. การนำเทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชันมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ยีสต์

เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชัน สามารถนำมาใช้ผสมพันธุ์ยีสต์เพื่อการศึกษาทางด้านพันธุกรรมพื้นฐาน และเพื่อการปรับปรุงเชื้อให้มีลักษณะใดลักษณะหนึ่งเพิ่มขึ้น ปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชันในการปรับปรุงพันธุยีสต์ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมกันมากขึ้น

de Richard และ de van Broock (1984) ทดลองทำ intergeneric fusion ระหว่าง *Candida utilis* ซึ่งเป็น mutant ที่มี marker แบบ mitochondrail maker มีลักษณะขาดเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ respiration เรียกว่า พวก respiratory deficient (RD mutant) ซึ่งพวกนี้จะไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน เป็น non-fermentable carbon เพราะขาดเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ respiration กับ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็น auxotrophic mutant โดยใช้ PEG และ Ca^{2+} เป็นตัวเหนี่ยวนำพบว่า มีการถ่ายทอดลักษณะความสามารถใช้เอนไซม์ในขบวนการ respiration โดยสมบูรณ์ เรียกว่าพวก respiratory sufficient (RS) จาก *S. cerevisiae* ไปให้ *Candida utilis* ทำให้ลูกผสมสามารถเจริญได้ใน minimal medium ที่มี glycerol เป็นแหล่งคาร์บอน และลูกผสมจะมีลักษณะเซลล์ และการใช้น้ำตาลเหมือน *C . utilis* โดยไม่มีตัวใดเหมือน *S. cerevisiae* เขาจึงสรุปว่า ในการผสมกันนั้นอาจเกิดจากการหลอมกันของไมโตคอนเดรียของพ่อแม่ แต่ไม่มีการหลอมกันของนิวเคลียส นอกจากนี้ยังมีนักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาเกี่ยวกับการถ่ายทอดไมโตคอนเดรีย โดยกระบวนการโพรโทพลาสท์ฟิวชัน คือ Ferenczy และ Maraz (1977) ได้

ใช้เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชันในการถ่ายทอดยีนที่มีลักษณะต้านต่อยา erythromycin ซึ่งอยู่ในไมโตคอนเดรียของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เป็นตัวให้ไปสู่ *S. cerevisiae* ที่เป็นตัวรับซึ่งมี mating type เหมือนกัน โดยทั้งคู่เป็น auxotrophic mutant ลูกผสมที่ได้จะมีขนาดเซลล์และปริมาณ DNA ต่อเซลล์สูงกว่าพ่อแม่ และจากการกระตุ้นให้มีการ segregation จะทำให้ได้เซลล์ที่มีลักษณะเหมือน *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นตัวรับ และจะแสดงลักษณะที่ทนต่อ erythromycin แสดงว่ามีการถ่ายทอดยีนจากไมโตคอนเดรียจากตัวให้ไปสู่ตัวรับได้ โดยใช้เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชันขบวนการนี้อาจเรียกว่า "transfusion"

Morishita และ Yaguchi (1983) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะความสามารถในการทนเค็มของยีสต์โดยใช้เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชันผสมพันธุ์ระหว่าง *Torulopsis halomitratophila* IFO 156 ซึ่งเป็นยีสต์ทนเค็มและต้องการวิตามิน thiamine ในการเจริญ กับเชื้อรา *Prototheca zypyfii* IFO 6989 ซึ่งไม่ทนเค็ม และไม่ต้องการวิตามินในการเจริญ ลูกผสมที่ได้สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง และไม่ต้องการวิตามินในการเจริญ

Spencer และคณะ (1985) ผสมพันธุ์ระหว่าง *Saccharomyces diastaticus* กับ *S.rouxii* โดยใช้เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชันลูกผสมที่ได้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลเหมือน *S. diastaticus* แต่สามารถทนน้ำตาลความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่ *S. diastaticus* จะสามารถเจริญได้

de Figueroa และคณะ (1984) สร้างลูกผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* 1161 ซึ่งเป็นยีสต์ตกตะกอนกับ *S.disataticus* 1376 ที่เป็นยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้ ลูกผสม 45 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างเอนไซม์ glucoamylase และหมักแป้งได้ และในบรรดาลูกผสมที่ได้นี้มี 41 สายพันธุ์ที่แสดงลักษณะการตกตะกอนเหมือน *S.cerevisiae* ด้วย ในปีเดียวกันเขาทดลองผสมพันธุ์ *S. diastaticus* 1376 นี้ กับ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็น baker 's yeast ที่ไม่สามารถใช้แป้งได้ แต่สามารถหมักเอทธานอลได้สูง ได้ลูกผสมที่หมักเอทธานอลจากแป้ง ในปีต่อมา de Figueroa และคณะ (1985) ได้ศึกษาความสามารถในการหมักเอทธานอลของลูกผสม 4 สายพันธุ์ จากการผสมคู่แรก 2 สายพันธุ์ และอีก 2 สายพันธุ์จากการผสมคู่ที่สอง โดยหมักในอาหารที่มี starch hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าลูกผสมทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถหมักเอทธานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ คือ *S.cerevisiae* และ *S.disataticus* 1376

Dhawale และ Ingledew (1983) ทดลองหลอมโพรโทพลาสระหว่าง *Schwanniomyces alluvius* VCD 54-83 กับ *Schw.castelli* ATCC 26077 ซึ่งทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ได้สูงขึ้นแต่ *Schw.castell* ยังสามารถเจริญได้ดีในอาหาร lactose ในขณะที่ *Schw. alluvius* เจริญได้ช้าในอาหารนี้ จากการทดลองพบว่าการเกิดฟิวชันของเชื้อคู่นี้มี fusion frequency 1.46×10^{-4} ได้ลูกผสมที่สามารถเจริญได้ดีในอาหาร lactose มีขนาดเซลล์และปริมาณ DNA ต่อเซลล์สูงกว่าพ่อแม่ 3.5 - 4 เท่า เมื่อกระตุ้นให้เกิด segregation ด้วย *p*-fluorophenylalanine พบว่าเซลล์ที่เกิดจากการ segregate จะมีโครโมโซมร่วมระหว่างโครโมโซมของพ่อแม่ แต่ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ amylase ของลูกผสม สูงกว่าพ่อแม่เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Farahnak และคณะ(1986)ใช้เทคนิคโพรโทพลาสท์ฟิวชัน ในการสร้างลูกผสมที่หมักเอทธานอลได้สูงจาก lactose ระหว่าง *Kluyveromyces fragilis* 55-55 ซึ่งสามารถหมักเอทธานอลจากน้ำตาล lactose ได้ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เนื่องจากไม่ทนต่อเอทธานอลความเข้มข้นสูงกว่านี้ กับ *S.cerevisiae* STX 23 - 5B ซึ่งไม่สามารถใช้น้ำตาล lactose ได้ แต่ทนความเข้มข้นของเอทธานอลได้สูง พบว่า fusion frequency สูงถึง 0.7 เปอร์เซ็นต์ และได้ลูกผสมที่สามารถเจริญและหมักเอทธานอลได้สูงกว่า 13 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในอาหารที่มี lactose เป็นแหล่งคาร์บอน และจากการวิเคราะห์ลูกผสม พบว่า ปริมาณ DNA ต่อเซลล์สูงกว่าพ่อแม่ 2 - 4 เท่า แสดงว่า เกิดการรวมกันมากกว่า 2 โพรโทพลาสท์ และจากการศึกษาการ hybridization ของโครโมโซมลูกผสมกับพ่อแม่ พบว่า ลูกผสมมียีนของทั้งพ่อแม่รวมอยู่ด้วย นอกจากนี้ Masahito และคณะ (1984) ได้ทำการทดลองเช่นเดียวกัน คือทำโพรโทพลาสท์ฟิวชันระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Kluyveromyces lactis* T 396 ได้ ลูกผสม PN 13 สามารถหมักเอทธานอล จากกลูโคสและแลคโตสได้เร็วกว่า *K. lactis* T 396

Pina และคณะ (1986) สร้างลูกผสมระหว่าง *Zygosaccharomyces fermentati* APP 1 ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถใช้ cellulose เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทธานอลได้เล็กน้อย และทนอุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส กับ *Saccharomyces cerevisiae* MMY 1 ที่สามารถหมักเอทธานอลได้สูง พบว่าการฟิวชันของเชื้อคู่นี้มีค่า fusion frequency 2×10^{-7} และลูกผสมที่ได้สามารถเจริญในอาหารที่มี cellobiose เป็นแหล่งคาร์บอนเหมือน *Z. fermentati* และสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเอทธานอล 6 เปอร์เซ็นต์ เหมือน *S.cerevisiae* ในขณะที่ *Z. fermentati* ไม่สามารถเจริญได้ลูกผสมนี้คงตัว ถึงแม้จะเลี้ยงใน complete medium

Schnettler และ Zimmermann (1993) ได้ศึกษาการทำอิเล็กโทรฟิวชัน ของเชื้อยีสต์ *Hansenula polymorpha* 2 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องมือ Biojet CF electrofusion power supply (Biomed, Theres, FRG) พบว่าเมื่อเตรียมโพรโทพลาสท์โดยใช้เอนไซม์ Zymolyase 6 มก./มล. และ sorbitol เข้มข้น 1.2 โมลาร์ บ่มเป็นเวลานาน 90 นาที ใส่เกลือ Ca^{2+} - acetate และ Mg^{2+} -acetate ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ แล้วนำมาใช้กับเครื่องโดยใช้ภาวะทางไฟฟ้า 0.4 kV/cm AC ความถี่ 2 MHz เป็นเวลา 30 วินาที แล้วกระตุ้นด้วยความเข้มสนามไฟฟ้า 12 kV/cm DC จำนวน 2 พัลส์ ความกว้างพัลส์ 15 µs พบว่ามีค่า fusion frequency 1.2×10^{-5} แต่เมื่อใส่เกลือ $ZnCl_2$ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ลงไปแทนที่ Ca^{2+} - acetate พบว่ามีค่า fusion frequency เพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบการหลอมโพรโทพลาสท์ของยีสต์ *Candida oleophila* และ *Endomycopsis fibuligera* ด้วยการใช้ PEG และวิธีอิเล็กโทรฟิวชัน จากเครื่องมือที่ประดิษฐ์ และพัฒนาในห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. หาภาวะที่เหมาะสม ในการเตรียมโพรโทพลาสท์จากเซลล์ยีสต์ และภาวะในการเจริญกลับมาเป็นเซลล์ใหม่
2. หาองค์ประกอบที่เหมาะสมของสารละลายที่ใช้เป็นอิเล็กโตรไลท์ ในการหลอมโพรโทพลาสท์โดยวิธีอิเล็กโทรฟิวชัน
3. ศึกษาผลสนามไฟฟ้า, ความถี่ และระยะเวลาที่ให้สนามไฟฟ้าต่อการหลอมโพรโทพลาสท์
4. ทดสอบการหลอมโพรโทพลาสท์ โดยใช้สารเคมี เพื่อเป็นข้อมูลเปรียบเทียบ
5. ทำการตรวจสอบหาลูกผสมจากการทดลอง ในข้อ 3 และ ข้อ 4
6. สรุป