สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นและหาออกโซโทรฟิกมิวแตนท์ของเชื้อรา โมแนสคัส 4 สายพันธุ์ KB20M1 ,KB10M10.2, KB11304 และ KB10M16

นางสาว บุษกร สพช่อง
นางสาว พิมลรัตน์ พิทักษ์วงศาภรณ์
นางสาว มาริสา สำราญ

ป๗.
ม ๖๗๒ ก
๒๕๓๘
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....25398
วัน, เดือน, ปี.....9 ก.ค. ๒๕๓๙

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ.2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

STUDY ON PROTOPLAST FUSION AND AUXOTROPHIC MUTANT OF *MONASCUS* SP. KB11304 ,KB20M102, KB20M1 AND KB10M16.

Miss Busakorn Sopchong

Miss Pimolrat Pitakvongsaporn

Miss Marisa Samran

A special project submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of bachelor of science department of Applied Biology faculty of Science. King Mongut's Institute of Technology Ladkrabang1995.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นและการหา
ออกโซโทรฟิกมิวแตนท์ของเชื้อราไมแนสคัส 4 สายพันธุ์
KB20M1 KB11304 KB20M10.2 KB10M16

โดย นางสาว บุษกร สพช่อง
นางสาว พิมลรัตน์ พิทักษ์วงศาภรณ์
นางสาว มาริสา สำราญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(อาจารย์ อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ
(อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

---------- กรรมการ
(ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

---------- กรรมการ
(อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์ทวี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Study on protoplast fusion and Auxotrophic mutant of *Monascus* sp. KB 11304 , KB 20M1 , KB 10M16 and KB 20M10.2
Name	Miss Busakorn Sopchong Miss Pimolrat Pitakvongsaporn Miss Marisa Samran
Department	Applied Biology
Academic Year	1995

Abstract

Protoplast of *Monascus* sp. strain KB 11304 , KB 20M1 , KB 10M16 and KB 20M10.2 were isolated by using lysing enzyme 0.5,1,2 and 3 mg/ml in protoplast buffer solution (0.8M $MgSO_4.7H_2O$,0.2M sodium citrate,pH 5.5) .Wet mycelia 0.2-0.5 g/ml of enzyme solution gave high yields of protoplast (about 10^6-10^7 protoplast/ml) and the percentages of protoplast regereration in the four starins were 0.45 , 0.18,0.14 and 0.49 respectively

Studies on effects of amino acids in growth of the four strains of *Monascus* sp. found that KB 11304 and KB 20M1 were prototroph strains while KB 10M16 and KB 20M10.2 were adenine auxotrophic mutants. Protoplast fusion were made between KB 20M1 and the other three strains : KB 11304 ,KB 10M16 and KB 20M10.2 in polyethylene glycol 6000,30 % w/v detected by noticing auxotrophic mutants and quantities of DNA extracted . It was found that fusion frequencies were 76 ,57 and 60 % respectively, and the percentages of protoplast regeneration were 0.61,0.34 and 0.37 respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นและการหาออกโซโทรฟีกมิวแตนท์ของเชื้อราโมแนสคัส 4 สายพันธุ์ KB20M1 KB10M16 KB20M10.2 KB11304
นักศึกษา	นางสาว บุษกร สพช่อง
	นางสาว พิมลรัตน์ พิทักษ์วงศาภรณ์
	นางสาว มาริสา สำราญ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2539

บทคัดย่อ

การแยกโปรโตพลาสต์ ของ *Monascus* sp. สายพันธุ์ KB 11304 , KB 20 M 10.2 KB, 10 M 16 และ KB 20 M 1 โดย Lysing enzyme ความเข้มข้น 0.5 ,1,2และ 3 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ในสารละลาย บัฟเฟอร์ $MgSO_4$ $7H_2O$ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ ใน Sodium citrate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 พบว่า น้ำหนักเซลล์เปียก ประมาณ 0.2-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเอนไซม์ ให้ความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์สูงสุดเป็น 10^6-10^7เซลล์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการกลับมาเป็นเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์เป็น 0.45 ,0.18 ,0.14 และ 0.49 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

ได้มีการศึกษาผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของ *Momascus* sp. 4 สายพันธุ์นี้ พบว่า สายพันธุ์ KB 11304 และ KB 20M1 เป็นสายพันธุ์ Prototroph ส่วนสายพันธุ์ KB 10 M16 และ KB 20M 10.2 เป็นสายพันธุ์ Adenine auxotrophic mutant เมื่อทำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างสายพันธุ์เจริญเร็วแต่ไม่สร้างสี (KB 20M1) กับสายพันธุ์ที่สร้างสี ได้แก่ KB 11304 ,KB 20 M16 และ KB 20M10.2โดยใช้ Polyethylene glycol 6000 ความเข้มข้น 30% w/v สามารถหาความถี่ของการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ โดยอาศัยคุณสมบัติ ความเป็น Auxotrophic mutant และ ปริมาณ DNA พบว่า อัตราการหลอมรวมกันเป็น 76 , 57 และ 60เปอร์เซนต์ ตามลำดับ มีอัตราการเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ของสายพันธุ์ลูกผสมเป็น 0.6 , 0.34 และ 0.37 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานโครงงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ โดยได้รับความร่วมมือช่วยเหลือจากคณะบุคคลหลายฝ่ายด้วยกัน

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์ ได้ให้คำแนะนำปรึกษาและช่วยเหลือทางด้านอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ นิสา บุตรดา ที่ได้ช่วยให้คำแนะนำปรึกษา แทน อาจารย์ สมชาย ขณะที่อาจารย์ไปศึกษาต่อที่ประเทศญี่ปุ่นได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่ได้สละเวลาในการตรวจแก้ไขรายงานนี้ให้มีความสมบูรณ์ขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และ อาจารย์ พนา โลหะทรัพย์-ทวี ที่ได้สละเวลาในการตรวจแก้ไขรายงานนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ พี่ ประภัสสร โชคสงวนทรัพย์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทดลอง ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ได้ให้ความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี เป็นอย่างดี

ท้ายสุด งานวิจัยนี้จะสำเร็จไปไม่ได้ ถ้าขาดกำลังใจ บิดา มารดา อาจารย์ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้องๆ ทุกคน

1 มีนาคม 2539

คณะผู้จัดทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

บทที่		หน้า
1.	บทนำ.....	1
	-วัตถุประสงค์	
	-ขอบเขตการศึกษา	
	-ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	
2.	การตรวจเอกสาร.....	3
3.	อุปกรณ์และวิธีการ.....	57
	- อุปกรณ์	
	- วิธีการ	
4.	ผลการทดลอง.....	67
5.	สรุปผลและวิจารณ์.....	94
6.	เอกสารอ้างอิง.....	98
ภาคผนวก ก. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ		108
ภาคผนวก ข. สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี		110
ภาคผนวก ค. เอนไซม์และกรดอะมิโน		114

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แสดงการพัฒนาของ โอโอโกเนียม และ trichogyne ของ *Monascus barkeri* ที่กำลังขยาย 900 เท่า	6
2.	แสดงระยะการพัฒนาของโอโอโกเนียมใน *Monascus purpureus*	6
3.	แสดงการเกิดสาร 6-MSA	19
4.	แสดงโครงสร้างทางโมเลกุลของสารที่สกัดได้จากข้าวแดง *Manka*	22
5.	แสดง H-NMR Spectrum และสูตรโครงสร้างของสารสีเหลืองที่ได้	23
6.	แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส	24
7.	แสดงวิธีการเตรียมโปรโตพลาสต์พอเป็นสังเขป	30
8.	แสดงวิธีประเมินค่าความถี่ของการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ และความถี่ของการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์	45
9.	แสดงลักษณะเส้นใยและการสร้างสีของเชื้อราโมแนสคัส KB11304(1) KB20M1(2) KB10M16(3) KB20M10.2(4)	85
10.	แสดงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์หนึ่ง	85
11.	แสดงการเจริญของสายพันธุ์โปรโตโทรฟ KB20M1 ในอาหาร minimal media	86
12.	แสดงการเจริญของสายพันธุ์โปรโตโทรฟ KB11304 ในอาหาร synthetic minimal media	86
13.	แสดงการเจริญของ KB20M10.2 ในอาหาร synthetic minimal media ที่มีและไม่มีอะดีนินเป็นแหล่งไนโตรเจน	87
14.	แสดงการเจริญของ KB10M16 ในอาหาร synthetic minimal media ที่มีและไม่มีอะดีนินเป็นแหล่งไนโตรเจน	87
15.	แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 1 จากการหลอมรวมระหว่างของ *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB11304 บนอาหาร minimal media	88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่	หน้า
16. แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 2 จากการหลอมรวมระหว่าง ของ *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB11304 บนอาหาร minimal media	88
17. แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 3 จากการหลอมรวมระหว่าง ของ *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB11304 บนอาหาร minimal media	89
18. แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 4 จากการหลอมรวมระหว่าง ของ *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB11304 บนอาหาร minimal media	89
19. แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 5 จากการหลอมรวมระหว่าง ของ *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB11304 บนอาหาร minimal media	90
20. แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 6 จากการหลอมรวมระหว่าง ของ *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB11304 บนอาหาร minimal media	90
21. แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 7 จากการหลอมรวมระหว่าง ของ *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB11304 บนอาหาร minimal media	91
22. แสดงการเจริญของลูกผสม จากการหลอมรวมระหว่าง *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB20M10.2 บนอาหาร minimal media	91
23. แสดงการเจริญของลูกผสมจากการหลอมรวมระหว่าง *Monascus* sp. KB20M1 กับ KB10M16 บนอาหาร minimal media	92
24. แสดงการแยกโซน (sector)ของลูกผสม KB11304 กับ KB20M1 ในอาหาร minimal media .	92
25. แสดงกรดอะมิโน 20 ชนิด ที่ใช้ในการหา ออกโซโทรป มิวแตนท์	93

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงขนาดและรายละเอียดของโครงสร้างต่าง ๆ ในโมแนสคัส	5
2. แสดงคุณสมบัติที่แตกต่างกันของเชื้อราโมแนสคัส 3 ชนิด คือ *M.pilosus* ,*M.purpureus*และ *M.ruber*	8
3. แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกันในเชื้อราโมแนสคัสแต่ละกลุ่ม	9
4. แสดงสารละลายเกลืออนินทรีย์ที่ใช้เป็น osmotic stabilizer สำหรับเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* และ *Monascus*	33
5. แสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกรดอะมิโนต่อการเจริญใน *M.purpureus* เมื่อเติมสังกะสี 210ไมโครกรัมต่อลิตร	53
6. แสดงวิธีการใช้แยก heterokaryon ที่เกิดจากการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น	55
7. แสดงสูตรอาหารที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ กัน (1)	63
8. แสดงสูตรอาหารที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ กัน (2)	63
9. แสดงการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์กับอัตราการแยกโปรโตพลาสต์	67
10.แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ กันของเชื้อรา*Monascus*.sp KB11304	68
11.แสดงความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ทุก ๆ ชั่วโมงของ *Monascus*.sp KB11304	68
12.แสดงความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ทุก ๆ ชั่วโมงของ *Monascus*.sp KB10M16	69
13.แสดงความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ทุก ๆ ชั่วโมงของ *Monascus*.sp KB20M10.2	69
14.แสดงความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ทุก ๆ ชั่วโมงของ *Monascus*.sp KB20M1	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ **หน้า**

15. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์และจำนวนโคโลนีที่นับได้ของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ และลูกผสมทั้ง 3 คู่ 75

16. แสดงอัตราการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ และอัตราการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ของสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ลูกผสม 76

17. แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ในอาหาร minimal media ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน 77

18. แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ในอาหาร Synthetic minimal media 79

19. แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของสายพันธุ์ adenine auxotrophic mutant ในอาหาร Synthetic minimal media ที่มีอะดีนินและไม่มีอะดีนินเป็นแหล่งไนโตรเจน 80

20. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของสายพันธุ์ adenine auxotrophic mutant ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 81

21. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา *Monascus*.sp 2 สายพันธุ์ในอาหารที่ต่างกัน 81

22. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ *Monascus*.sp KB20M10.2 ในอาหารSynthetic minimal media ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ อะดีนิน กรดอะมิโนทั้งหมดยกเว้นอะดีนินและยีสต์แอกซ์แทรด เปรียบเทียบกับ การเจริญในอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโน เป็นแหล่งไนโตรเจน 82

23. แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ *Monascus*.sp KB10M16 ในอาหาร synthetic minimal media ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ได้แก่ อะดีนิน กรดอะมิโนทั้งหมด ยกเว้น อะดีนิน และ ยีสต์แอกซ์แทรด เปรียบเทียบกับ การเจริญในอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน 82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ **หน้า**

24. แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบระหว่าง ลูกผสม กับสายพันธุ์พ่อแม่ดั้งเดิม KB11304 KB20M1 83

25. แสดงขนาดเส้นใย ของลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ ดั้งเดิม KB11304 KB20M1 84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญกราฟ

กราฟที่	หน้าที่
1. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของไลซิ่งเอนไซม์ที่ 0.5 1, 2 และ3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp.KB11304	71
2. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของไลซิ่งเอนไซม์ที่ 0.5 1 ,2 และ3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp.KB 20M1	72
3. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของไลซิ่งเอนไซม์ที่ 0.5 1 ,2 และ3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp.KB 20M10.2	73
4. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของไลซิ่งเอนไซม์ที่ 0.5 1, 2 และ3 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp.KB10M16	74
5. แสดงกราฟมาตรฐานของคาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ	113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เชื้อรา *Monascus* sp. เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างสีได้เองตามธรรมชาติ และสีที่ได้มีความคงทนมากกว่าสีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี และมีความปลอดภัยมากกว่า โดยผ่านการยอมรับแล้วว่าไม่มีอันตรายในการนำมาใช้ แต่ปัญหาที่พบในการผลิตคือเรื่องของระยะเวลาการผลิตนาน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสีจากเชื้อราจึงได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีต่าง ๆ กัน เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ การกลายพันธุ์ การหาสภาวะที่เหมาะสม การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นเป็นอีกวิธีหนึ่งที่คาดว่าน่าจะประสบผลสำเร็จ โดยทำการผสมพันธุ์โมแนสคัสต่างสปีชีส์กัน(interspecific hybridization) ระหว่างสายพันธุ์ที่สร้างสีได้ดีแต่เจริญช้า กับสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสีแต่เจริญเร็ว ทั้งนี้ต้องอาศัยข้อมูลทาง auxotrophic mutant และการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากลูกผสม จึงจะสามารถแยกลูกผสมได้ ซึ่งคาดว่าน่าจะมีประโยชน์ในการศึกษาวิจัยในขั้นสูงต่อไป ลูกผสมที่ได้ควรเจริญเติบโตได้เร็วและสร้างสีได้มากขึ้นหลังจากมีการหลอมรวมยีนเข้าด้วยกัน โดยจะเป็นประโยชน์ในการผลิตสีผสมอาหารเพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปอีกในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความต้องการกรดอะมิโนของเชื้อรา *Monascus* sp. ก่อนและหลังการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น
2. เพื่อศึกษาอัตราการกลับมาเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์
3. เพื่อเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับลูกผสมที่ได้ในการสร้างสี
4. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำโปรโตพลาสต์
5. เพื่อหาอัตราการหลอมรวมเซลล์ของโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของการศึกษา

1. ทำการแยกโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp.
2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์
3. หาอัตราการกลับเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์
4. ทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น 3 คู่
5. หาอัตราการหลอมรวมเซลล์ของโปรโตพลาสต์
6. หาความต้องการกรดอะมิโนของเชื้อราก่อนและหลังการทำโปรโตพลาสต์
7. แยกลูกผสมที่ได้เก็บไว้ในการศึกษาขั้นสูงต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสีของเชื้อรา *Monascus* sp.
2. ทราบผลกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์
3. ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการทำโปรโตพลาสต์
4. ทำให้ทราบเทคนิคในการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น
5. ทำให้ทราบวิธีวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอในลูกผสมที่ได้
6. เชื้อราที่ได้สามารถผลิตสีได้ดีและเจริญเติบโตเร็วมาก ทำให้เหมาะสมกับการนำไปผลิตสีระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1.การจัดจำแนกและประวัติของเชื้อรา *Monascus* sp.

1.1 การจัดจำแนกของเชื้อรา *Monascus* sp.

เชื้อราโมแนสคัสสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (Alexopoulos และ Mims,1979)

Class	Ascomycetes
Subclass	Plectomycetidae
Order	Eurtials
Genus	Monascus

1.2 ประวัติและความสำคัญของเชื้อราโมแนสคัส

Monascus purpureus เป็นเชื้อราที่ค้นพบครั้งแรกในปี คศ. 1884 โดย Van Tieghem(Carels และ Shepherd, 1975) แบ่งเป็น 4 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสรีรวิทยา และความสามารถ ในการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ ***Monascus pilosus*** ***Monascus purpureus*** ***Monascus ruber*** (Hawksworth และ Pitt,1983) และ ***Monascus floridanas*** (Bridge และ Hawksworth,1985 : Barmard และ Cannon,1987) และสามารถเจริญได้ดีในอาหารแข็งในรูปของข้าวแดง เพื่อใช้ปรุงแต่งสีในไวน์ เต้าหู้ยี้ ใช้ถนอมอาหารประเภทเนื้อ ใช้รักษาโรครวมทั้งใช้เป็นสีผสมในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง ต่อมาได้ผลิตเป็นการค้าในประเทศญี่ปุ่น ไต้หวัน และจีน (Hendry และ Houghton, 1992) ***Monascus barkari*** ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ที่รู้จักกันดีในประเทศจีนว่า samsu ต่อมาเริ่มมีการทดลองเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลวในปี 1973 โดย Lin ได้แยกเชื้อราจากข้าวแดงจากประเทศต่าง ๆ ในแถบเอเชียใต้ และพบว่าเชื้อราเหล่านี้สร้างสารสีในอาหารเหลวได้ดีเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมาได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อราเพื่อให้ประสิทธิภาพในการสร้างสารสีเพิ่มขึ้น โดย ใช้สารก่อการกลายพันธุ์ (mutagen) หรือใช้รังสีต่าง ๆ (Lin และSuen, 1973 ; Wong และ Bau, 1997 ; Hiroi และคณะ,1979; Su และ Huang, 1980;Yongsmith และคณะ,1990) การใช้เทคนิคโปรโตรพลาสต์ฟิวชั่น (Kiyohara และคณะ,1990) ปรับปรุงกรรมวิธีในการเลี้ยงเชื้อทั้งแบบครั้งคราว (batch culture) แบบป้อนอาหาร(fed-batch culture) (สมชาย,2536 ; Mak และคณะ,1990) และใช้วิธีการตรึงเซลล์ (Evans และ Wang,1984)

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราโมแนสคัสยังสร้างสารต่อต้านแบคทีเรีย พบในปี 1977 โดย Wong และ Bau โดยได้มีรายงานว่า เชื้อรา *M.purpureus* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร เช่น *Bacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น สารนี้คือ monascidin A นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์ โคเอนไซม์ เอทธานอล สารโมนาโคลิน(monacolins) ที่ใช้ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล สารลดความดันโลหิต และสารช่วยในการตกตะกอน อีกด้วย (Fink-Gremmels และ Leistner,1989)

2.ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราโมแนสคัส

เชื้อราโมแนสคัสอยู่ใน Class Ascomycetes เส้นใยแตกแขนงมาก และมีผนังกั้น (septate) เส้นใยมีสีแดงเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ คือสร้างสปอร์ และสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างโคนิเดีย รูปร่างกลมหรือรูปไข่อาจมี 1 หรือหลายโคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่อยู่ที่ปลายเส้นใย โคนิเดียมักไม่มีสี แต่เมื่ออายุมากขึ้นอาจมีสีแดงหรือสีน้ำตาลอ่อน (Ainswarth และคณะ ,1973; Hawksworth และ Pitt,1983)

Cole และ Kendrick(1986) อธิบายว่าโคนิเดียของเชื้อรา *M.ruber* เกิดจากเส้นใยที่เรียกว่า conidiophores ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นเส้นใยตรงๆ หรือโค้งงอก็ได้ เมื่อเริ่มสร้างโคนิเดียปลายเส้นใยจะพองออกแล้วสร้างผนังกั้นระหว่างโคนิเดียกับเส้นใย หลังจากนั้นประมาณ 5 ชั่วโมง เส้นใยโคนิเดียอันแรกมีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พองออก อย่างรวดเร็ว แล้วสร้างผนังกั้นได้เป็นโคนิเดียอันที่สอง เป็นเช่นนี้เรื่อยๆ จนได้โคนิเดียต่อกันเป็นลูกโซ่ โคนิเดียแต่ละอันเกิดจากบริเวณ meristematic zone ซึ่งถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อโคนิเดียที่เกิดขึ้นก่อนเสร็จสมบูรณ์ โดยบริเวณดังกล่าวอยู่ใต้โคนิเดียที่เกิดขึ้นก่อนหน้าเพื่อใช้สร้างโคนิเดียอันถัดมา สายของโคนิเดียจะยาวขึ้น ขณะที่ conidiophore สั้นลง

ตารางที่ 1 แสดงขนาดและรายละเอียดของโครงสร้างต่าง ๆ ในโมแนสคัส

ที่มา :Hawksworth และ Pitt(1983)

โครงสร้าง	ขนาด และรายละเอียดของโครงสร้าง *Monascus* sp. KB113
conidia	ยาว 6.25-11.25ไมครอน กว้าง 7.511.25 ไมครอน ลักษณะ obpyriform globoseมีรอยตัดที่ฐาน ผนังเรียบ
cleistothecia	ขนาดกว้าง 45.0-62.5 ไมครอน ยาว 45.0-70 ไมครอน ลักษณะ globose เกิดขึ้นอันเดียว บนก้านชู (stalk)
ascospore	ขนาดกว้าง 2.5-3.7 ไมครอนยาว 2.5-5.0ไมครอน ลักษณะรูปไข่ (ellipsoid) ผนังเรียบ
mycelium	2.5-5.0 ไมครอน เส้นใยแตกกิ่งก้าน ผนังใส

เชื้อราโมแนสคัสสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual organs) คือ perithecium หรือ cleistothecium บนก้านชู (stalk) มีลักษณะเป็น homothallic ใน *M.purpureus* และ *M.ruber* เส้นใยแตกกิ่ง-

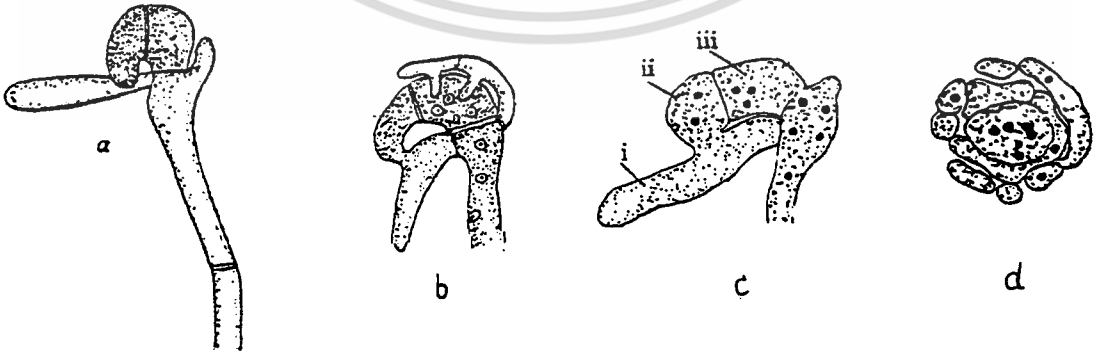
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก้านสาขาเมื่อตัดดูจะมีรูปร่างเล็ก ปลายเซลล์จะเรียวยาวและโค้งเข้ามาหาด้านข้าง ทำให้เกิดเป็น antheridium ดูรูปที่ 1 และมีการเจริญเติบโตขยายตัวแบ่งตัวจาก

รูปที่ 1 แสดงการพัฒนาของ oogonium antheridium และ trichogyne ของ *Monascus barkeri* ที่กำลังขยาย 900 เท่า

ที่มา :H.C.I. Gwypnne (1987)

หนึ่งเป็นสองของเซลล์ที่อยู่ด้านข้างรองจากอันสุดท้าย ซึ่งจะกลายเป็น trichogyne และ oogonium โดย oogonium จะประกอบด้วย นิวเคลียส 4 ถึง 6 อัน ส่วนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือ antheridium จะมีนิวเคลียส 3 หรือ 4 อัน นิวเคลียสจะเกิดการหลอมรวมกันระหว่าง antheridium กับ trichogyne และนิวเคลียสของตัวผู้จะเคลื่อนที่ผ่าน trichogyne ไปยัง oogonium ซึ่ง oogonium จะเป็นที่ที่นิวเคลียสของตัวผู้ไปจับคู่กับนิวเคลียสของตัวเมีย ดูรูปที่ 2



รูปที่ 2 ระยะ a และ b เป็นการพัฒนาของ oogonium ของ *M.purpureus* ส่วน c เป็นนิวเคลียสของเพศผู้ใน trichogyne I คือ antheridium II คือ trichogyne III คือ oogonium d เป็นคู่ของนิวคลีไอด์ใน oogonium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้น oogonium จะใหญ่ขึ้นและเจริญเติบโตขึ้น โดยพบว่าจะยังไม่มีผนังกั้นในเส้นใยที่มีเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียอยู่หรือ ascogonium ขณะที่ antheridium และ trigchogyne ถูก degenerate การเก็บเกี่ยวเส้นใยที่เจริญเติบโตขึ้น จะอยู่ในรูปที่มี sheath ห่อหุ้ม ภายในมี ascospores อยู่เป็นกลุ่มแบบอิสระ sheath จะห่อหุ้มสปอร์ทำให้มีรูปร่างเป็น ascus ที่ใหญ่ขึ้นเพียงอันเดียว

เส้นใยบริเวณส่วนบนของ ascogonium จะพัฒนาไปเป็น trichogene เชื่อมต่อกับ antheridium เพื่อให้นิวเคลียสผ่านเข้าไปผสมกับนิวเคลียสของ ascogonium หลังจากผสมกันแล้ว ascogonium มีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีการสร้างผนังขึ้นมาล้อมรอบ 1-2 ชั้น ก่อนจะพัฒนาไปเป็น perithecium หรือ cleistothecium เมื่อถึงขั้นนี้ผนังของ asci จะสลายไป พบแต่ ascospore จำนวนแตกต่างกันไปภายใน cleistothecium มักพบว่าผนังของ cleistothecium จะแตกออกเพื่อปล่อย ascospore ออกมาในทิศทางตรงกันข้ามกับก้านชู ระยะเวลาการเกิด ascospore ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ จะเริ่มพบ cleistothecium ในอาหารเหลวเมื่อเชื้อรามีอายุ 24-48 ชั่วโมงและพัฒนาเป็น ascospore อย่างสมบูรณ์ เมื่ออายุการเลี้ยงเชื้อได้ 96 ชั่วโมง(Carels และ Shepherd,1975 ; Kolotila และคณะ ,1978; Su และ Huang,1980)

Lin และ Suen (1973) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ R-1 และ S-11 ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ของ *Monascus* sp. F-2 ด้วยสาร NTG จะสร้างสารสีแดงและสีเหลืองได้ดี แต่เจริญช้าและสร้างสปอร์น้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 33.33 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทดลองของ Lin และ Iizuka (1982) ที่พบว่าการเจริญของ *M.kaoliang* สายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ดี จะขาดคุณสมบัติในการสร้าง ascospore และ perithecia สร้างโคนิเดียขนาดเล็ก และจำนวนน้อยกว่าสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ต่ำ

Wong และ Bau (1978)ศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *M.purpureus* สายพันธุ์กลาย พบว่าสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีหรือสร้างได้เพียงเล็กน้อย จะเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เร็วกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร malt extract agar จะสร้างโคนิเดียจำนวนมาก และสร้าง cleistothecium ที่ไม่สร้าง ascospore เรียกว่า protocleistothecium ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่สร้าง cleistothecium ที่สมบูรณ์ได้จำนวนมาก สำหรับลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารสีจะมีผนังหนามาก และแตกแขนงน้อย ส่วนสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้ดีจะมีเส้นใยที่บอบบาง และแตกแขนงมาก

Hawksworth และ Pitt(1983) แบ่งเชื้อราโมแนสคัสออกเป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ czapek yeast extract agar (CYA) malt extract agar (MEA) และ 25เปอร์เซ็นต์ glycerol nitrate agar (G25N) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และลักษณะการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราได้เป็น 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงคุณสมบัติที่แตกต่างกันของเชื้อโมแนสคัส 3 ชนิด คือ *M. pilosus M.purpureus* และ *M.ruber*

M.pilosus	*M.purpureus*	*M.ruber*
เจริญบนอาหาร CYA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่า 37 องศาเซลเซียส	เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	เจริญได้ทั้งที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกัน
สร้างสารสีแดงบนโคโลนี โคนิเดียต่อกันเป็นสายสั้นๆ สร้าง cleistothecia ไม่มีสี ขนาดเล็กกว่า ascospore มีลักษณะสั้นและแคบกว่า	เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดได้ช้ากว่า สร้างสีส้มหรือสีแดงบนอาหาร CYA และ MEAสร้าง ascospore มากกว่า *M.ruber*	สร้างสีน้ำตาลอ่อนบนโคโลนี โคนิเดียมีลักษณะกลมต่อกันเป็นสายยาว สร้างcleistothecia สีน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเชื้อราทั้ง 3 กลุ่มสามารถเจริญในอาหารที่มีแหล่ง ไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ได้ดีกว่า สารอนินทรีย์ ต้องการอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกัน

สมชาย(2536)เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์กลายพันธุ์ KB20M10.2 ซึ่ง สร้างสารสีเหลืองได้ที่พีเอชเป็นกลาง เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 ซึ่งสร้างสารสีแดง บนอาหารแข็ง 4 ชนิด คือ PDA GYP SS และ MYS agar พบว่าสายพันธุ์พ่อแม่เจริญได้เร็ว และให้เส้นใยลักษณะฟูบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ขณะที่เชื้อรากลายพันธุ์ KB20M10.2 เจริญช้าสร้างเส้นใยสั้น ๆ ติดกับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบการเจริญน้อยมากบนอาหาร PDA agar ส่วนการเจริญภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ให้ลักษณะการเจริญ ขนาดของเส้นใย โดนิเดีย และ cleistothecium ใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 3 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ที่แตกต่างกันในเชื้อราโมแนสคัสแต่ละกลุ่ม

กิจกรรมเอนไซม์	*M.foridans*	*M.pilosus*	*M.purpureus*	*M.ruber*
Valine arylamidase	-	+	+	+
Cystine arylamidase	-	-	+	-
Trypsinase	+	-	-	-
α-galactosidase	-	+	-	+
β-galactosidase	-	+	-	-
α-glucosidase	-	+	-	-
Polypectase pH 6.0	-	-	+	-
Cellulose hydrolyase	-	-	-	+

ใช้ API ZYM strip tests ทดสอบกับเชื้อราที่มีอายุ 14 วัน

ที่มา : Bridge และ Hawksworth (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ประวัติการใช้เชื้อรา *Monascus sp.*

ข้าวแดงหรือยั่งคัก เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส บนข้าวนึ่งบ่มที่อุณหภูมิและความชื้นเหมาะสม รู้จักกันมาช้านานในประเทศจีน และประเทศแถบเอเชียใต้ เช่น ไต้หวัน มาเลเซีย ฮ่องกง ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และอินโดนีเซีย เป็นต้น โดยพบว่าเชื้อราสามารถย่อยข้าวจนนุ่ม และขณะเดียวกันก็จะสร้างสีแดงเข้มขึ้น ข้าวแดงมีชื่อเรียกต่าง ๆ กันมากมาย คือ ข้าวแดง(red rice) ข้าวแดงจากจีน (chinese red rice) อังคัก (ang-kak) แอนแคก (ankak) แองคา (anka) อังเคยะ (angquac)เบนนิ-โคจิ(beni-koji) และ อกา-โคจิ (aga-koji) (Hesseltine,1965)

Church (1920) กล่าวว่า การผลิตข้าวแดงมีมาช้านานแล้วในประเทศจีน โดยมีการแยกเชื้อที่ได้จากประเทศจีนพบว่า เชื้อราที่ให้สีแดง คือ ***Monascus purpureus*** Palo และคณะ (1960) นักวิทยาศาสตร์ชาวฟิลิปปินส์ ได้ทดลองใช้เชื้อข้าวแดง ทำการปรับปรุงจนได้ข้าวแดงที่มีคุณภาพพอสมควร โดยใช้เชื้อราแดงและสับสเตรทที่เหมาะสม

Lin และ Iizuka (1982) ศึกษาการสร้างสารสีนอกเซลล์ ของเชื้อราสกลายพันธุ์ ***M.kaoliang*** R-10847 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่าสายพันธุ์ R-10847 สร้างสารสีได้ดีมากบนอาหารแข็งเกือบทุกชนิด โดยเฉพาะ mantou meal ให้ปริมาณสารสีสูงสุด 3852.8 และ 4816.9 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ให้ปริมาณสารสีเพียง 62.2 และ 74.4 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้งที่ความยาวคลื่น 400 และ500 นาโนเมตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อราโมแนสคัส

3.1.1การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักแห้ง (Solid cultivation)

การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักแห้ง (solid cultivation) เชื้อราที่เจริญสามารถสร้างสารสีออกมานอกเซลล์ได้มาก ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สารสี จึงสร้างสารสีได้สูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (Johns และ Stuart,1991) การสร้างสารสีนอกเซลล์ได้มากขึ้นเป็นผลมาจากความสามาถในการปล่อยสารสีออกนอกเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ และสมดุลย์กับสารสีที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์

ดังนั้นการผลิตข้าวแดงให้มีคุณภาพดี ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญหลายประการ ได้แก่ สายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์เชื้อรา และสภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ ความชื้นเริ่มต้นที่ต่ำเกินไปทำให้เชื้อราเจริญและสร้างสารสีลดลง แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงเกินไป ทำให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์กลูโคอมิเลส(glucoamylase) เป็นไปได้ดี จึงมีการสะสมกลูโคสมากขึ้น และนำไปใช้ในการผลิตเอทธานอลแทนการผลิตสารสี ดังนั้นปริมาณกลูโคสที่สูงเกินไปจะยับยั้งการสังเคราะห์สารสีนั่นเอง

Lotong และ Suwanarit (1990) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตข้าวแดงของเชื้อรา *Monascus* sp. NP1 ในถุงพลาสติกคือ 32.6 เปอร์เซ็นต์ และที่ความชื้นเริ่มต้น 39.6 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้การสร้างสารสีลดลง

Han(1990a) คัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. จำนวน 13 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 125 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาการสร้างสารสีบนข้าว พบว่า *M.purpurcus* ATCC 16365 สร้างสารสีดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้น 5.0-6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

Johns และ Stuart(1991) พบว่าเชื้อรา *M.purpureus* จะสร้างสารสีได้น้อยเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 38.0-39.0 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าความชื้นเริ่มต้นสูงขึ้นเป็น 56.0 เปอร์เซ็นต์ และพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6.0 การสร้างสารสีจะเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chiu และ Chan(1992) ศึกษาการสร้างสารสีของเชื้อรา *M. purpureus* บนวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือชานอ้อย โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงเชื้อบนขวดหมุน (roller bottle) ความเร็ว 2 รอบต่อนาที กับตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ พบว่าการใช้ระบบขวดหมุน เชื้อราจะสร้างสารสีเหลืองได้ดีกว่าตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ ประมาณ 2-3 เท่า แต่ก็ยังให้สารสีน้อยกว่าในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย กลูโคส เปปโตน และยีสต์เอกซ์แทรค นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมน้ำมันข้าวโพด ปริมาตร 6.0 เปอร์เซ็นต์(ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว ทำให้การสร้างสารสีนอกเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 2 เท่า แต่การเจริญลดลง

เชิดชัย และคณะ (2519) พบว่าความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดงของ *M.purpureus* K001 บนเมล็ดข้าว คือ 60.0 เปอร์เซ็นต์ การเขย่าหรือให้อากาศช่วยให้เชื้อราสร้างสารสีแดงได้ดีและเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในเมล็ดข้าว มีเพียงพอต่อการสร้างสารสีอยู่แล้ว การเติมเปปโตนเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไม่มีผลใด ๆ ต่อการสร้างสารสีเลย

พลายแก้ว และ บุษบา (2534ก) ศึกษาผลของวัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ต่อการเจริญการสร้างสารสีและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *M.kaoliang* พบว่าขนมปังให้ปริมาณสารสีมากที่สุด เท่ากับ 862 หน่วย ต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่าง และ สร้างสปอร์ได้ดีพอสมควร ส่วนมันฝรั่งและปลายข้าวหอมมะลิให้ปริมาณสารสีได้ดีรองลงมา เท่ากับ 502 และ 317 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักตัวอย่างตามลำดับ สำหรับการสร้างสปอร์ดีที่สุดเมื่อใช้ถั่วเหลืองเป็นสับสเตรทรองลงมาคือ ถั่วเขียว และขนมปัง ต่อมาได้ศึกษาสภาพของวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา *M.kaoliang* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารสีแดงดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร พบว่าเมื่อใช้วลาแช่ข้าวนาน 9 ชั่วโมง และสะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5-10 นาที ทำให้ข้าวมีความชื้นเริ่มต้นประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการสร้างสารสีแดง สารสีเหลือง และสร้างสปอร์ของเชื้อรามากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่ข้าวในสารละลายกรด ไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลต่อการสร้างสารสีเหลือง หรือสร้างสปอร์ของเชื้อรา *M.barkari* (พลายแก้ว และบุษบา,2534ข)

3.1.2 การเลี้ยงเชื้อราในสภาพหมักเปียก (submerged cultivation)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสีในการเลี้ยงเชื้อราแบบนี้มีดังนี้

3.1.2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.2.1.1 แหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน

แหล่งคาร์บอนที่ใช้กันคือ กาแลคโตส มอลโตส เอทิลแอลกอฮอล์

Lilly และ Bernett(1962) รายงานว่า ฟรุคโตส กลูโคส และน้ำตาล invert sugar จะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี สำหรับการเจริญเติบโตของ *M.purpureus* และเป็นการเพิ่มอัตราการเจริญถ้าหากว่ามี ซูโครสกับฟรุคโตสหรือกลูโคส ในอาหาร จะทำให้อัตราการเจริญสูงขึ้นถ้าใช้น้ำตาลสองชนิด และดีกว่าน้ำตาล monosaccharide เพียงชนิดเดียว

Mchan และJohnson(1970)ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *M.purpureus* ในอาหารเหลวที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงาน พบว่ากลูโคสเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ให้การเจริญสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อที่พีเอชเริ่มต้น 6.25 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Lin (1973) คัดเลือกเชื้อราที่เจริญได้ดีในอาหารเหลวจากโคจิที่ใช้ทำเหล้าเกาเหลียง พบว่า *Monascus* F-2 สามารถใช้คาร์บอนเป็นแหล่งอาหารได้หลายชนิด และอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสี คือ แป้ง น้ำตาลกาแลคโตส และมอลโตส ตามลำดับ

Johnson และ Mchan (1970) กล่าวว่า การเติมสังกะสีกับกรดอะมิโน เช่น ไกลซีน แอลลิวซีน และแอลทริฟโทเฟน จะเพิ่มการเจริญของ *M. purpureus* และเพิ่มการใช้อาหารคาร์บอนได้มากขึ้นกว่าที่จะเติมกรดอะมิโนทั้งสาม หรือเติมสังกะสีเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Johnson และ Mchan (1975) พบว่าการเติมสังกะสี 800 ไมโครกรัมต่อลิตร จะเพิ่มการเจริญของเส้นใย และเพิ่มความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนได้มากขึ้น

Su และ Huang (1980) พบว่า *M.anka* V-204 ให้ปริมาณสารสีต่อน้ำหนักแห้งสูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในแป้งข้าวเจ้า 5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสีส่วนใหญ่จะเก็บไว้ในเซลล์ เท่ากับ 109.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีเพียง 9.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ปล่อยออกนอกเซลล์

Broder และ Koehler(1980)พบว่าเชื้อรา *M.purpureus* NRRL2897 สร้างสารสีแดงดีที่สุดในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลมอลโตสเข้มข้น10.0 เปอร์เซ็นต์

Wongและคณะ(1981)ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนคือกลูโคส และแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมไนเตรต ต่อการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา *M.purpureus* N11S พบว่าเมื่อใช้กลูโคส 40.0 กรัมต่อลิตร จะใช้แอมโมเนียมไนเตรทเพียง 0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญและการสร้างสารสี เมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงขึ้น ความต้องการแหล่งไนโตรเจนก็จะมากขึ้นด้วย

Lin และ Demain(1991)พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อรา *Monascus sp.* TTWMB6042 ในอาหารเหลวชนิด defined medium ที่ใช้เด็กตรินเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดีที่สุด รองลงมา ได้แก่ แป้ง กลูโคส มอลโตส และฟรุคโตส แต่ไม่พบการเจริญในกาแลคโตส แลคโตส และซูโครส

Yongsmith และคณะ(1993) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp. KB10 ซึ่งสร้างสารสีเหลืองได้ดีที่พีเอชเริ่มต้น 2.5 เจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ แต่สร้างสารสีเหลืองดีที่สุดเท่ากับ 78 และ 74 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 4.0 และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

วรรณภา(2529) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp.KB21035, KB20322 และ KB11304 สร้างสารสีแดงนอกเซลล์ได้ดีเท่ากับ 70.07, 51.30 และ 98.50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 2.0, 2.5 และ3.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

สุภาพร(2531) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Monaus* sp. KB11304 โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลายพันธุ์ และรังสีต่าง ๆ พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 และ KBN4069 สามารถสร้างสารสีแดงได้ดีขึ้น และเมื่อศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อ การสร้างสีแดงตั้งแต่ 0-5.0 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ KBN4069 ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ ในการสร้างสารสีแดงได้ดี เช่นเดียวกับสายพันธุ์พ่อแม่ KB11304 ขณะที่เชื้อรากลายพันธุ์ KBU2069 สร้างสารสีแดงได้ใกล้เคียงกันที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 3.0 และ 4.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ บนอาหารวุ้น minimal medium คือ แซคคาโลส มอลโตส และแป้งมันสำปะหลัง แต่เจริญได้เพียงเล็กน้อยในกาแลคโตส

สมชาย (2536) คัดเลือกเชื้อรา *Monascus* sp. KB20M10.2 ที่สร้างสารสีเหลืองในอาหารพีเอชเป็นกลาง พบว่าเจริญได้ดีในแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น แลคโตส หรือ ซูโครส แต่สร้างสารสีเหลืองได้ดีในน้ำตาลหลายโมเลกุล เช่นแป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวเจ้า soluble starch และแป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น เมื่อเลือกใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลือง คือ 3.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ 4.0 เปอร์เซ็นต์

Wong(1981)พบว่าถ้ามีปริมาณคาร์บอนในอาหารเพิ่มขึ้น ความต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตจะเพิ่มขึ้น โดย เชื้อ *M.purpureus* ที่ใช้ทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด เมื่อใช้กลูโคส 200 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 5-10 กรัมต่อลิตร และพบว่าถ้าขาดคาร์บอนในอาหารจะไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ nitrate reductase และ glutamate dehydrogenase ซึ่งคาดว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมไนโตรเจนและวิถี metabolism

3.1.2.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน มีผลต่อการเจริญ การสร้างสารสี และชนิดของสารสีที่เชื้อราสร้างขึ้น

Lin (1973) พบว่า *Monascus sp.*F-2 ใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลายชนิดในการสร้างสารสีแดงได้แก่โพแทสเซียมไนเตรท โซเดียมไนเตรทและ โมโนโซเดียมกลูตาเมต ส่วนเปปโตนและยีสต์เอกซ์แทรคไม่เหมาะจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับสร้างสารสีแดง

Carels และ Shepherd(1977) และ Shepherd(1977) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสร้างสารสี และสปอร์ของเชื้อรา *Monascus sp.* พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์เอกซ์แทรคเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราจะผลิตสีแดงอย่างเดียว ที่พีเอช 6.5 เนื่องจากอาหารนี้มีกรดอะมิโนมากพอภายหลังจากที่เชื้อเจริญทำให้พีเอชสูงขึ้น pigment สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระ และกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใยเปลี่ยนเป็นพวก amino derivative ได้ และไม่พบสีส้มหรือสีเหลือง ส่วนอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรท จะได้ pigment สีแดงและสีส้ม เนื่องจากอาหารนี้ไม่มีกรดอะมิโนอิสระถึงแม้พีเอชจะสูงขึ้น pigment จะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนหรือ NH-group ภายในเส้นใยได้เท่านั้น จึงทำให้ pigment สีส้มยังเหลืออยู่ ขณะที่อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น แอมโมเนียมคลอไรท์ และแอมโมเนียมไนเตรท จะทำให้พีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือ 2.5 เป็นผลทำให้ pigment ที่ผลิตได้ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ NH-group ภายในเส้นใยได้ ผลคือจะมีการสะสมของ monascorubrin และ rubropunctatin ได้เป็นสีส้ม การเจริญของบางสายพันธุ์ในอาหารนี้ได้ pigment สีเหลือง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ monascorubrin หรือ rubropunctatin กับ hydrogen peroxide ได้เป็น monascin หรือ ankaflavin ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 5.0-10.0 กรัมต่อลิตรของแอมโมเนียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ไนเตรท จะให้อัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ และการสร้างสี เนื่องจากแอมโมเนียมในอาหารจะไปรีดิวซ์การทำงานของเอนไซม์ ไนเตรทรีดักเตรส(nitrate reductase) ดังนั้นจะเป็นการลดความสามารถในการดูดซึมไนเตรท แต่พบว่าแอมโมเนียมไอออนสามารถแพร่กระจายได้เร็วมากกว่าภายในเซลล์และสังเคราะห์ได้เร็ว ดังนั้นแสดงว่าจะไม่มีผลยับยั้งการเจริญ ถ้าใช้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ

Wong และคณะ(1981) พบว่าไนเตรทกระตุ้นการสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ขณะที่แอมโมเนียมจะยับยั้งการสร้างสปอร์

Wong(1981) ได้ทดลองและพบว่า กลูโคสที่ความเข้มข้นระหว่าง 40-200 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมไนเตรท ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 กรัมต่อลิตร จะทำให้ *M.purpureus* ผลิตสีแดงได้ดี แต่ถ้าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทสูงมากกว่า 50 กรัมต่อลิตรจะยับยั้งการเจริญและการผลิตสี

Lin และ Demain (1991) พบว่าเชื้อรา *Monascus* sp.TTWMB6042 เจริญได้ดีในแอมโมเนียมคลอไรท์ แอมโมเนียมไนเตรทและโมโนโซเดียมกลูตาเมต ขณะที่สร้างสารสีได้ดีในโมโนโซเดียมกลูตาเมทความเข้มข้น 1.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ร่วมกับน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 10.0 เปอร์เซ็นต์

Yongsmith และคณะ (1993) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ยีสต์เอกซ์แทรค เปปโตน และมอลท์เอกซ์แทรค ต่อการเจริญและการสร้างสารสีของเชื้อรา *Monascus* sp.KB10 พบว่าเปปโตนกระตุ้นการสร้างสารสีโดยตรง แต่ยับยั้งการเจริญและการสร้างสารสีน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของวรรณภา(2529) และ สมชาย(2536) และพบว่าเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกรดกลูตามิกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ สร้างสารสีเหลืองได้สูงถึง 86.0 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่เมื่อใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวจะสร้างสารสีเหลืองเพียง 40.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

สมชาย (2536) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองของเชื้อราโมแนสคัสสายพันธุ์ KM20M10.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนประเภท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25398

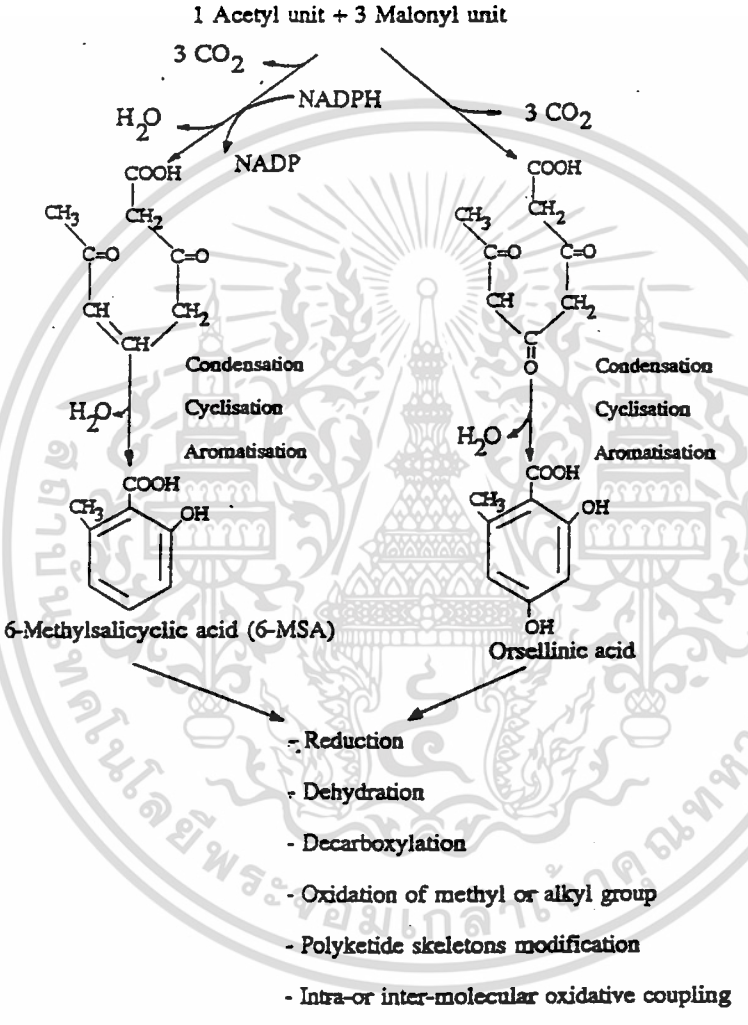
สารอนินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองได้ดีที่สุดคือโปแทสเซียมไนเตรท เท่ากับ 21.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือแคลเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และโซเดียม-ไนเตรท ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนประเภทสารอินทรีย์ที่ให้สารสีเหลืองสูงที่สุด คือ แป้งถั่วเหลือง เท่ากับ 674.2 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็นเปปโตน บีฟเอกซ์แทรค ยีสต์เอกซ์แทรค และมอลท์เอกซ์แทรค ได้ปริมาณสารสีเหลือง 434.7 392.5, 211.7 และ 20.7 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการสร้างสารสีเหลืองมากที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้น 4.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส

4.1 สาร polyketide

สารสีจากเชื้อราโมแนสคัส เป็นสารประเภท polyketide ที่เกิดจากการรวมตัว (condensation) ของ acetyl unit 1 หน่วย กับ malonyl unit 3 หน่วยขึ้นไป ได้เป็น primer หรือ starter และปล่อย คาร์บอนไดออกไซด์ออกมา การสังเคราะห์สาร polyketide นั้นสายของ polyketide จะยาวขึ้นตามจำนวนของคาร์บอน 2 หน่วยที่มาจาก malonyl unit ที่ถูกเติมเข้าไปในสาย primer เกิดเป็น triketide pentaketide และ polyketide ตามลำดับ ต่อจากนั้นเกิดปฏิกิริยา cyclisation และ aromatisation ได้เป็นสาร 6-methylsalicylic acid หรือ orsellinic acid ซึ่งเป็นสาร tatraketide เริ่มต้นที่จะนำไปสู่การสังเคราะห์สาร polyketide อื่น ๆ ต่อไป เมื่อได้สารเริ่มต้นแล้วปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้นต่อไป ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์นั้นๆ เช่น อาจมีการเติมหรือดึงออกซิเจนออกจากโครงสร้างของสาร เกิดปฏิกิริยา decarboxylation หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงรูปหรือโยกย้ายหมู่ต่าง ๆ ภายในโมเลกุลของสาร เกิด intra- หรือ inter-molecular oxidative coupling ทำให้เกิดพันธะระหว่าง C-C หรือ C=O เป็นต้น แสดงในรูปที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 แสดงการเกิดสาร 6-MSA และ orsellinic acid จาก acetyl และ malonyl unit

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zamir(1980) และ Turner(1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 สารสีที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส

สารสีของเชื้อราโมแนสคัสประกอบด้วย องค์ประกอบสารอย่างน้อย 6 ชนิดด้วยกัน เช่น monascorubrin และ rubropunctatin ถือว่าเป็นตัวเริ่มต้นของชีวสังเคราะห์ ขณะที่สารสีเหลืองหรือ monascin และ ankaflavin และสารสีแดงของ monascoramin และ rubropunctamine จะได้มาจากสารสีส้มอีกที

โดยสารสีเหล่านี้เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่เชื้อราสร้างขึ้นพร้อม ๆ กับการเจริญ (growth associated) หรือสร้างหลังจากการเจริญหยุดลงแล้ว (non-growth associtated) มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารในกลุ่ม Azaphilones เช่น sclerotiorin และ rotiorin(Birch และคณะ,1958; Nakanishi และคณะ,1959)

Haws และคณะ (1959) พบว่าเมื่อนำเส้นใยที่ได้จากการเจริญของเชื้อรา *Monascus rubropunctatus Sato* ในอาหารเหลว czapek dox อายุ 14-20 วัน มาสกัดด้วย light petroleum และ อีเทอร์ จะได้สารสีส้มของ rubropunctatin ($C_{21}H_{22}O_5$) และสารสีเหลืองของ monascin ($C_{21}H_{26}O_5$) สารสีส้ม rubropunctatin ละลายในสารละลายอินทรีย์เกือบทุกชนิด แต่ไม่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ที่อุณหภูมิต่ำ และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอมโมเนียจะได้สารสีม่วงของ rubropunctatamine ($C_{21}H_{23}O_4N$) ที่ละลายในแอลกอฮอล์ได้ดีทีสภาวะเป็นด่าง แต่ไม่ละลายในแอลกอฮอล์ที่สภาวะเป็นกรดและไม่ละลายในน้ำ เมื่อนำมาทำให้เกิดการรีดักชันด้วยผงสังกะสีจะได้สารไม่มีสีของ aporubropunctatamine

Nakanishi และคณะ (1959) นำสารสี monascorubrin ($C_{23}H_{26}O_5$) ที่แยกได้จากเชื้อรา *M.purpureus* มาทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียจะได้สาร monascamine($C_{23}H_{27}O_4N$) ซึ่งเมื่อรวมกับสังกะสีจะเปลี่ยนเป็น monascaminone

Kurono และคณะ(1963) ทดลองใช้ไอโซโทรปติดตามการสร้างสารสีของเชื้อราโมแนสคัส พบว่าเชื้อราสร้างสารสี 2 ชนิด คือ monascorubrin และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

monascoflavin ซึ่งกลไกการสังเคราะห์สารสีทั้งสองสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และมาจากสารเริ่มต้นที่เป็น polyketomethylene เหมือนกัน ต่างกันที่ความยาวของสาย polyketomethylene และตำแหน่งที่จะมารวมตัวกันเท่านั้น

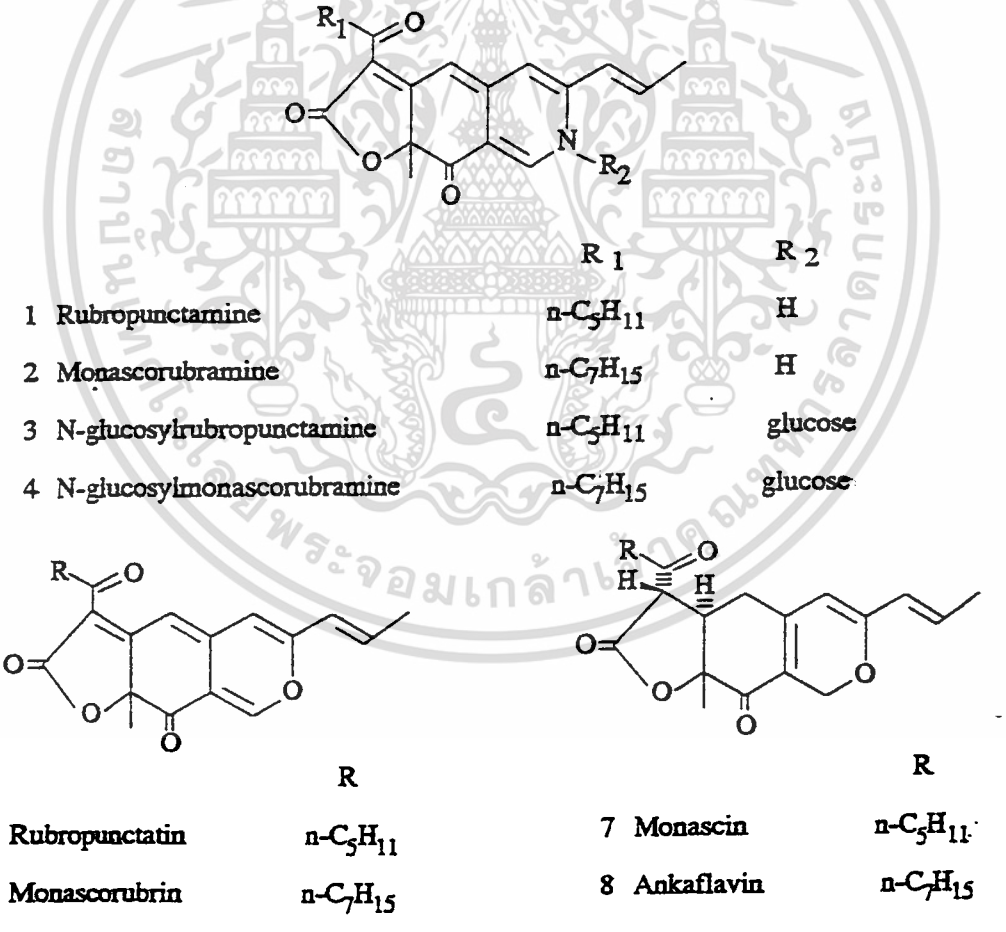
สารสี rubropunctatin พบครั้งแรกใน *Monascus rubropunctatus* โดย Sato ซึ่งแยกมาจาก *Monascus purpureus* Carels (1977) พบว่าถ้ามีแอมโมเนียมไนเตรทในปริมาณ 5-10 กรัมต่อลิตรจะทำให้เชื้อสร้างสารสีค่อนข้างแดง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนมากขึ้นสารสีแดงจะเพิ่มขึ้น ยกเว้นการเพิ่มในปริมาณมากๆ ที่จะไปยับยั้งการเจริญและการสร้างสารสี เนื่องจากสารสีแดงส่วนมากได้มาจากอาหารที่มีกลูโคสอยู่น้อย เนื่องจากการเจริญของเส้นใยที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูง อาหารจะมีความเป็นกรดมากซึ่งจะไม่ผลิตสารสีแดงออกมา ดังนั้นที่ความเข้มข้นของกลูโคสสูงๆ เส้นใยอาจจะต้องการสารประกอบไนโตรเจนเพื่อเป็นองค์ประกอบโครงสร้างของเส้นใยในการเจริญเติบโต

Carels และ Shephers(1977) พบว่าสารสีแดงจะมีในอาหารที่มียีสต์เอกซ์แทรคหรือไนเตรทที่พีเอช 6.5 และจะสร้างสารสีส้มในอาหารที่มีแอมโมเนียมหรือ แอมโมเนียมไนเตรทที่พีเอช 2.5 โดยปรับให้มีพีเอช ในอาหารเริ่มต้นเท่ากันคือ 5.5 แต่พีเอช สุดท้ายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารนั้น ๆ พบว่าสารสีแดงจะถูกสร้างขึ้นในอาหารที่มีพีเอช สุดท้ายมากกว่า 6 สารสีส้มจะเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์เอมีนของสารสีแดงโดยการทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียในน้ำ พบว่าถ้ามีความเข้มข้นแอมโม-เนียมไนเตรท 5-10 กรัมต่อลิตร อาจจะมีแอมโมเนียมอิออนอิสระมากกว่า หรือ มีอะมิโนกลุ่มอิสระภายในหรือภายนอกเซลล์มากกว่า ซึ่งสามารถที่จะไปทำปฏิกิริยากับสารสีส้มทำให้เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ เอมีนของสารสีแดง เช่นปฏิกิริยาอาจจะถูกยับยั้งอย่างแรง โดยการเติมกรดมากๆในสภาวะที่ใช้ ดังนั้น จะมีแต่สารสีเหลืองเพียงอย่างเดียวในอาหารทีมี แอมโมเนียมไนเตรท 50 กรัมต่อลิตร แต่พีเอช ต่ำ

Manchand และคณะ(1973) พบว่าเชื้อราโมแนสคัสแต่ละสายพันธุ์ให้สารสีแตกต่างกันออกไป *M.rubropunctatus* Sato สร้างสาร rubropunctatin และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

monascin *M.purpureus* สร้างสาร monascorubrin และ monascin ส่วน *M.rubriginosus* สร้างเฉพาะสาร monascin เท่านั้น และพบการสร้างสารสีเหลืองตัวใหม่จากเชื้อรา *M.anka* มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ monascin มีชื่อว่า ankaflavin ($C_{23}H_{30}O_5$)ต่อมาในปี 1981 Sweeny และคณะ ได้ใช้ตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ สกัดสารสีออกจากข้าวแดง ซึ่งเกิดจากการเจริญของเชื้อรา *M.anka* พบสารสี 3 กลุ่ม คือ สารสีแดง ประกอบด้วย rubropunctamine และ monascorubramine สารสีส้ม ประกอบด้วย rubropunctatin และ monascorubrin และสารสีเหลืองประกอบด้วย monascin และ ankaflavin โครงสร้างโมเลกุลของสารสีทั้ง 3 กลุ่ม แสดงในรูปที่ 4



		R_1	R_2
1	Rubropunctamine	n-C_5H_{11}	H
2	Monascorubramine	n-C_7H_{15}	H
3	N-glucosylrubropunctamine	n-C_5H_{11}	glucose
4	N-glucosylmonascorubramine	n-C_7H_{15}	glucose

		R
5	Rubropunctatin	n-C_5H_{11}
6	Monascorubrin	n-C_7H_{15}

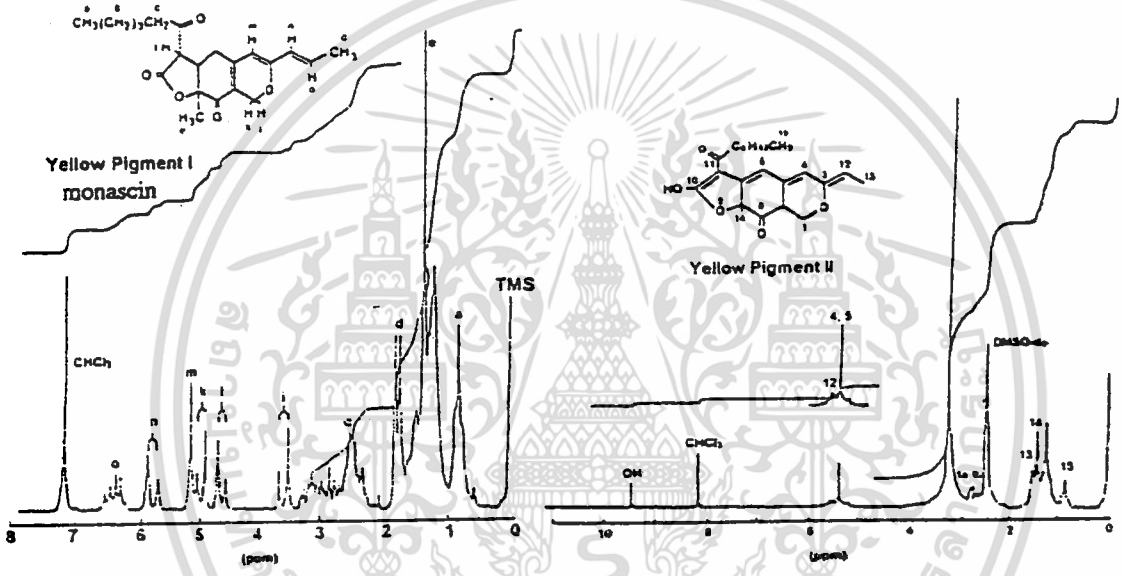
		R
7	Monascin	n-C_5H_{11}
8	Ankaflavin	n-C_7H_{15}

รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างทางโมเลกุลของสารสีที่สกัดได้จากข้าวแดง ซึ่งเกิดจากการเจริญของ *M.anka*

ที่มา : Sweeny และคณะ (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yongsmith และคณะ (1993) พบโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่จากการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus* sp.KB10 ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลัง เปปโตน และกรดกลูตามิก ที่พีเอช เริ่มต้น 2.5 สารสีเหลืองดังกล่าวดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 330 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 372 และมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{22}H_{23}O_5$ โครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่นี้ แสดงในรูปที่ 5

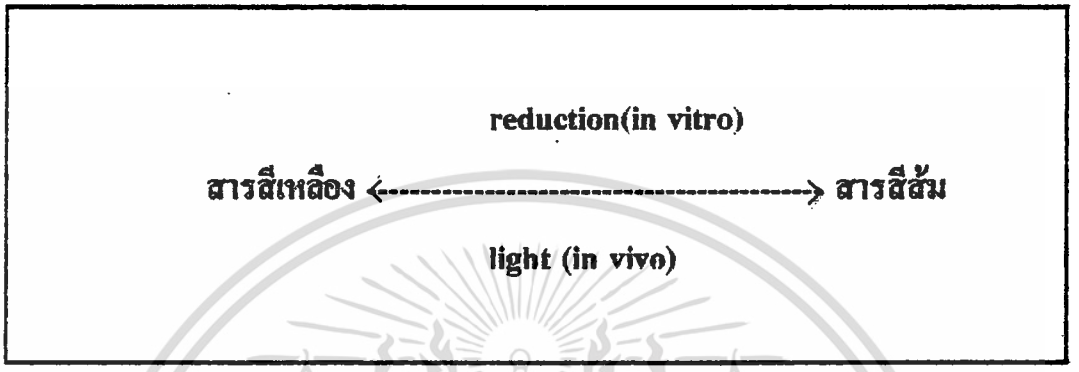


รูปที่ 5 แสดง H-NMR spectrum และสูตรโครงสร้างของสารสีเหลืองตัวใหม่ที่ได้จากเชื้อราโมแนสคัส KB10 เปรียบเทียบกับสารสีเหลืองของ monascin

Wong และ Bau(1978) ศึกษาผลของแสงต่อการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส พบว่าแสง UV และสารที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. จะกระตุ้นให้เชื้อราที่สร้างสารสีได้น้อย หรือไม่สร้างสารสีเลย (albino mutant) สามารถสร้างสารสีได้ดีขึ้น ในขณะเดียวกันก็ยับยั้งการสร้างสารสีในสายพันธุ์ที่สร้างสารสีได้สูง แสงสีขาว แสงสีน้ำเงิน และแสงสีแดงกระตุ้นการสร้างสารสีเหลือง แต่ไม่มีผลต่อสารสีแดง ทั้งนี้เนื่องจากสารสีเหลืองทำหน้าที่เป็นตัวรับแสง (photoreceptor) ซึ่งอาจเป็นสารเริ่มต้น หรือสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์สารสีก็เป็นได้ สารสีเหลืองนี้สามารถถูกออกซิไดซ์ไปเป็นสารสีส้ม คือ rubropunctatin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ในหลอดทดลอง และปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดย้อนกลับได้เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารสีที่สร้างจากเชื้อราโมแนสคัส
ที่มา : Wong และ Bau(1978)

5.โปรโตพลาสต์ (protoplast) เป็นคำที่ใช้กันมาตั้งแต่ปี ค.ศ.1953 โดย Weibull เรียกโครงสร้างของแบคทีเรียที่ได้จากการที่ผนังเซลล์ถูกทำลาย หรือ แยกเอาผนังออก เหลือเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ล้อมรอบ ต่อมาจึงใช้กับจุลินทรีย์อื่น

ปัจจุบัน โปรโตพลาสต์ หมายถึง โครงสร้างที่ได้จากเซลล์พืช หรือจุลินทรีย์ ซึ่งปราศจากผนังเซลล์เนื่องจากได้แยก หรือทำลายผนังเซลล์โดยวิธีกล หรือการใช้เอนไซม์ โครงสร้างของโปรโตพลาสต์จึงล้อมรอบด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ คุณสมบัติของโปรโตพลาสต์พอสรุปได้ดังนี้

1.มีคุณสมบัติเหมือนเซลล์ปกติ แต่ไม่มีผนังเซลล์

2.เมื่อศึกษาทางสรีรวิทยา พบว่าอัตราการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนเท่ากับในเซลล์ปกติ แต่การสังเคราะห์ DNA เท่ากับ ครึ่งหนึ่งของเซลล์ปกติ

3. โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้(cell wall regeneration)

4. โปรโตพลาสต์สามารถกลับเป็นเซลล์ปกติ ที่มีการเจริญและแบ่งเซลล์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สเฟียโรพลาสต์ (spheroplast) มีลักษณะ เหมือนโปรโตพลาสต์ทุกอย่างเพียงแต่ยังคงเหลือผนังเซลล์บางส่วน

โปรโตพลาสต์ของจุลินทรีย์ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น

-ด้านการศึกษา ใช้ศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ การเจริญของเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างและรายละเอียดของอวัยวะ(ultrastructure of organelle) และการสังเคราะห์อวัยวะต่าง ๆ ตลอดจนการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของเชื้อรา

-ใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาพันธุกรรม

-ใช้ปรับปรุงเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของแบคทีเรีย รา สาหร่าย และพืชด้วย เทคนิกโปรโตพลาสต์ฟิวชัน (protoplast fusion) และ โปรโตพลาสต์ทราน-สฟอร์เมชัน (protoplast transformation)

การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น รายงานครั้งแรกในพืช โดย Ferenczy (1974) และในเชื้อราที่เป็นเส้นใย โดย Anne และคณะ (1974) ต่อมา Anne และ Peberdy(1975) กับ Van Solinger และ Vander Plaat (1974) ได้เสนอผลงานเกี่ยวกับโปรโตพลาสต์ฟิวชันของยีสต์

โปรโตพลาสต์ฟิวชั่นเป็นการเหนี่ยวนำ หรือส่งเสริมให้เกิด genetic recombination ในจุลินทรีย์ทั้งโปรคาริโอทและยูคาริโอทด้วยความถี่สูง นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังได้มีการพัฒนาอย่างดีสำหรับเซลล์พืชและสัตว์ การส่งเสริมให้เกิด genetic recombination นั้นทำโดยนำโปรโตพลาสต์ของเซลล์เหล่านั้นมาเหนี่ยวนำให้เกิดการหลอมรวมกัน เป็นผลให้สารพันธุกรรมทั้งหมดภายในโปรโตพลาสต์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ (parental strains) เข้ามาอยู่ในโปรโตพลาสต์เดียวกัน ทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจจากสายพันธุ์ต่าง ๆ เข้าไปอยู่รวมกันในโปร-โตพลาสต์เดียวซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่เจริญและเพิ่มจำนวนตามปกติได้ วิธีนี้เหมาะสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-การสร้างรีคอมบิแนนท์ของจุลินทรีย์ที่ขาดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ไม่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากการรวมตัวของโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นได้โดยไม่ต้องอาศัย mating type หรือ incompatibility factor ของคู่เชื้อที่จะนำมาผสมพันธุ์กัน อาจนำมาใช้กับจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมแต่มีความเข้าใจในระบบพันธุกรรมน้อย เช่น actinomyces

-ใช้รวมยีโนม (genome) ของเชื้อที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ต่างกันมากได้ และการรวมกันนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับจำนวนชุดของโครโมโซม (ploidy) จึงทำให้เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ซึ่งมักมีจำนวนโครโมโซมหลายชุด(polyploid) หรือเป็นแบบ aneuploid

ลูกผสมที่ได้จากการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์เรียกว่า รีคอม-บิแนนท์ลูกผสมจากการทำฟิวชั่น (fusion hybrid) ผลผลิตจากการทำฟิวชั่น (fusion product) หรือ ฟิวแซนท์ (fusant)

การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1.การแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation) หรือ (protoplast preparation) เป็นขั้นตอนของการนำเซลล์มาเปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสต์

2.การหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นขั้นตอนที่เหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์ตั้งแต่สองโปรโตพลาสต์เข้ามารวมตัวกัน เป็นโปรโตพลาสต์เดียว

3.การเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ (protoplast regeneration) เนื่องจากโปรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่เพิ่มจำนวนไม่ได้ ดังนั้นจำเป็นต้องเปลี่ยนให้โปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ ซึ่งได้จากการทำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ใหม่ขึ้นมาล้อมรอบโปรโตพลาสต์ เมื่อเปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ปกติจึงสามารถเจริญเพิ่มจำนวนและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 วิธีการแยกโปรโตพลาสต์ (protoplast isolation)

การแยกโปรโตพลาสต์ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1.วิธีกล (mechanical method) หรือวิธีที่ไม่ใช้เอนไซม์ (non enzymatic method) วิธีนี้นับเป็นวิธีแรกที่มนุษย์พยายามแยกเอาโปรโตพลาสต์ออกมา เช่น

- การนำเซลล์ไปเขย่ากับลูกแก้วเพื่อทำลายผนังเซลล์
- การใช้เสียงความถี่สูง (ultrasonic)

วิธีการแยกโปรโตพลาสต์เช่นนี้จะทำให้ ได้โปรโตพลาสต์น้อยมาก และมักมีเศษชิ้นส่วนของพืชที่ไม่ต้องการ ปะปนมามากจนทำให้ไม่สะดวกกับการศึกษา และได้โปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิต ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยมกันในปัจจุบัน

2.วิธีการใช้เอนไซม์ (enzymatic method) เป็นวิธีที่ใช้เอนไซม์ที่เรียกว่า lytic enzyme ย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลายไป วิธีการนี้ได้รับการพัฒนามาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 เริ่มโดย Cocking การแยกโปรโตพลาสต์โดยการแยกผนังเซลล์ออกด้วย lytic enzyme ในที่มี osmotic stabilizer นั้น lytic enzyme จะย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์ถูกทำลาย โดย lytic enzyme ที่ใช้สำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็จะแตกต่างกัน เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิด

ในการทำงานวิจัยเรื่องนี้ใช้เอนไซม์ ย่อยผนังเซลล์เพราะว่าเป็นวิธีที่สะดวก ประหยัดเวลา สามารถแยกโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ได้ปริมาณมากไม่จำกัด และสามารถควบคุมได้ดีกว่าวิธีแรก

5.2 การแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย

เชื้อรา *Monascus* sp. เป็นเชื้อราในกลุ่ม Ascomycetes ที่มีลักษณะเป็นเส้นใย ผนังเส้นใยประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด คือ ไคติน และ beta (1,3)glucan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแยกโปรโตพลาสต์จากเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยนั้น จะต้องมีการย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นโพลีแซคคาไรท์ ซึ่งมีปริมาณสูง คือมีปริมาณ 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของผนังเซลล์ นอกจากนั้น โพลีแซคคาไรท์ที่พบในเชื้อราชนิดต่าง ๆ ยังมีชนิดและปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนั้น lytic enzyme ที่ใช้จำเป็นต้องประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิด โดยปกติ มักใช้ key lytic enzyme ที่ประกอบด้วย chitinase และ glucanase

สำหรับ lytic enzyme ที่พบว่าใช้ได้ผลดีสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา *Monascus* sp. เช่น

1.zymolyase จากเชื้อแบคทีเรีย ***Arthrobacter luteus***

2.cellulase จากเชื้อ ***Trichoderma resei***

3.chitinase จากเชื้อ ***Streptomyces griceus***

4.lysing enzymes ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสมระหว่าง chitinase ,protease cellulase จากเชื้อ ***Trichoderma harzianum***

5.3 <u>โปรโตพลาสต์จากเชื้อรา *Monascus* sp.</u>

เซลล์ของเชื้อราเหมือนกับเซลล์พืชและเซลล์แบคทีเรีย เมื่อพิจารณาในองค์ประกอบสองส่วนที่สำคัญ คือ ผนังเซลล์ ที่ทำหน้าที่สร้างความแข็งแรง โดยจะมีความหนาและองค์ประกอบของผนังเซลล์ ที่แตกต่างกันออกไป และข้างในเป็นโปรโตพลาสซึม (protoplasm) โปรโตพลาสซึมจะถูกห่อหุ้มด้วยเซลล์เมมเบรนหรือ พลาสมาเลมมา(plasmalemma) และประกอบไปด้วยองค์ประกอบภายในเซลล์หลายอย่าง ผนังเซลล์มีคุณสมบัติในการรักษาและค้ำจุนรูปร่างเซลล์และปกป้องโปรโตพลาสต์ แต่ผนังเซลล์สามารถลอกออกไปได้โดยใช้เอนไซม์ย่อยจะได้เป็นเซลล์เปลือย (protoplast) ซึ่งโปรโตพลาสต์จะอยู่รอดได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับสภาวะแรงดันออสโมติกภายในต้องเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเชื้อรา *Monascus* sp. ต้องมีการย่อยสลายองค์ประกอบส่วนที่เป็นโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีปริมาณสูง คือมีประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ของผนังเซลล์ lytic enzyme ที่พบว่าใช้ได้ผลดีสำหรับการแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใยโดยทั่ว ๆ ไป เช่น

1.เอนไซม์ผสม ได้แก่เอนไซม์ผสมระหว่าง เซลลูเลส (cellulase) ไคติเนส(chitinase) และ ไซโมไลเอส (zymolyase)

2.เอนไซม์ผสม lysing enzymes จากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

3.เอนไซม์จากหอยทากชนิดเดียวกับที่ใช้ในยีสต์

นักวิทยาศาสตร์หลายคนที่ศึกษาเกี่ยวกับ การแยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย พบว่าเอนไซม์ที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการโดยการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มี mycolytic activity ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพวกแอคติโนมัยสีท เช่น *Streptomyces* และ *Micromonospora* โดยพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้ (crude enzyme) จะให้ผลในการแยกโปรโตพลาสต์ดีกว่าเอนไซม์ที่ผลิตเป็นการค้าทั่วไป เนื่องจาก crude enzyme ที่ผลิตได้มีองค์ประกอบของเอนไซม์หลายชนิด เช่น crude enzyme ที่ได้จาก *Streptomyces satsumaensis* ประกอบด้วยเอนไซม์cellulase และ exolamiarinase เนื่องจากเชื้อรา *Monascus purpureus* สามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างโคนิเดีย และสามารถสร้างสปอร์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศได้เป็นจำนวนมาก ทำให้การแยกโปรโตพลาสต์ยุ่งยากกว่าจุลินทรีย์อื่นที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดียว (สาวิตรี, 2536) การแยกโปรโตพลาสต์อาจทำได้จากส่วนต่าง ๆ ดังนี้

<u>1. เส้นใย</u> โดยอาจจะใช้เส้นใยทั้งเส้น ซึ่งโปรโตพลาสต์จะถูกปล่อยออกมาจากส่วนปลายของเส้นใยที่เรียกว่า hyphal tip กรณีนี้เส้นใยที่ใช้ต้องมีอายุน้อยเพราะผนังเซลล์จะมีความแข็งแรงไม่มากนัก เหมาะแก่การย่อยสลายของ lytic enzyme นอกจากนี้อาจเตรียมโดยตัดเส้นใยออกเป็นชิ้นขนาดเล็กหรือขนาดใหญ่เพื่อให้ได้โปรโตพลาสต์จำนวนมากขึ้น แต่เฉพาะชิ้นของเส้นใยที่มีเยื่อหุ้มเซลล์สมบูรณ์ทุกด้านเท่านั้น จึงสามารถเปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสต์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.สปอร์แบบไม่มีเพศ โดยสปอร์แบบไม่มีเพศจะสามารถงอกเป็นเชื้อราทั้ง thallus ได้ สปอร์ที่ใช้ควรเป็นสปอร์ที่ยังไม่แก่เต็มที่ (immature spore)ซึ่งจะยังมีผนังที่ถูกย่อยสลายได้ค่อนข้างง่าย ส่วนสปอร์ที่แก่เต็มที่แล้ว(mature spore) ซึ่งผนังสปอร์จะมีความทนทานทำให้การแยกโปรโตพลาสต์ยาก และ สปอร์ที่กำลังงอก(germinated spore) ในกรณีนี้โปรโตพลาสต์จะสร้างจากส่วนของ germ tube ซึ่งมีผนังเซลล์ที่ถูกย่อยสลายด้วย lytic enzyem ได้ง่าย ดังนั้นผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการแยกโปรโตพลาสต์จากสปอร์ที่ยังไม่แก่เต็มที่ และสปอร์ที่แก่เต็มที่แล้ว

5.3.1 การเตรียมและการปล่อยโปรโตพลาสต์ออกจากเซลล์ของเชื้อรา

การเตรียม และการปล่อยโปรโตพลาสต์ ออกจากเซลล์ของเชื้อรา สามารถทำได้ดังรูปที่ 7 ซึ่งเป็นวิธีการคร่าวๆ ในการแยกโปรโตพลาสต์

เส้นใย : เซลล์ : สปอร์ นำไปล้างในสารละลายบัฟเฟอร์
และล้างครั้งสุดท้ายให้เส้นใยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์และ stabilizer

⇓

บ่มด้วย lytic enzyme นำไปเขย่า

⇓

นำเส้นใยที่หักเป็นท่อน ๆไปกรอง

⇓

ทำความสะอาดครั้งสุดท้ายโดยการเหวี่ยง(centrifugation)

รูปที่ 7 แสดงวิธีการเตรียมโปรโตพลาสต์พอเป็นสังเขป

สารละลายของเซลล์(ประกอบด้วยเส้นใยและสปอร์) จะนำไปบ่มด้วย lytic enzyme ที่เหมาะสมในสารละลาย รักษาสภาพแรงดันออสโมติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(osmotic stabilizer) และบัฟเฟอร์ ปกติตามธรรมชาติแล้วความเข้มข้นของ osmotic stabilizer จะขึ้นอยู่กับเชื้อราแต่ละชนิด หลังจากนั้นจะนำไปบ่มและเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบต่ำ ที่อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการบ่มขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา สำหรับเชื้อรา *Monascus* sp. อยู่ในช่วงประมาณ 2-3 ชั่วโมง

Kiyohara(1990) ได้แยกโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา *Monascus anka* พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้ 8.2×10^5 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 2-3 ชั่วโมง

ชุลี (2536) ได้ทำการทดลองแยกโปรโตพลาสต์กับเชื้อรา *Monascus* sp.KB6SR พบว่าสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้สูงถึง 10^8 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตรในเวลาเพียง 2 ชั่วโมง

6. ปัจจัยที่มีผลต่อรูปร่างของโปรโตพลาสต์

ความสามารถและประสิทธิภาพของเซลล์ในการเปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสต์ทั้งหมด โดยการใช้เอนไซม์ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และสภาวะทางสรีรวิทยา จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องตัดสินใจเลือกวิธีที่เหมาะกับจุลินทรีย์ที่จะทำการแยกโปรโตพลาสต์

การแยกโปรโตพลาสต์ในเชื้อราที่เป็นเส้นใย โดยการย่อยผนังเซลล์ออกด้วยเอนไซม์ ซึ่งไลติคเอนไซม์ที่ใช้อาจเตรียมจากทางการค้าหรือได้มาจากจุลินทรีย์ ได้มีผู้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp.ดังรายงานของ ชุลี และ Kiyohara แต่ยังไม่มีผู้ใดศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* KB20M10.2 ,KB20M1, KB11304 ,KB10M16 ปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ผลิตได้ และความอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมต่าง ๆ ดังนี้

6.1 การเลือก Osmotic stabilizer

Osmotic stabilizer ไม่ได้เป็นแค่ตัวรักษาสภาพความดันออสโมติกของโปรโตพลาสต์เปลือยเท่านั้น แต่มีผลต่อผลผลิตของโปรโตพลาสต์ที่ได้ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่าวคือโปรโตพลาสต์จะเป็นโครงสร้างที่แตกง่ายหรือ sensitive ต่อสภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติค (osmotically fragile) สารที่รักษาแรงดันออสโมติคที่เหมาะสมจะใช้เพื่อเป็นสารละลายไลติก ในการล้างตัวถูกละลาย และในอาหารที่เลี้ยงโปรโตพลาสต์เพื่อรักษาสภาพที่เหมาะสมของเซลล์ มีสมมติฐานว่าตัวถูกละลายอาจจะไม่สามารถที่จะทะลุผ่านตัวรักษาแรงดันออสโมติก(osmotic barrier) ของโปรโตพลาสต์ที่อัตราที่เหมาะสมได้ ซึ่งอาจเป็นวิธีในการป้องกันโปรโตพลาสต์แตก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บโปรโตพลาสต์ในสารละลายไอโซทอนิก (isotonic solution) หรือ สารละลายไฮเปอร์ทอนิก (hypertonic solution)ซึ่งโปรโตพลาสต์จะมีรูปร่างกลม โดยจะมีลักษณะเด่นในลารละลายชนิดแรก ส่วนในสารละลายไฮเพอร์ทอนิกโปรโตพลาสต์จะเหี่ยวเล็กน้อย เนื่องจากมีการเสียน้ำออกจากเซลล์ แต่ความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ไม่เปลี่ยนแปลง โดยสารละลายที่ใช้สำหรับรักษาให้โปรโตรพลาสต์คงตัวอยู่เรียกว่า osmotic stabilizer ,osmoticum หรือ osmoticant ซึ่งต้องเป็นสารละลายไอโซทอนิกหรือไฮเพอร์ทอนิก แต่ที่นิยมคือ สารละลายไฮเพอร์ทอนิก สารที่เลือกมาใช้เป็น osmotic stabilizer ต้องมีคุณสมบัติ 2 ประการ คือ ไม่เป็นพิษต่อโปรโตพลาสต์ และไม่ลดกิจกรรมของ lytic enzyme นอกจากนั้นจะดียิ่งขึ้นถ้าส่งเสริมกิจกรรมของ lytic enzyme

สารที่นิยมนำมาใช้เป็น osmotic stabilizer มี 2 ชนิด คือ

1. สารละลายของเกลืออนินทรีย์ มีเกลืออนินทรีย์หลายชนิดที่นิยมใช้เป็น osmotic stabilizer ซึ่งชนิดและความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่ใช้จะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ ดังตารางที่ 4

2. สารละลายของน้ำตาล และน้ำตาลแอลกอฮอล์ สารละลายประเภทนี้สามารถใช้เป็น osmotic stabilizer สำหรับโปรโตพลาสต์ของจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ไม่เหมาะกับ *Monascus* sp. มักใช้กับพวกยีสต์มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 สารละลายของเกลืออนินทรีย์ที่ใช้เป็น osmotic stabilizer สำหรับเชื้อรา ในกลุ่ม Aspergillus และ *Monascus* sp.

stabilizer	จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
0.5 M KCl	*Aspergillus niger*	Kirimura และคณะ(1986)
0.6 M KCl	*Aspergillus spp.*	Kevei และ Peberdy(1977)
0.6 M NaCl	*Asp awamori var kawachi*	Ogawa และคณะ (1988)
0.8 M $MgSO_4$ ใน citrate buffer pH 5.5	*Monascus* sp. KB6SR	ชุลี (2536)
0.6 M NH_4Cl pH 5.6	*Monascus anka* กับ *Aspergillus oryzae*	Kiyohara และคณะ (1990)

6.2 ชนิดของ ไลติกเอนไซม์ที่ใช้

การใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ออกบางส่วน หรือทั้งหมดเป็นสิ่งจำเป็นในการผลิตโปรโตพลาสต์ สารประกอบทางเคมีที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์จะแตกต่างกันไปตามชนิด species ของเชื้อรา ดังนั้นการเลือกไลติกเอนไซม์สำหรับการย่อยผนังเซลล์ ขึ้นอยู่กับความรู้พื้นฐานขององค์ประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ แต่ละชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสรุปแล้ว องค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราจะแตกต่างกันตามอนุกรมวิธาน และการเลือกใช้ lytic enzymes ที่ใช้ย่อยผนังเซลล์และการเกิดโปรโตพลาสต์ จะต้องเลือกเอนไซม์ที่ใช้ให้เหมาะสมด้วย

6.3 อายุและสภาวะที่ใช้ในการหมักของเชื้อรา

6.3.1 อายุของเชื้อ

สำหรับเชื้อราที่มีเส้นใยของ *Monascus purpureus* อายุของเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อผลผลิตโปรโตพลาสต์ที่ได้ ได้มีผู้ศึกษาพบว่าส่วนใหญ่ใช้เส้นใยที่มีอายุน้อยซึ่งได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลวและบ่มบนเครื่องเขย่าจะให้ผลผลิตโปรโตพลาสต์ดีกว่า ทั้งนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของเส้นในราที่อยู่ใน early-exponential phase หรือ mid-exponential phase จะไวต่อการทำงานของ lytic enzymes มากกว่าเส้นใยของเชื้อราที่มีอายุมาก เช่น *Aspergillus flavus* พบว่าให้โปรโตพลาสต์สูงสุดเมื่อใช้เส้นใยที่อยู่ใน exponential phase และสำหรับ *Trichoderma harzianum* ให้โปรโตพลาสต์สูงสุดเมื่อแยกจาก thallus ที่มีอายุน้อยซึ่งได้จากการเพาะเชื้อที่เลี้ยงบน potato dextrose agar ที่ยังไม่มีการสร้างสปอร์ลงใน potato dextrose broth ที่เติมยีสต์เอกซ์แทรก 15 เปอร์เซ็นต์ บ่ม 1 คืน บนเครื่องเขย่าที่ 25 องศาเซลเซียส โดยให้โปรโตพลาสต์ประมาณ 99-99.99เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การแยกโปรโตพลาสต์จากโคนิเดียสามารถแยกโปรโตพลาสต์ได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ (Srasz และคณะ,1988)

6.4 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเติมสารบางอย่างลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ทำให้ได้ผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ ผลคือผนังเซลล์นั้นถูกทำลายด้วย lytic enzyme ง่ายขึ้น เช่น การเติมกรดอะมิโน DL-threonine และ glycine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาใช้แยกโปรโตพลาสต์จะทำให้ผนังเซลล์ถูกย่อยด้วย lytic enzyme ได้ดีขึ้น ตัวอย่างคือการเติม glycine ความเข้มข้นสูงลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยง *Streptomyces* หลายสปีชีส์ พบว่าการแยกโปรโตพลาสต์โดย lytic enzyme ให้ผลผลิตสูงขึ้น (Okanishi และคณะ,1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับ *Monascus* sp. ได้มีการเลี้ยงเชื้อราในอาหาร malt yeast starch broth หรือ ใช้ malt yest broth ที่มีน้ำตาลกลูโคสไม่มีแป้ง จากการทดลองพบว่า malt yeast starch broth ให้เซลล์เส้นใยที่ไม่เป็น pellet จึงเลือกใช้ MYS broth ได้มีผู้ค้นพบการเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลวโดยเตรียมจาก spore suspension แทน

6.5 การ Pretreatment

การใช้สารบางอย่างกับเซลล์ก่อนนำเซลล์ไปเตรียมโปรโตพลาสต์อาจจะทำให้การเตรียมโปรโตพลาสต์มีประสิทธิภาพสูงขึ้นเช่นกัน เช่น การใช้สารประกอบ thiol (beta-mercaptoethanol, dithiothreitol และ glutathione) และ cystein ทั้งนี้สารประกอบที่มีกลุ่ม SH ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในโปรตีนที่ผนังเซลล์ทำให้ lytic enzyme เข้าไปย่อยสลายผนังเซลล์ได้ง่ายขึ้น ตัวอย่างสารประกอบประเภทนี้ เช่น dithiothreitol ใช้ได้ดีกับ *Candida* sp. (Bauze และ Riggsby,1980) และ *Schizosac pombe*(Stephen และ Nasim,1981) และ beta-mercaptoethanol ใช้ได้ดีกับ *C.albicans* (Evans,1982) นอกจากนั้นมีการใช้ triton X-100 treat เส้นใยของ *Pythium* ก่อนใช้ lytic enzyme ทำให้การแยกโปรโตพลาสต์ทำได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้เชื่อว่า triton X-100 ซึ่งเป็นสารซักฟอกชนิดหนึ่ง ไปแยกเอาชั้นของลิปิดที่ผนังเซลล์ออกก่อนทำให้เอนไซม์เข้าไปทำปฏิกิริยาได้ดีขึ้น (Peberdy,1979)

6.6 ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีความสำคัญ

ปัจจัยอื่น ที่มีความสำคัญเช่นความเข้มข้นของเอนไซม์ พีเอชของไลติกเอนไซม์ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่ม มีผลต่อปริมาณโปรโตพลาสต์ที่ได้ซึ่งค่าต่าง ๆ เหล่านี้ ที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์แต่ละประเภท จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้สามารถหาจากอัตราปริมาตรของสารละลาย lytic ต่อน้ำหนักของเซลล์ โดยทั่ว ๆ ไป สารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อ 100 มิลลิกรัมจะเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

activity ของสารละลายเอนไซม์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น พีเอช และอุณหภูมิ ค่าพีเอช ที่เหมาะสมของสารละลายไลติก อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 25-28 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมสำหรับทั้ง activity เอนไซม์ และความมีชีวิตของเซลล์

โปรโตพลาสต์จะเกิดขึ้นในช่วง 2-3 ชั่วโมงแรก หลังจากบ่มด้วย lytic enzyme แต่ถ้าทิ้งไว้นานมากๆ จะเกิดการแตก (lysis) ของโปรโตพลาสต์ จำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จะลดลง เนื่องจากแรงดันออสโมติกที่ไม่เหมาะสม และความเร็วรอบที่ใช้ในการเขย่ามีผลต่อความอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ ถ้าใช้ความเร็วรอบสูง มาก ๆ จะทำให้โปรโตพลาสต์แตกได้ ปกติจะใช้ความเร็วในการเขย่าประมาณ 80-100 รอบต่อนาที

7.โปรโตพลาสต์ฟิวชัน (protoplast fusion)

เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการหลอมรวมเส้นใยที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จาก 2 สายพันธุ์มารวมกัน โดยเป็นขั้นตอนที่เหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์มาหลอมรวมกัน เพื่อนำสารพันธุกรรมจากโปรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 โปรโตพลาสต์เข้ามาอยู่รวมกัน ทำได้ 2 วิธี คือ

7.1 การใช้สารเคมี

การใช้ polyetylene glycol (PEG) ร่วมกับ Ca^{2+} ความเข้มข้นต่ำ โดย PEG จะช่วยเหนี่ยวนำการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ Kao และ Michyluk (1974) พบว่า PEG มีคุณสมบัติเป็น fusing agent คือ สารที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ PEG เป็นสารโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างเป็น CH_2OH-$(CH_2$-$OCH_2)_n$-CH_2OH มีประจุเป็นลบเล็กน้อย เพราะมีพันธะอีเธอร์ (ether linkage) จึงทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจน กับประจุบวกของ น้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และ สารอื่นๆ ที่อยู่บนผิวของโปรโตพลาสต์ได้ ดังนั้น จึงสันนิษฐานว่า PEG เป็นตัวเชื่อมโปรโตพลาสต์ให้ติดกัน ส่วน Ca^{2+} เชื่อว่าทำหน้าที่เป็นสะพานเชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีนที่ผิวของโปรโตพลาสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลไกการทำงานของ PEG ที่ช่วยให้มีการหลอมรวมกันของโปร-โตพลาสต์ดีขึ้นนั้นเชื่อว่าเกิดจากการทำให้โปรโตพลาสต์เข้ามาอยู่รวมกลุ่มกัน (agglutination) แล้วทำให้มีการหลอมรวมกันและการสลายตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเข้าใจว่า PEG มีผลต่อสารประกอบประเภท phospholipid ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มโปรโตพลาสต์

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงให้มากคือ

ไม่ควรทิ้งโปรโตพลาสต์ที่จะทำการรวมกันนั้นไว้นานเกินไป เนื่องจากโปรโตพลาสต์จะสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ค่อนข้างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นข้อกีดขวางในการรวมตัวกันได้ในภายหลัง ดังนั้นน่าจะทิ้งโปรโตพลาสต์ที่จะนำมารวมกันไว้ในเอ็นไซม์สุดท้ายที่จะย่อยผนังเซลล์ออก แต่จะใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าที่จะใช้ย่อยผนังเซลล์จริงบ้างเล็กน้อย เพื่อกันการสร้างผนังเซลล์ (ประสาทพร 2528)

สารละลาย PEG ที่ใช้ และสารละลายที่จะนำมาล้าง PEG จะต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้ สารที่ก่อให้เกิดการหลอมรวมกัน หรือ fusogen เช่น sodium nitrate ที่ใช้ในการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ด *Pleurotus cystidiosus* แต่พบว่าประสิทธิภาพของการใช้เทคนิคนี้จะต่ำ การวิจัยจะต้องมีการทดลองในขั้นปลีกย่อยในการหา fusogen ที่เหมาะสมมากขึ้น ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงคือ

1. เวลาที่ใช้ PEG
2. ความเข้มข้นที่เหมาะสม
3. น้ำหนักโมเลกุล
4. อุณหภูมิ
5. สภาวะที่ใช้ในการ fusion

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่เหมาะสมในการทำให้โปรโต-พลาสต์หลอมรวมกันได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น พบว่าเชื้อราโดยทั่วไปความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสมสำหรับการเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์หลอมรวมกันอย่างมีประสิทธิภาพมักต่ำกว่าที่ใช้กับของแบคทีเรีย โดยส่วนใหญ่มักใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 25-30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะมีประสิทธิภาพสูง โดย 4000 และ 6000 มีประสิทธิภาพสูงสุด และยังพบว่าถ้าความเข้มข้นของ PEG ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ โปรโตพลาสต์ของเชื้อรามักจะแตก เนื่องจากสารละลายของ PEG ที่ความเข้มข้นดังกล่าว มีสภาพเป็นสารละลายไฮโพทอนิก และเมื่อความเข้มข้นสูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ สารละลาย PEG นั้นจะมีสภาพเป็นสารละลายไฮเพอร์ทอนิก มีผลทำให้โปรโตพลาสต์เหี่ยวและความถี่ของการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ต่ำ ยิ่งไปกว่านั้น PEG ความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อโปรโต-พลาสต์

Kiyohara(1990) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่เหมาะสมในการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อรา โมแนสคัส คือ 6000

ความสำเร็จของการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น ระหว่างเชื้อรา *Aspergillus nidulans* และ *A.rugulosa* เกิดได้จากการใช้ PEG 4000 30 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ $CaCl_2$ 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Kevei และ Peberdy,1977)

โปรโตพลาสต์ฟิวชันของ *Aspergillus niger* ต่างสายพันธุ์นั้น เมื่อเหนี่ยวนำโดยการใช้ PEG 6000 หรือ 4000 ปริมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ที่มี $CaCl_2$ 0.01 โมลาร์ และ KCl 0.5 โมลาร์ ใน glycine-NaOH buffer 0.05 โมลาร์ พบว่า PEG 6000 มีประสิทธิภาพเหนี่ยวนำให้เกิดการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ได้ดีกว่า (Kirimura และคณะ ,1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากผสม PEG ลงไปแล้ว ถ้าความเข้มข้นและเวลาที่ใช้ PEG นานเกินไปจะต้องลดความเข้มข้นและเวลาลง เพื่อหลีกเลี่ยงความเป็นพิษของPEG ในการทดลองเขาพบว่าขั้นตอนการเหวี่ยงแยกในขั้นสุดท้ายจะเพิ่มความถี่ให้มีการหลอมรวมกันของเซลล์หลาย ๆ แบบ โดย pellet ของเซลล์ที่อยู่กันแบบไม่แน่นนักจะใส่ 1 มิลลิลิตร ของ PEG 1000 หรือ PEG 6000 ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ pellet ด้วยสารละลาย PEG โดยหมุนหลอดเบา ๆ และหลังจากนั้น 1 ถึง 2 นาที เติมอาหาร 10 มิลลิลิตรที่ไม่มีเซรุ่มลงไปในของผสม PEG เพื่อเป็นการเจือจาง

7.2 การใช้กระแสไฟฟ้า (electro fusion)

การทำฟิวชั่นโดยการเหนี่ยวนำด้วยกระแสไฟฟ้า (electro fusion) โดย Zimmermann และ Vienken(1982) ได้ประดิษฐ์เครื่องมือที่เรียกว่าzimmermann cell fusion system ที่อาศัยหลักการของ dielectrophoresis โดยใช้สนามไฟฟ้ากระแสสลับ (non-homogeneous AC electric field) ทำให้โปรโตพลาสต์ที่อยู่ใกล้กันเข้ามาติดต่อกันจนเป็นสายคล้ายสายไข่มุก (pearl chaining) เมื่อเยื่อหุ้มโปรโต-พลาสต์แตะกันแล้วจึงใช้กระแสตรง (DC voltage) ที่เหมาะสมผ่านเข้าไปเป็นจังหวะ ๆ ซึ่งจะมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย โดยอนุมูลที่อยู่ทั้งสองด้านของเยื่อหุ้มเซลล์ช่วยทำให้เกิดช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไซโตพลาสต์ซึมหลอมรวมกันได้ ยีโนมของโปรโตพลาต์ที่หลอมรวมกันจะเข้ามาอยู่ด้วยกัน

Zimmermann และ Vienken(1982) อธิบายว่าการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นโดยใช้ PEG มีข้อจำกัดหลายอย่าง คือ

1. สภาวะที่เหมาะสมผันแปรตามสปีชีส์ของเชื้อราที่นำมาหลอมรวมกัน
2. กระบวนการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ ไม่สามารถตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์
3. จำนวนโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันไม่สามารถเลือกได้
4. ใช้เวลานาน
5. ลูกผสมอาจมีความมีชีวิตลดลง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. fusing agent มีผลต่อความมีชีวิตของโปรโตพลาสต์ด้วยเช่นกัน
7. ได้ลูกผสมน้อย

สำหรับวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าในการหลอมรวมโปรโตพลาสต์มีข้อดีหลายประการได้แก่

1. การหลอมรวมโปรโตพลาสต์สามารถสังเกตได้จากกล้องจุลทรรศน์
2. ลูกผสมสามารถเลือกย้ายลงไปเลี้ยงในอาหารที่มีสารอาหารได้โดยตรง โดยไม่จำเป็นต้องใช้ selective medium

แต่วิธีนี้จะใช้กับโปรโตพลาสต์ที่มีจำนวนมากพอที่จะชักนำ โดยกระแสไฟฟ้าเท่านั้น ถ้าขนาดเซลล์ของโปรโตพลาสต์เพิ่มขึ้น อาจจะเป็นไปได้ที่จะนำวิธีนี้มาใช้ แต่โดยทั่วไปในห้องทดลองจะใช้สาร PEG มากกว่า แต่จนถึงขณะนี้ electrofusion ไม่ได้แสดงให้เห็นว่าให้ผลดีกว่าการใช้ PEG

อิทธิพลของปัจจัยภายนอก ที่มีต่อการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์หลังจากใช้สารละลาย PEG มีความสำคัญที่จะต้องพิจารณาให้มาก โดยจะมีปัจจัยหลายประการด้วยกัน เช่น ความเข้มข้นของ PEG ที่เหมาะสม พีเอช และอุณหภูมิ ที่มีผลต่อความอยู่รอดของโปรโตพลาสต์ที่ได้ สามารถที่จะใช้เป็นตัวแปรต่าง ๆ ในการออกแบบการทดลองในขั้นละเอียดต่อไปได้

7.3 <u>การทำ protoplast fusion ของเชื้อรา</u>

โปรโตพลาสต์จากเชื้อราสองสายพันธุ์ ที่มีลักษณะที่น่าจะให้ลูกผสมใหม่ได้ จะนำมาผสมรวมกันในปริมาณความเข้มข้นที่เท่า ๆ กัน ในสารละลาย PEG เพื่อให้เกิดการหลอมรวมกัน หรืออาจจะใช้วิธี electrofusion ก็ได้ โปรโต-พลาสต์จะมีการหลอมรวมกันเป็นกลุ่มหลังจาก treat ด้วยสารเคมี และบ่มบนอาหาร selective growth medium ที่เติมสาร osmotic stabilizer แทนน้ำ เพื่อใช้เลือกโคโลนีที่เป็น heterokaryons

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันอาจผสมระหว่าง สายพันธุ์ต่างๆกัน และระหว่าง species ต่าง ๆ กัน ก็ได้ ผนังเซลล์จะถูกสร้างขึ้นใหม่เองตามธรรมชาติ และได้เส้นใยที่ผสมกัน

8.การเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์(protoplast regeneration)

คุณสมบัติของโปรโตพลาสต์ข้อหนึ่งที่สำคัญคือ สามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ได้ (cell wall regeneration) และกลับกลายเป็นเซลล์ปกติซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นถ้าต้องการทราบว่าโปรโตพลาสต์ของเชื้อราโมแนสคัสที่หลอมรวมกันแล้วจะสร้างสีได้มากขึ้นหรือไม่ จึงจำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ ซึ่งปกติทำโดยนำมาเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมและบ่มในสภาวะที่เหมาะสม

การที่จะบอกว่าโปรโตพลาสต์ เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ปกติได้มากหรือน้อยนั้นกำหนดเป็นค่าความถี่ของการเปลี่ยนจาก โปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ (protoplast regeneration frequency) ซึ่งหาได้จาก

ความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์

$$= \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมดหรือจำนวนเซลล์เริ่มต้น}}$$

อาหารที่ใช้และสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์ แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น โปรโตพลาสต์ของเชื้อราส่วนใหญ่จะเปลี่ยนกลับไปเป็นเส้นใยปกติได้ต้องเลี้ยงบนอาหารแข็ง วิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือ การ embed หรือหุ้มโปรโตพลาสต์ด้วย hypertonic regeneration medium ที่มีวุ้น 2-3 เปอร์เซ็นต์ หรือใช้อาหารด้านล่างประกอบด้วยวุ้น 1.8 เปอร์เซ็นต์ และเททับด้วยอาหารที่มีวุ้นซึ่งมีจุดหลอมเหลวต่ำปริมาณ0.7 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.<u>การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของโปรโตพลาสต์ที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์และเส้นใยปกติ</u>

สำหรับการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเส้นใย ของเชื้อ *Streptomycesgriseus* และ *Strep.venezuela* นั้น เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ปกติ พบว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งเป็นเวลา 40 ชั่วโมง โปรโตพลาสต์จะขยายใหญ่ขึ้น อีก 8 ชั่วโมง ถัดไปการเพิ่มขนาดของโปรโตพลาสต์ยังคงดำเนินต่อเนื่องเมื่อบ่มนาน 65 ชั่วโมง เริ่มมีเส้นใยสร้างจากโปรโตพลาสต์ และมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและ เมื่อบ่ม 73 ชั่วโมง พบเส้นใยมีการแตกกิ่งก้านสาขามากมาย

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่พบในเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นใย พบว่ามีการพัฒนาอยู่ 2 แบบ คือ

1. โปรโตพลาสต์สร้าง germ tube ที่มีรูปร่างไม่ปกติ เหมือนกับ เซลล์ซึ่งกำลังแตกหน่อ และต่อกันเป็นสาย ซึ่งต่อไปจึงเปลี่ยนเป็นเส้นใยปกติ

2. โปรโตพลาสต์เริ่มสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาล้อมรอบโปรโตพลาสต์ที่มีรูปร่างกลมได้เซลล์ใหม่ที่มีรูปร่างกลมเช่นกัน ต่อจากนั้นจึงมีการสร้าง germ tube ที่มีลักษณะปกติ การพัฒนาจากโปรโตพลาสต์ไปเป็นเส้นใยแบบนี้พบใน *Rhizopus nigricans* และ *Schizophyllum commune* ส่วน *Fusarium* และ *Pytium* พบการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์ไปเป็นเส้นใยทั้ง 2 แบบ

ความสามารถของจุลินทรีย์ในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่เพื่อเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์นั้นอาจผันแปรตามชนิดของจุลินทรีย์ ทั้งนี้การสร้างโปรโตพลาสต์ง่ายไม่ได้หมายความว่าจะต้องเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้ง่ายด้วย สำหรับเชื้อราโดยทั่วไปไม่เคยพบว่ามีรายงานที่การเปลี่ยนจากโปรโตพลาต์กลับไปเป็นเซลล์มีค่าสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ไม่ว่าจะทำในอาหารเหลว หรือ บน อาหารแข็ง (สาวิตรี,2536) เช่น

Fusarium culmorum มีความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์ไปเป็นเซลล์เท่ากับ 5-82 เปอร์เซ็นต์ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus midulans มีความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์ไปเป็นเซลล์เท่ากับ 10-30 เปอร์เซ็นต์ ทั้งใน defined medium และ complete medium

Schizophyllum commune พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ แต่มีค่าความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์เพียง 50 เปอร์เซ็นต์

10.การคัดเลือกเชื้อที่ได้จากการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชัน (Screening of protoplast fusion product)

เมื่อนำเชื้อสองชนิดมาทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น การหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ไม่สามารถที่จะกำหนดได้ว่าต้องเกิดขึ้นระหว่างโปรโตพลาสต์ต่างชนิดเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจมีการหลอมรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเชื้อต่างชนิดกัน ของเชื้อชนิดเดียวกัน ตลอดจนการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์หลายโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกัน ที่เรียกว่า multiple fusion ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่เหมาะสมสำหรับแยกโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันแล้ว (fused protoplast) ประเภทที่เราต้องการออกมาจากโปรโตพลาสต์ประเภทอื่น ๆ

การที่จะระบุว่าโปรโตพลาสต์ของคู่ที่นำมาทำฟิวชั่น สามารถหลอมรวมกันได้มากหรือน้อยนั้น ทำโดยหาค่าความถี่ของการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion frequency) ซึ่งหาได้จากสูตร

ความถี่ของการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์

$$= \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกัน}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

การหาความถี่ของการหลอมรวมกันนั้น ปกติจะประเมินจากรีคอมบิเนชันของ selectable genetic marker ร่วมกับการใช้ selective regeneration medium ซึ่งอาจจะทำโดยการนำโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันแล้ว ไปเลี้ยงบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

selective regeneration medium โดยตรงหรืออาจเลี้ยงบน non-selective regenaration medium ก่อนแล้วจึงถ่ายไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบว่าเป็นลูกผสมจริงหรือไม่ ภายหลังในกรณีเหล่านี้จะหาได้จากสูตร

ความถี่ของการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์

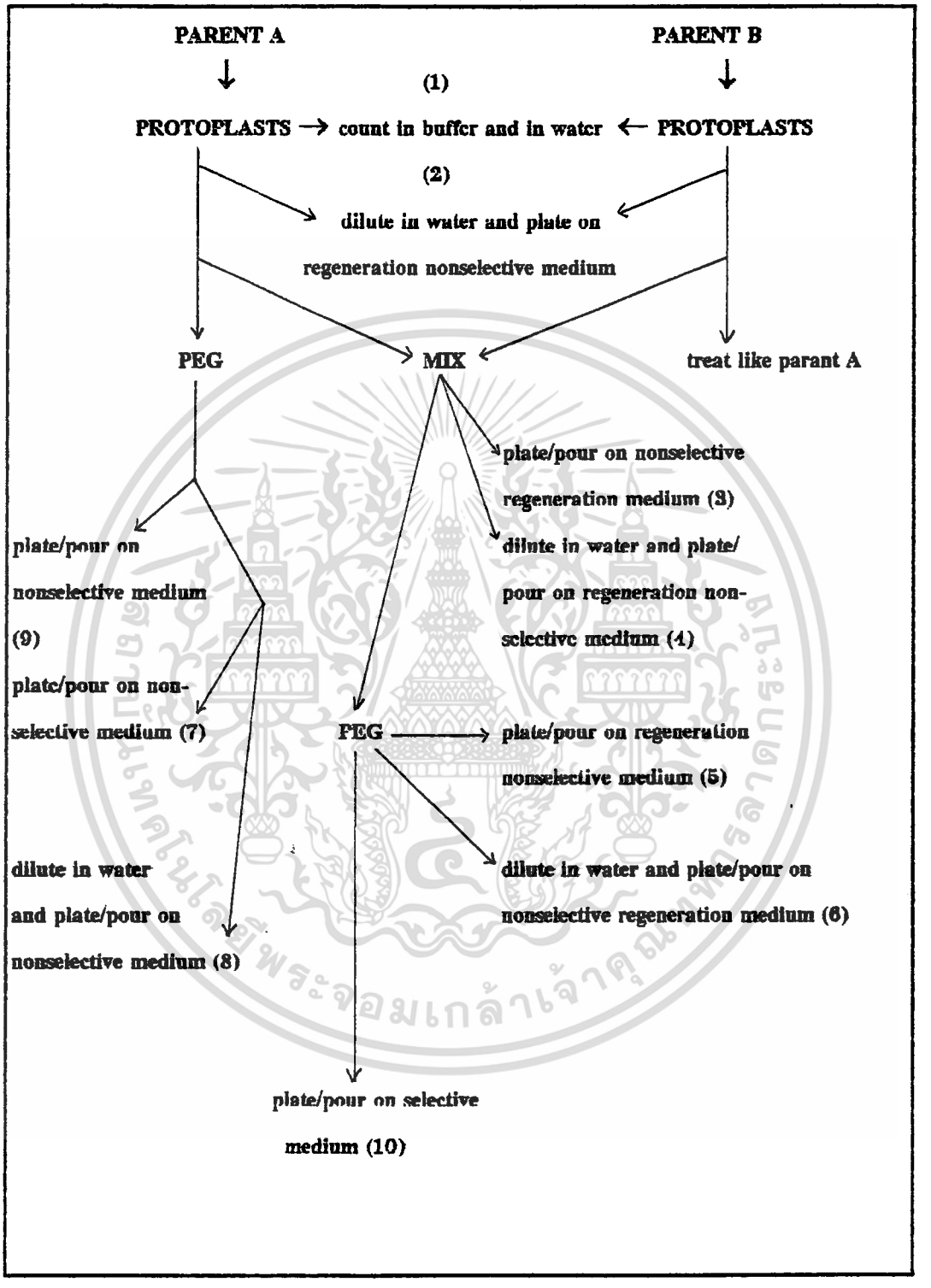
= <u>จำนวนโคโลนีบน selective regeneratin medium</u>

จำนวนโคโลนีบน complete regeneration medium

นอกจากนั้นการประเมินหาความถี่ของการหลอมรวมกันอาจทำโดยไม่ต้องใช้ recombination เช่น กรณีของ *Bacillus subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ถ้าใช้เชื้อกลายพันธุ์ของ *B.subtilis* ที่การสร้างสปอร์หยุดใน prespore stage เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงเชื้อก่อนที่จะมีการสร้างสปอร์ จากนั้นจึงนำมาเตรียมโปรโตพลาสต์และนำมาเหนี่ยวนำให้หลอมรวมกัน แล้วจึงตรวจหาโปรโตพลาสต์ที่มี 2 สปอร์ ซึ่งแสดงว่ามีการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์เกิดขึ้นโดยการทำ thin section และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

วิธีการทำโปรโตพลาสต์และการเลี้ยงโปรโตพลาสต์อย่างละเอียดศึกษาได้จากรูปที่ 8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 แสดงวิธีประเมินค่าความถี่ของการหลอมรวมกันของโปรโต-พลาสต์ และความถี่ของการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์

ที่มา : Beckerich และคณะ (1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ: # โปรโตพลาสต์ที่หาได้อาจคิดเป็นเปอร์เซ็นต์โปรโตพลาสต์ที่เหลือรอด (1) หรือ โดยคิดเป็นจำนวนโคโลนีที่ขึ้นก็ได้(2)

การ regeneration ของเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ทั้งสองที่จะทำการหลอมรวมกัน จะทำ regeneration แต่ละสายพันธุ์เพื่อ เป็นการเปรียบเทียบกัน (7) หรือใช้ผลที่ได้จากข้อ (7) -(8) กับผลข้อ (1)-(2)

ความสามารถในการเปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ของลูกผสมใน ข้อ (3) และอิทธิพลของ PEG ต่อการ regeneration จะนำมาเปรียบเทียบกัน ระหว่างข้อ (3) กับข้อ (5) ประสิทธิภาพในการรวมกันคือ จำนวนของ colony forming units ที่ขึ้นหลังจากใช้ PEG โดยผลต่างของ (5)กับ6) เป็นการเปรียบเทียบซึ่งเหมือนกันกับก่อนที่จะใช้ PEG ที่เปรียบเทียบระหว่าง (3) กับ (4)

อัตราการเปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ของแต่ละสายพันธุ์จะทำในข้อ (9)

ความถี่ของการหลอมรวมกันอาจจะวัดโดยอัตราส่วนของ (10) กับผลต่างของ (5) กับ (6)

ความถี่ของการหลอมรวมกัน = <u>จำนวนโคโลนีบน Selective medium</u>

จำนวนโคโลนีในข้อ (5) ลบ (6)

ความถี่ของการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับเป็นเซลล์

= <u>จำนวนโปรโตพลาสต์ในข้อ (9)</u>

จำนวนโปรโตพลาสต์ในข้อ (1)

ที่มา : Beckerich และคณะ (1984)

10. <u>Breeding กับ protoplast fusion</u>

การผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์อาจจะพิจารณาได้เป็น 3 ระดับ ในวงจรชีวิตของเชื้อรา คือ cytoplasmic interactions , sexual crosses และ parasexual crosses (รวมทั้งการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น) ปัจจัยของ extranuclear

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีบทบาทในด้านการทำยาปฏิชีวนะ sexual cycle เป็นการใช้พันธุศาสตร์ของเชื้อราทางอุตสาหกรรม ที่มีความสำคัญรองลงมา ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก เช่น penicillins , cephalosporins, citric acid เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามมักพบในสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด เช่น *Aspergillus midulans* กับ *Emericellopsis sp.*

Parasexual cycle นั้น เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ในการผลิตที่ได้รับสิทธิบัตรตั้งแต่ปี 1954 (National Research Development Corporation) การกลายพันธุ์นำมาใช้ในการเพิ่มสารปฏิชีวนะ Perse ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณภาพดีขึ้น เช่นการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ทำการผลิตให้มีคุณภาพขึ้นรวมถึงการปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตและลักษณะในการกรอง ในสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ amyloglucosidase ของเชื้อ *Aspergillus niger* (Ball et al,. 1978) และความสามารถในการสร้างสปอร์ใน *Penicillium chrysogenum* (Calam, Daglish and McCann, 1976) การนำลักษณะที่ดีลักษณะหนึ่ง มักได้มาจากสายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่ำ ในสายพันธุ์ที่สร้างผลผลิตที่ไม่หลากหลายใน reduction ขั้นแรก ๆ ของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีใน recombinant หรือการผสมสายพันธุ์ระหว่างการแยกยีนต่าง ๆ ของกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีออกมา พบว่าปัญหาหลักใหญ่ ๆ ของการทำ parasexual cycle นี้ก็คือ ขาดการค้นพบการ recombination ยกเว้นในการผสมระหว่างสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน (Macdonald,1968) ยีนของสายพันธุ์พ่อแม่จะเกิด segregation เนื่องจากเกิดยีนที่ผิดแผกแตกต่างกันออกไปในโครงสร้างของยีนใน homologous chromosome เป็นผลของการกลายพันธุ์ซ้ำ และ เกิด selection เมื่อเป็นเช่นนี้ ผลิตภัณฑ์ทั้งหลายที่เกิดการหลอมรวมกันทาง mitotic อาจจะไม่มีชีวิต อย่างไรก็ตามพบว่าสาร mutagens ทั้งหลายมีผลแสดงใน recombinogens เช่นเพิ่มอัตราการหลอมรวมกัน อาจจะเป็นไปได้เพราะว่ากลไกในกระบวนการทั้งสองเกิดขึ้นคล้ายคลึงกัน (Macdonald,1971)

การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น มีความสำคัญในการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมใช้ parasexual cycle เป็นวิธีใหม่ในการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคนี้เป็นพื้นฐานสำคัญในการผสมสายพันธุ์พวก parasexual เช่นการเพิ่มการผลิตยาปฏิชีวนะ อัตราการเจริญเติบโตและการสร้างสปอร์ บางทีอาจจะมีความสำคัญมากกว่านี้คือทำให้เกิดการเข้ากันได้หรือ compatibility ระหว่างสปีชีส์ต่าง ๆ การผสมสายพันธุ์ต่างสปีชีส์ หรือ interspecific fusions ให้ได้ผลิตผลใหม่ ๆ เป็นสิ่งที่น่าสนใจในปัจจุบัน ผลิตผลที่ได้อาจจะเป็นสาร secondary metabolites รวมถึง ยาปฏิชีวนะด้วย โดยอาศัยความรู้ทางด้านพันธุศาสตร์แบบใหม่และสภาวะทางชีวเคมีมาสร้างเกิดเป็นผลผลิตตามที่ต้องการได้ ลูกผสม interspecific hybrids จะได้จากการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นระหว่างเชื้อราที่สร้างเส้นใยที่มีรายงาน เช่น การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นระหว่าง *Penicillium chrysogenum* กับ *Penicillium notatum* (Anne &Peberdy ,1976) *P.chrysogenum* กับ *P.cyaneofulvum* และ *P. chrysogenum* กับ *P.citrinum* ,*P.citrinum* กับ *P.cyaneofulvum* (Anne,Eyssen and de Sauer,1978) *Aspergillus nidulans* กับ *Aspergillus rugulosus* (Kevei and Peberdy,1979)

การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นเริ่มจาก parasexual cycle และได้เป็นการผสม diploidy และ mitotic recombination และ การ segregation อัตราการมีชีวิตรอดจริง ๆ แล้วขึ้นอยู่กับสปีชีส์และสภาวะที่ใช้ทั้งหมดด้วย เพราะว่าความถี่ของการหลอมรวมกันของผลผลิตที่ได้จะต่ำ จึงใช้วิธีนี้ในการตรวจสอบเพื่อคัดแยกลูกผสม จะดีกว่า เช่น สายพันธุ์พ่อแม่อาจจะเป็น auxotroph มีความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตแตกต่างกัน และของผสมที่ทำการหลอมรวมกันนำมาเลี้ยงบนจากเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมอาหารอื่นลงไปใน minimal medium ดังนั้น โปรโตพลาสต์ที่เป็น prototroph เท่านั้นจึงจะสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ recombinant ที่เป็น hapoild หรือ diploid ขึ้นอยู่กับ parasexual cycle ในระหว่างกระบวนการที่เกิดขึ้น

มีเทคนิคหนึ่งที่น่าสนในการใช้คัดเลือกทางพันธุศาสตร์เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ genetic marker เป็นตัว identifying ในสายพันธุ์พ่อแม่ วิธีหนึ่งที่ใช้ได้เช่นการใช้ complementary specific metabolic inhibitors(Nehls,1978 : Wright,1978) แต่ละสายพันธุ์ถูกยับยั้งทางเมตาบอลิกที่แตกต่างกันโดยสารเคมี และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่สามารถที่จะเจริญเติบโตได้เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้จะถูกยับยั้งอย่างถาวร ผลผลิตที่ได้จากการหลอมรวมกัน จะมีกลุ่มเอนไซม์ที่ทำงานได้ครบสมบูรณ์และสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ การใช้วิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องทำการตรวจสอบทางพันธุศาสตร์ของสายพันธุ์ทั้งหมด เพราะว่าโคโลนีจำนวนมากที่ขึ้นหลังจากทำโปรโต-พลาสต์ฟิวชั่นจะต้องเป็นลูกผสม(hybrid) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้อาจจะสะดวกหรือใช้ได้กับกรณีที่มี non-selective markers ในกรณีที่ทำตามกระบวนการทั้งหมด

11.การคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น(Screening of protoplast fusion product)

การคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสม จากการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ ได้มีการศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมและเกี่ยวข้อง ในการคัดเลือกมากมายถึงเครื่องหมายยีน (genetic marker) ที่กำหนดลักษณะทางสรีระวิทยาของจุลินทรีย์แต่ละชนิด อาทิเช่น เชื้อรา *Aspergillus nidulans* และ *Penicillium chysogenum* ได้มีการเก็บรักษาเครื่องหมายีนเชื้อราเหล่านี้ไว้ใน Fungal Genetics Stock Culture และมหาวิทยาลัย Glasgow ประเทศ สก็อตแลนด์ ส่วนเชื้อราอื่น ๆ นั้นได้มีการศึกษาการกลายพันธุ์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อทำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ ต้องทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้กลับมาเป็นเซลล์ใหม่ โดยอาศัยคุณสมบัติของความต้องการสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญ นิยมใช้ในเชื้อราที่สำคัญ ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคพืช เนื่องจากสารอาหารเหล่านี้ จำเป็นต่อกิจกรรมการเจริญ และสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่สำคัญของเซลล์ที่มีค่าทางเศรษฐกิจ

สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติต้านทานต่อ สารยับยั้งการเจริญ(fungicide) หรือสารยับยั้งการเจริญอื่น ๆ อาทิเช่น เชื้อราที่ทนทานต่อ คลอเรท (chlorate) และ (selenate) สามารถใช้ ไนเตรท(nitrate) และ ซัลเฟต(sulfate) ในอาหารที่ใช้ในการเจริญได้ จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้สามารถแยก หรือ คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ต้องการออกมาได้ (Toyama and Toyama ,1988) แต่ว่าลักษณะทางสรีรวิทยา ไม่จำเป็นเสมอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปที่ใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลายในเชื้อราบางชนิดที่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงจากสายพันธุ์พ่อแม่ ได้ด้วยตาเปล่า (Lein , 1986)

อย่างไรก็ตามการศึกษาปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสมนั้น มักกระทำในเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็น eukaryote มากกว่าจุลินทรีย์พวก prokaryote เช่นใน *Steptomyces* และ *Bacillus* มักทำการคัดเลือกสายพันธุ์โดยอาศัยคุณสมบัติความเป็นขั้วของเชื้อแต่ละชนิด (Hopwood, 1981)

โดยปกติสายพันธุ์พ่อแม่มักไม่ทนทานต่อ อุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม ยาปฏิชีวนะ หรือ รังสีอุลตร้าไวโอเลต ดังนั้นการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้ทนทานต่อภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ โดยการหลอมรวมโปรโตพลาสต์กับสายพันธุ์ที่ทนทาน อาจมีผลทำให้ได้สายพันธุ์ที่ทนทานต่อภาวะต่าง ๆ ได้ โดยทำการคัดเลือกในอาหาร minimal media แล้วหาอัตราการกลับมาเป็นเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ อัตราการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ นอกจากนี้ การหลอมรวมของโปรโตพลาสต์จากเชื้อจุลินทรีย์สองสายพันธุ์ที่ผ่านรังสีอุลตราไวโอเลต มีผลให้ได้สายพันธุ์กลายเพิ่มขึ้นโดย รังสีอุลตราไวโอเลตมีผลเพิ่มการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอนเอ (deoxyribonucleic acid) ระหว่างโปรโตพลาสต์ (Hopwood , 1981)

การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชัน ระหว่างเชื้อสองชนิดจำนวนมากเข้าด้วยกัน การหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ไม่สามารถกำหนดได้ว่า ต้องเกิดในโปรโตพลาสต์ต่างชนิดเท่านั้น อาจเกิดการหลอมรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์จากเชื้อชนิดเดียวกันหรือต่างกัน(multifusion)ก็ได้ ดังนั้นต้องมีวิธีที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันแล้ว (fused protoplast) ประเภทที่เราต้องการออกมาจากโปรโตพลาสต์ประเภทอื่น

การใช้ selectable genetic marker ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective medium เป็นวิธีการที่นิยมใช้มากเพราะทำให้แยกโปรโตพลาสต์ที่ต้องการที่หลอมรวมกันแล้ว ออกมาง่ายขึ้น สำหรับ selectable genetic marker ที่นิยมมาก คือ auxotrophic marker จะใช้ในอาหาร minimal medium เป็น selective medium บนอาหารนี้ สายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นทั้งสองที่เป็น auxotroph ซึ่งเป็นเชื้อกลายพันธุ์ที่ขาดความสามารถในการสร้างสารอาหารบางอย่าง เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และวิตามินบางชนิด ไม่สามารถเจริญได้ แต่ถ้าโปรโตพลาสต์มีการหลอมรวมกันแล้ว ยีนเกิด complementation ได้เป็นสายพันธุ์ prototroph ซึ่งเจริญบนอาหาร minimal media เนื่องจากสร้างธาตุอาหารทุกชนิดได้ สำหรับการใช้ auxotrophic marker มีรายงานในจุลินทรีย์หลายชนิด

ตัวอย่างการใช้ auxotrophic marker สำหรับการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆมีดังต่อไปนี้

-*Bacillus subtilis* โดยใช้สายพันธุ์พ่อแม่เป็น polyauxotrophic strain (Schaeffer และคณะ)

-*B. megaterium* ใช้เชื้อ doubly auxotrophic strain 2 สายพันธุ์ (Fodor; 1976)

-*Schwanniomyces alluvius* ต่างสายพันธุ์ ระหว่าง *S. alluvius* และ *Saccharomyces cerevisiae* (Wilson และคณะ ; 1982)

-*Kluyveromyces fragilis* กับ *S. cerevisiae* (Farahnak และคณะ ; 1986)

-*Aspergillus niger* (Kirimura และคณะ)

-*Coprinus macorhizus* (Kiguchi และคณะ)

-*Trichoderma harzianum* (Stasz และคณะ ; 1988 และ Chet ;1990)

-*Aspergillus nidulans* และ *A.rugulosa* (Kevei และ Peberdy; 1977)

-*Pleurotus ostreatus* (Ohmasa และคณะ ; 1986)

นอกจาก auxotrophic marker อาจเลือกใช้ marker ชนิดอื่น เช่น drug (antibiotic) resistant marker ความต้องการวิตามิน และความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน โดยมีผู้แนะนำว่า ในกรณีที่ marker เหล่านั้นไม่สามารถคัดเลือกได้โดยตรง เช่นเมื่อการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ใหม่ บนอาหาร complete media ที่มีเจลาติน นานประมาณ 24 ชั่วโมงก่อน ต่อจากนั้นจึงละลายเจลาตินโดยเอนไซม์เจลาติเนส แล้วถ่ายเซลล์ปกติลงบนอาหาร selective media ภายหลัง

ใน *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากใช้สายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็น auxotroph ที่ต้องการธาตุอาหารต่างกันแล้ว อาจใช้สายพันธุ์หนึ่งเป็น auxotroph ส่วนอีกสายพันธุ์หนึ่งเป็น respiratory deficient mutant เมื่อทั้งคู่หลอมรวมกันแล้วจะเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้บนอาหาร minimal media ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น สารประกอบคาร์บอนที่ใช้ไม่ได้ในการหมัก เช่น กลีเซอรอล อะซิเตท และเอทานอล ในขณะที่สายพันธุ์เดี่ยวก่อนหลอมรวมกันไม่สามารถเจริญบนอาหารชนิดนี้ได้ เช่น การหลอมรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง Saccharomyces cerevisiae ระหว่างสายพันธุ์ที่เป็น auxotroph กับสายพันธุ์ที่เป็นrespiratory deficient mutant ทำการแยกลูกผสมโดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กลีเซอรอล (Seki และคณะ ; 1983)

ในเชื้อรา *Monascus* sp. มีความสามารถในการใช้แหล่ง คาร์บอน ไนโตรเจน และธาตุอาหารอื่น ๆ ได้ต่างกันในแต่ละสปีชีส์ Pastrama และคณะ (1994)ได้พบว่าในอาหารที่มี กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และ กรดกลูตามิกเป็นแหล่งไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถเพิ่มปริมาณสีที่ผลิตได้

Mchan และ Johnson (1970) พบว่า *Monascus purpureus* สามารถเจริญได้ในอาหาร glucose-peptone-yeast extract ได้ดีกว่าอาหารทั่ว ๆ ไป และการเจริญแตกต่างจากเมื่อเชื้อเจริญในอาหาร czapek -dox minimal -salts glucose broth และเมื่ออาหารมีกรดอะมิโนบางชนิดรวมกับสังกะสี อัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้น เนื่องจากสังกะสีเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญ เพราะสามารถควบคุมกลไกการใช้ สารประกอบ คาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนของเซลล์ได้ ความสัมพันธ์ของ กรดอะมิโน และสังกะสีต่อการเจริญของ *Monascus purpureus* แสดงได้ดังตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธุ์ของ ความเข้มข้นกรดอะมิโนต่อการเจริญของ *Monascus perpureus* เมื่อเติมสังกะสี 210 ไมโครกรัมต่อลิตร ในอาหาร czapek dox medium ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน

ที่มา : Mchan และ Johnson,1970

กรดอะมิโน	ความเข้มข้นกรดอะมิโน (กรัม ต่อลิตร)	น้ำหนักแห้งของเซลล์เมื่อไม่เติมสังกะสี (กรัม)	น้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อเติมสังกะสี (กรัม)
ไม่มี	0	0.046	0.436
Tryptophane	0.086	0.204	0.821
Leucine	0.530	0.438	0.668
Aspartic acid	0.845	0.210	0.644
Tyrosine	0.260	0.201	0.599
Glycine	2.420	0.156	0.596
Histidine	0.143	0.161	0.588
Threonine	0.330	0.257	0.518
Isoleucine	0.345	0.579	0.505
Methionine	0.122	0.222	0.504
Arginine	0.839	0.328	0.497
Glutamic acid	1.425	0.350	0.497
Phenylalanine	0.340	0.214	0.468
Valine	0.490	0.261	0.450
Lysine	0.630	0.010	0.023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเชื้อสองสายพันธุ์มาทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น การหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ไม่สามารถที่จะกำหนดได้ว่าต้องเกิดขึ้นระหว่างโปรโตพลาสต์ต่างชนิดกันเท่านั้น ดังนั้นจึงอาจมีการหลอมรวมกันระหว่างโปรโตพลาสต์ของเชื้อราต่างชนิดกัน หรือของเชื้อชนิดเดียวกัน ตลอดจนการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์หลายโปรโตพลาสต์เข้าด้วยกัน ที่เรียกว่า multiple fusions ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่เหมาะสมสำหรับแยกโปรโตพลาสต์ที่หลอมรวมกันแล้ว(fused protoplast) ประเภทที่เราต้องการออกมาจากโปรโตพลาสต์อื่น ๆ ซึ่งมีหลายวิธีที่สามารถคัดหาลูกผสมโปรโตพลาสต์ที่ได้ ดังตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 วิธีการใช้แยก heterokaryon ที่เกิดจากการทำโปรโต-พลาสต์ฟิวชั่น

1.การใช้ auxotrophic และ drug resistance markers	เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์จะถูกคัดแยกออกโดยใช้ marker แยก heterokaryon ออก selective media ที่ใช้มักเป็น minimal media ส่วน drug resistance มักใช้ในกรณีที่ยีนที่แสดงออกมีคุณสมบัติดื้อยา ตัว marker ทั้งสองชนิดจะนำไปใช้กับสายพันธุ์หนึ่งสายพันธุ์เดียวเท่านั้น ของผสมที่ได้จะถูกคัดแยกออกบน minimal media ที่ประกอบด้วยสารยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibitor)
2. การใช้ metabolic poisions	จุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์จะใส่ metabolic poisions ที่แตกต่างกัน ซึ่งจะไปมีผลกระทบต่อเชื้ออย่างจำเพาะเจาะจงมาก การใช้จะต้องระมัดระวังเพื่อป้องกันการเกิดการหลอมรวมกันมากเกินไป หรือ carry-over เกิดขึ้น fusion product ที่ได้จะถูกเปลี่ยนไปเนื่องจาก การเติมสารที่ไปยับยั้งโครงสร้าง
3. polarized crosses: UV kill heat shock fungicidal chemicals	ในการคัดแยกแบบนี้ โปรโตพลาสต์ที่ไม่มีชีวิตรอด จะหาได้โดยการใช้สาร lethal agents ในการหลอมรวมกันโปรโตพลาสต์ที่มีชีวิตอยู่ซึ่งมี selectable marker โดยปกติแล้วเป็น auxotrophic marker ของผสมที่เกิดจากการหลอมรวมกันจะถูกแยกออกบน minimal media

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. การวิเคราะห์เชื้อที่ได้จากการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น(Analysis of protoplast fusion product)

การพิสูจน์ว่า fusant ที่ได้เป็นลูกผสมที่แท้จริงหรือไม่นั้น มีหลายวิธี คือ

1. สัณฐานวิทยาของเซลล์และโคโลนี

2. ขนาดของเซลล์

3. ปริมาณ DNA ภายในเซลล์

4. การย้อมสีนิวเคลียส ดูลักษณะเปรียบเทียบกับพ่อแม่

5. การสร้างสปอร์ ถ้าสายพันธุ์พ่อแม่เป็น haploid fusant ที่ได้ควรเป็น diploid ที่สามารถสร้างสปอร์แบบมีเพศได้ และสปอร์นั้นสามารถเกิด mating กันได้

6. ปล่อยให้ selectable genetic marker เกิดการแยกตัวออกจากกันเอง (spontaneous segregation)

7. เหนี่ยวนำให้ selectable genetic marker เกิดการแยกตัวออกจากกัน (induced segregation) โดยการใช้สารเคมี เช่น para-fluorophenyl-alanine และ benomyl หรือ โดยใช้ตัวกระทำทางกายภาพ (physical agent) เช่น รังสีอัลตร้าไวโอเลต ซึ่งได้พิสูจน์แล้วว่าจะชักนำให้เกิดการแยกตัวออกจากกัน โดยการแบ่งตัวแบบไมโตซิส(mitotic segregation) ได้

8. การเปรียบเทียบแบบอย่างของ assimilation และการหมัก (fermentation) สารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจน

9. ทำ DNA hybridization โดยมีตัวติดตาม (probe) ที่เหมาะสม

10. การวิเคราห์แบบอย่างของไอโซเอนไซม์ (isoenzyme pattern) โดยการใช้อิเล็คโตรโฟเรซิส(electrophoresis) สำหรับโปรตีน

11. การวิเคราะห์แบบอย่างของโครโมโซม (chromosome pattern) โดย pulsed field alternation electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 เชื้อรา *Monascus* sp. KB11304 แยกโดย น.ส. วรรณภา ทาบโลกา (วรรณภา,2529) เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ที่แยกได้จากข้าวแดง สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังในการเจริญ และการสร้างสารสีแดงได้ดี

1.2 เชื้อรา *Monascus* sp. KB10M16 แยกโดย น.ส. นิภา กระทุ่มเขตต์ เป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Monascus* sp. KB11304 ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต เป็นเวลา 10 นาที สร้างสารสีแดงได้มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 1.5 เท่าตัว

1.3 เชื้อรา *Monascus* sp. KB 20 M10.2 แยกโดย นาย สมชาย ไกรรักษ์ เป็นเชื้อรากลายพันธุ์มาจากสายพันธุ์ KB10M16 ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต เป็นเวลา 20 นาที สร้างสารสีเหลืองได้ดี ที่ พีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกลาง

1.4 เชื้อรา *Monascus* sp. KB20M1 แยกโดย นางสาว นิสา บุตรดา เป็นเชื้อรากลายพันธุ์มาจากสายพันธุ์ KB11304 ด้วยแสงอุลตร้าไวโอเลต เป็นเวลา 20 นาที ไม่สร้างสีทั้งในเส้นใยและในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เก็บรักษาเชื้อ ใช้อาหารวุ้นเอียง MYS (ภาคผนวก ก.) ตามวิธีของวรรณภา(2529) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน นำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพิ่มจำนวนของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ ใช้อาหารเหลว MYS โดยบ่มเชื้อที่อุณภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7-10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ MYS broth ใช้เตรียมเส้นใยในปริมาณมากในการแยกโปรโตพลาสต์ เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ hypertonic czapek dox medium ใช้บ่มโปรโตพลาสต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเลี้ยงโปรโตพลาสต์ให้สร้างผนังเซลล์ อาหาร hypertonic hennerberg medium (complete medium) ใช้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4-7 วัน

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบโปรโตพลาสต์ อาหาร non-hypertonic hennerberg medium ใช้ตรวจสอบโปรโตพลาสต์ โดยเลี้ยงโปรโตพลาสต์ในอาหารที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4-7 วัน

2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับคัดเลือกลูกผสมที่ได้ อาหาร minimal medium ที่เติมกรดอะมิโนที่ต้องการของสายพันธุ์กลายที่เป็น auxotrophic mutant โดยเลี้ยงลูกผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4-7 วัน

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหา auxotrophic mutant ใช้อาหาร synthetic minimal medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 10-12 วัน

2.9 อาหารสำหรับยืนยันผล ความเป็น auxotroph mutant ใช้อาหาร synthetic minimal medium ที่เติม adenine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้เพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าพร้อมควบคุมอุณหภูมิ (controlled environment incubator shaker) ของ New brunswick scientific edison ,N.J.,U.S.A.

2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ของ Hirayama manufacturing corporation Japan.

3. เครื่องชั่งแบบหยาบ ของ Precisa 300 M

4. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ของ Sartorius analytic 0140-34

5. ตู้ปลอดเชื้อ (aseptic box) ของบริษัท OGWA SEIKI OSK 7868 B

6. เครื่อง centrifuge ของ Hettich universal

7. commercial laboratory blender ของ Waring

8. กล้องจุลทรรศน์ ของ Nikon Labophot Japan 126117

9. microwave ของ philco

10. pH meter model HM-7E ของ TOA Electronics Ltd, Japan.

11. shaker ความเร็วรอบต่ำ ๆ ของ KS 500 Janke&Kunkel IKA-werk

12. syntheglass ของ SCHOTT Duran West Germany

13. haemacytometer ของ Boeco Germany deep 1/10 mm.

14. objective micrometer ของ Nikon Japan 0.01 mm.

15. เครื่องแก้ว

4. สารเคมี

4.1 เอนไซม์ chitinase, cellulase ,zymolyase ,lysing enzyme (ดูภาคผนวก)

4.2 กรดอะมิโน 20 ชนิด (ดูภาคผนวก)

4.3 สารรักษาแรงดันออสโมติกของโปรโตพลาสต์ (osmoticum buffer) (ดูภาคผนวก)

4.4 สารเคมีสำหรับหาปริมาณ DNA ในเส้นใย (ดูภาคผนวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.การเตรียมต้นเชื้อของเชื้อรา *Monascus* sp. 4 สายพันธุ์ คือ KB20M1, KB20M10.2, KB11304 และ KB10M16 เลี้ยงในอาหาร MYS โดยการเจาะชิ้นวุ้นด้วย cork borrer ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร โดยเจาะบริเวณรอบนอกเพราะว่าเชื้อจะมีอายุน้อยที่สุด นำไปวางบนอาหาร MYS ในสภาวะอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.การเลี้ยงเชื้อราโมแนสคัสในอาหารเหลว MYS medium

นำชิ้นเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง MYS ของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ จำนวน 4 ชิ้น ต่อฟลาสก์ ใส่ในอาหารเหลว MYS พีเอชเริ่มต้น 7.0 บรรจุอาหาร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หรือ ประมาณ 48-50 ชั่วโมง

3.การทำเส้นใยให้ละเอียด

นำเชื้อราที่เลี้ยงไว้เป็นเม็ดละเอียด (pellet) ที่ได้จากข้อ 2 มาทำการ homogenized เพื่อให้ง่ายต่อการทำงานของเอนไซม์ ในการย่อยผนังเซลล์ โดยใช้เครื่องปั่น (blender) ความเร็วสูงสุด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MYS ต่ออีกประมาณ 24-30 ชั่วโมง (ก่อนที่เส้นใยจะสร้างสปอร์)

4.ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

4.1 ทำการแยกโปรโตพลาสต์ ตามวิธีดังต่อไปนี้ คือ

- นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และล้างด้วย 0.8 M ของ $MgSO_4$ ใน citrate buffer 0.2 M พีเอช 5.5 เป็นสารละลายรักษาแรงดันออสโมติกของโปรโตพลาสต์ ให้ชื่อย่อว่า CPW(cleaning protoplast washing)

- ชั่งเส้นใยเปียก 0.3 กรัมของเชื้อทั้ง 4 ชนิด ใส่สารละลายเอนไซม์ 5 มิลลิลิตรใน จานแก้วขนาดเล็ก ซึ่งใช้เอนไซม์ต่าง ๆ กันดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก. ใช้สารละลายเอนไซม์ผสม 3 ชนิดคือ chitinase: zymolyase : cellulase เป็นอัตราส่วนเท่ากับ 1: 1: 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข.ใช้สารละลายเอนไซม์ผสม 3 ชนิดคือ chitinase: zymolyase : cellulase เป็นอัตราส่วนเท่ากับ 1: 2: 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค.ใช้สารละลายเอนไซม์ผสม 3 ชนิดคือ chitinase: zymolyase : cellulase เป็นอัตราส่วนเท่ากับ 1: 1: 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ง.ใช้สารละลายเอนไซม์ผสม 3 ชนิดคือ chitinase: zymolyase : cellulase เป็นอัตราส่วนเท่ากับ 1: 2 : 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จ.ใช้สารละลายเอนไซม์ผสม 3 ชนิดคือ chitinase: zymolyase : cellulase เป็นอัตราส่วนเท่ากับ 3 : 2.5 : 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมกับเชื้อรา *Monascus* sp. KB6SR (ชุลี,2536)

ฉ.ใช้สารละลายเอนไซม์สำเร็จรูป คือ lyzing enzymes 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

นำ petridish ที่มีเส้นใยและเอนไซม์ต่าง ๆ กันอยู่ ไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบประมาณ 100 รอบต่อนาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

4.2 ทำการตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ ทุก ๆ ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ haemacytometer พร้อมทั้งสังเกตลักษณะของเส้นใยขณะถูกย่อยผนังเซลล์ออกด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด ในเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์

4.3 บันทึกผลการทดลอง นับจำนวนโปรโตพลาสต์ทุกชั่วโมง เพื่อหาเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเกิดโปรโตพลาสต์จำนวนสูงสุด

<u>5.ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์และเวลาในการเกิดโปรโตพลาสต์สูงที่สุด</u>

ทำการแยกโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมที่ได้ในข้อ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.1 ทำการแยกโปรโตพลาสต์ ในสภาวะเดียวกับข้อ 4 แต่เลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมมาหาปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ที่ทำให้จำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด สำหรับเชื้อราโมแนสคัสทั้ง 4 สายพันธุ์ ดังนี้

ก. ใช้เอนไซม์ปริมาณ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. ใช้เอนไซม์ปริมาณ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. ใช้เอนไซม์ปริมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ง. ใช้เอนไซม์ปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 นับจำนวนโปรโตพลาสต์ ของแต่ละสภาวะทั้ง 4 เชื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วย haemactyometer ทุกหนึ่งชั่วโมง พร้อมสังเกตลักษณะเส้นใยที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

5.3 บันทึกผลการทดลอง เขียนผลจำนวนโปรโตพลาสต์ ที่นับได้ในทุกชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ต่าง ๆ กัน ของเชื้อราโมแนสคัส 4 สายพันธุ์

6.ศึกษาผลของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์

1.เลี้ยง *Monascus* sp. 4 สายพันธุ์ในอาหาร malt yeast extract agar เป็นเวลา 7 วัน

2.ได้เส้นใยที่เจริญเต็มที่ เจาะชิ้นวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่เลี้ยงบนอาหารแข็งคือ synthetic minimal media ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นชนิดละ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Fred และคณะ; 1974) โดยใส่กรดอะมิโนต่าง ๆกันลงไปในอาหารตามตารางที่ 7 เช่น สูตร A เติมกรดอะมิโน adenine, histidine, phenylalanine และ glutamic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงสูตรอาหารที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ กัน

ที่มา : (Fred และคณะ ;1974)

สูตรอาหาร	A	B	C	D	E
F	adenine	guanine	cysteine	methionine	uracil
G	histidine	leucine	isoleucine	valine	lysine
H	phenylala -nine	tyrosine	tryptophane	threonine	proline
I	glutamic acid	serine	alanine	aspartic acid	arginine

ตารางที่ 8 แสดงสูตรอาหารที่เติมกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ กัน

สูตรอาหาร	กรดอะมิโน
J	glutamic,aspartic,isoleucine,valine, leucine,lysine
K	methionine,glycine, serine,phenylalanine,cysteine, tryptophane
L	isoleucine,valine,phenylalanine, arginine,histidine,threonine
M	leucine,cysteine,histidine,proline, alanine
N	lysine,tryptophane,threonine, alanine,tyrosine
O	adenine
P	uracil

**อาหารควบคุมเป็น minimal media ที่ไม่มีกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ใช้คอร์ก บอร์เรอร์ เจาะวุ้นที่มีเชื้อเจริญอยู่ที่เลี้ยงในอาหาร malt yeast extract agar โดยให้มีอาหาร วุ้นเก่าติดมาน้อยที่สุด จากนั้น นำมาเลี้ยงในอาหาร synthetic minimal media เป็นเวลา 10-12 วัน

4. เมื่อครบกำหนด วัดระยะเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของโคโลนี โดยการพิจารณาว่าในอาหารใดที่เชื้อมีการเจริญ

5. เมื่อตรวจผลการเจริญแล้ว ทราบว่าเชื้อราทั้ง 4 ชนิด ต้องการกรดอะมิโน ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดใดในการเจริญ จึงทำการทดสอบผลที่แน่นอนอีกครั้ง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร synthetic minimal media ที่มีกรดอะมิโนที่ต้องการเปรียบเทียบ กับกรดอะมิโนทั้งหมดที่เหลือ

7.การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น

นำโปรโตพลาสต์ที่อยู่ในสารละลายเอนไซม์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว นำไปกรองด้วย syntheglass ล้างด้วยสารละลาย CPW อย่างน้อย 2 ครั้ง นำไปเหวี่ยงแยกโปรโตพลาสต์ออกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 700 g หรือประมาณ ไม่เกิน 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย KCl 0.6 M โดยเหวี่ยงให้เซลล์ ตกตะกอนอยู่ข้างล่าง ล้างสารละลายเอนไซม์ออกด้วย KCl ใช้ pasture pipett ดูดออกมา นับจำนวนโปรโตพลาสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วย haemacytometer ทำให้โปรโตพลาสต์เข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

7.1 ทำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์

โดยวิธีของ Anne และ Pebedy(1976) หลังจากเตรียมโปรโตพลาสต์ได้แล้วนำไปผสมรวมกันระหว่างสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสีแต่เจริญเติบโตได้ไว *Monascus*.sp KB20M1 กับสายพันธุ์ที่โตช้าแต่สร้างสี *Monascus*.sp KB11304 , KB10M16 , KB20M10.2 และนำไป centrifuged ที่ 700 g เป็นเวลา 5 นาที ของผสมโปรโตพลาสต์จะถูกละลายใน 0.05 M Glycine NaOH buffer พีเอช 7.5 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย $CaCl_2$ 0.05 M และ polyethylene glycol น้ำหนักโมเลกุล 6000 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โปรโตพลาสต์จะเก็บเกี่ยวได้โดยการเหวี่ยงที่ความเร็ว 700 g เป็นเวลา 5 นาที นำไปละลายเพื่อเจือจางPEG (เนื่องจาก PEG เป็นพิษต่อเซลล์) โดยการเติม hypertonic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

czapek dox medium และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.2 ทำการเลี้ยงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ (rgeneration)

โดยนำโปรโตพลาสต์ที่ได้หยดลงในอาหาร MM และ CM ที่มีวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี spread plate และเททับด้วยอาหารที่มีวุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 4-7 วัน ทำการทดลองดังรูปที่ 8 (ตรวจเอกสาร)

8. การสกัดและหาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

8.1 การสกัดดีเอนเอ

ทำตามวิธีของ Schneider(1956) โดยเลี้ยงเส้นใยสายพันธุ์ต้นแบบจำนวน 2 โคโลนี และลูกผสม(fusant) ที่คัดเลือกแล้วจำนวน 7 โคโลนี ในอาหารเหลว MYS 75 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 1 เชื้อ นำไปเลี้ยงที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน โดยใส่ลูกแก้วลงไปในขวดทรงกรวยด้วย เพื่อให้เส้นใยกระจายตัวได้ดี โดยใช้เส้นใยสด อายุ 4 วัน ประมาณ 5 กรัม ปั่นแยกเส้นใยที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง เติม 5 มิลลิลิตร ของ 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล ต่อน้ำในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 ปั่นแยกอีกครั้งเอาเฉพาะเส้นใยมาเติมด้วย 5 มล. ของ 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอล ปั่นแยกครั้งที่สาม เอาเฉพาะ เส้นใยมาเติมสารละลาย ยีเซอร์ ต่อเอธานอล (ภาคผนวก) ทำเช่นนี้ติดต่อกัน 3 ครั้ง แยกเส้นใยที่ได้ครั้งสุดท้ายออกมา ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เติม 5 มิลลิลิตร ของกรดเพอคลอริค (ภาคผนวก) นำไปตั้งบนอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำให้เย็นทันที ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปปั่นที่ 4000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด

8.2 การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด

เพื่อเป็นการยืนยันว่าลูกผสมที่ได้เป็นลูกผสมที่เกิดจากการทำโปรโต-พลาสต์ฟิวชั่น จึงทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่กับลูกผสมที่ได้ตามวิธีของ Furton (1956) และ Stumpf(1947) โดยใช้ไดเฟนีลามีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รีเอเจนต์ (ภาคผนวก) วัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และใช้คาล์ฟ ไทมัส ดีเอนเอ เป็นดีเอนเอมาตรฐาน เพื่อเปรียบเทียบหา ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด ทำตามขั้นตอนดังนี้

- นำ 1 มิลลิลิตรของส่วนน้ำใสที่สกัดได้จากข้อ 8.1 มาเติม 2 มิลลิลิตร ของสารละลายไดเฟนีลามีน และเติม 0.1 มล. ของสารละลายอะเซทาลดีไฮด์ เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง

-วัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาค่าของปริมาณดีเอนเอทั้งหมด โดยใช้คาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์กับการแยกโปรโตพลาสต์

เมื่อทดลอง ใช้เอนไซม์ต่างกัน ที่ความเข้มข้นต่างกัน โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงอัตราส่วนของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ กันที่ใช้ในการหาเอนไซม์ที่เหมาะสมในการแยกโปรโตพลาสต์

รหัส	ชนิดเอนไซม์ที่ใช้	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
A	Chitinase:Zymolyase:Cellulase	1:1:1
B	Chitinase:Zymolyase:Cellulase	1:2:1
C	Chitinase:Zymolyase:Cellulase	1:1:2
D	Chitinase:Zymolyase:Cellulase	1:2:2
E	Chitinase:Zymolyase:Cellulase	3:2.5:5
F	Lysing enzyme	3

เมื่อทดลองใช้เอนไซม์ตามตารางที่ 9 มาทดสอบผลการแยกโปรโตพลาสต์ในเวลา 3 ชั่วโมง ของเชื้อรา *Monascus* sp. KB 11304 ได้ผลดังตารางที่ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในการแยกโปรโตพลาสต์ ของเชื้อ *Monascus*.sp. KB11304 จากตารางที่ 9

รหัส	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3
A	0	8.3×10^4	1.11×10^5
B	0	5.5×10^4	1.66×10^5
C	0	8.3×10^4	1.66×10^5
D	0	1.11×10^5	1.11×10^5
E	2.77×10^4	3.33×10^5	2.5×10^5
F	1.38×10^5	2×10^6	9.25×10^6

จากผลการทดลองที่ได้ดังตารางทำให้สรุปได้ว่า สารละลาย lysing enzymeที่ใช้มีประสิทธิภาพ มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ จึงทำการทดลองเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของ lysing enzymeที่ให้ผลผลิตจำนวนโปรโตพลาสต์สูงที่สุด ในขั้นต่อไป

2. การทดลองเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์

ตารางที่ 11 แสดงความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ทุกๆ ชั่วโมงเป็นเวลา 3 ชั่วโมงของ เชื้อ *Monascus sp.* KB11304

ความเข้มข้นของ lysing enzyme (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3
0.5	1.08×10^6	2.13×10^6	1.27×10^6
1	1.66×10^6	3.11×10^6	4.55×10^6
2	1.38×10^6	3.13×10^6	3.77×10^6
3	1.94×10^6	3×10^6	9.25×10^6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 แสดงความเข้มข้นของ lysing enzyme กับจำนวนโปรโต-พลาสต์ทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ของเชื้อ *Monascus sp.* KB10M16

ความเข้มข้นของ lysing enzyme (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3
0.5	6.66×10^6	1.00×10^6	1.16×10^6
1	2.83×10^6	3.00×10^6	2.94×10^6
2	1.80×10^6	3.08×10^6	5.00×10^6
3	2.27×10^6	3.38×10^6	4.91×10^6

ตารางที่ 13 แสดงความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ของเชื้อ *Monascus* sp. KB 20 M10.2

ความเข้มข้นของ lysing enzyme (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3
0.5	0	6.00×10^6	1.95×10^6
1	1.00×10^6	5.00×10^6	8.5×10^6
2	6.00×10^6	3.50×10^6	6.75×10^6
3	2.70×10^6	6.00×10^6	5.75×10^6

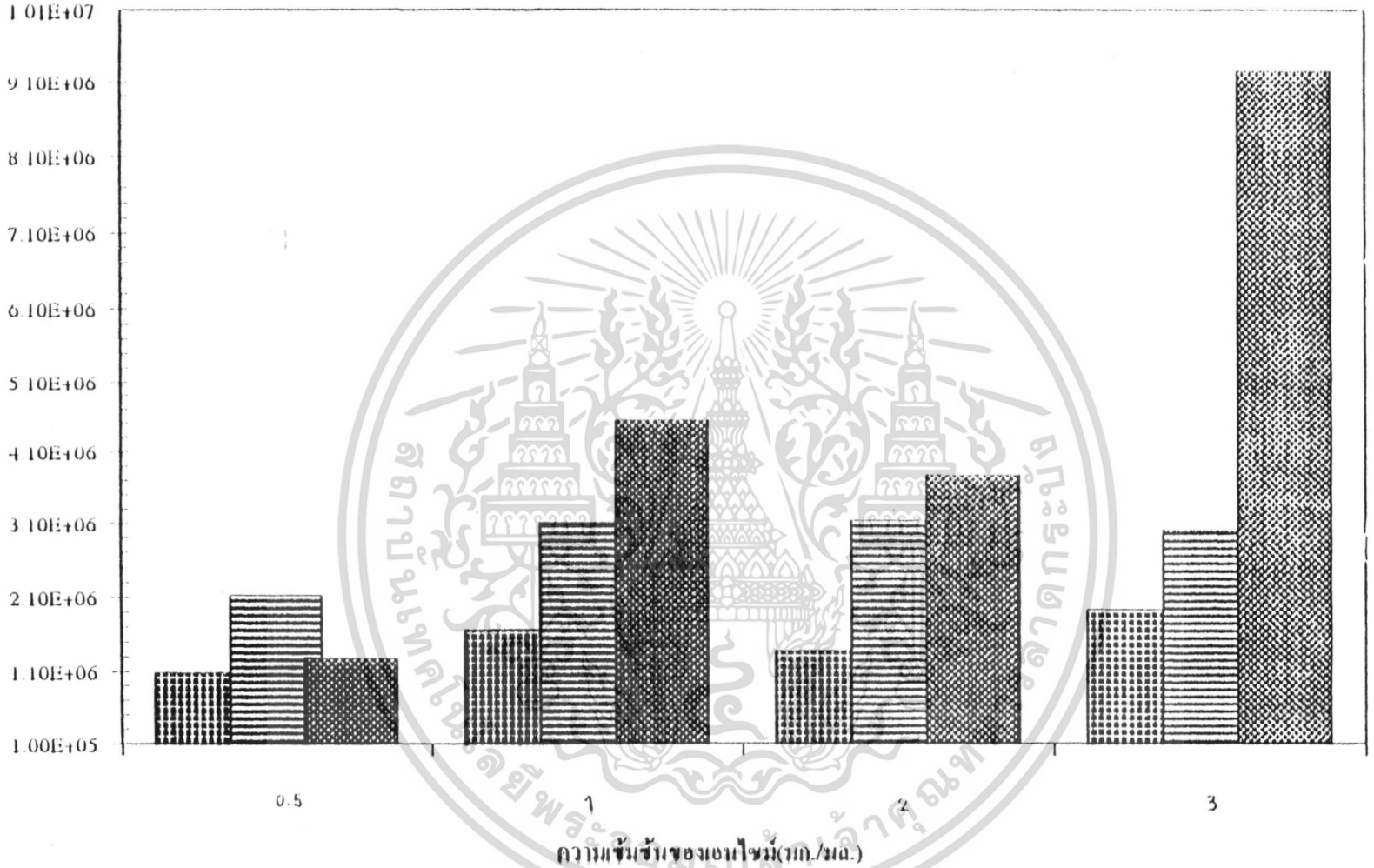
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 แสดงความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์กับจำนวนโปรโตพลาสต์ทุก ๆ ชั่วโมงเป็นเวลา 3 ชั่วโมงของ เชื้อ *Monascus* sp. KB 20 M 1

ความเข้มข้นของ lysing enzyme (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ชั่วโมงที่ 1	ชั่วโมงที่ 2	ชั่วโมงที่ 3
0.5	1.00×10^4	4.00×10^4	3.00×10^5
1	3.00×10^4	7.00×10^4	1.66×10^5
2	4.00×10^4	4.00×10^4	3.05×10^5
3	3.00×10^4	3.00×10^4	4.40×10^5

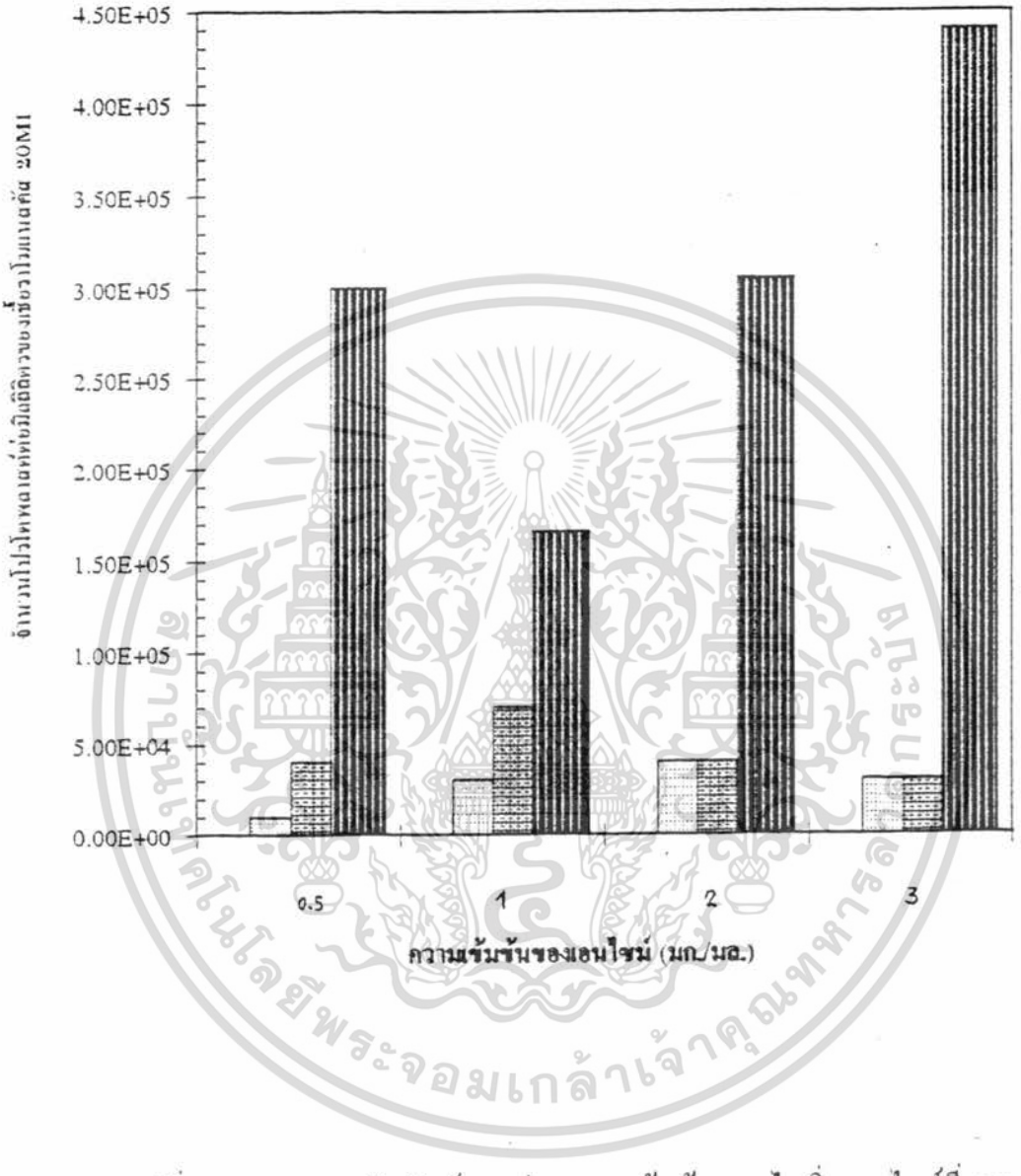
จากผลการทดลอง เมื่อสังเกตลักษณะ ของเส้นใยในระหว่างการย่อยด้วยไลซิ่งเอนไซม์ เมื่อใช้น้ำหนักเซลล์ประมาณ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ เส้นใยจะหลุดเป็นท่อน ๆ โปรโตพลาสต์จะมีลักษณะบาง ๆ ใหญ่กว่าสปอร์ มีหลายขนาดด้วยกัน ทั้งเล็กและใหญ่กว่าสปอร์ โดยพบในชั่วโมงที่ 2 จะมีเส้นใยหลุดออกมาก่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



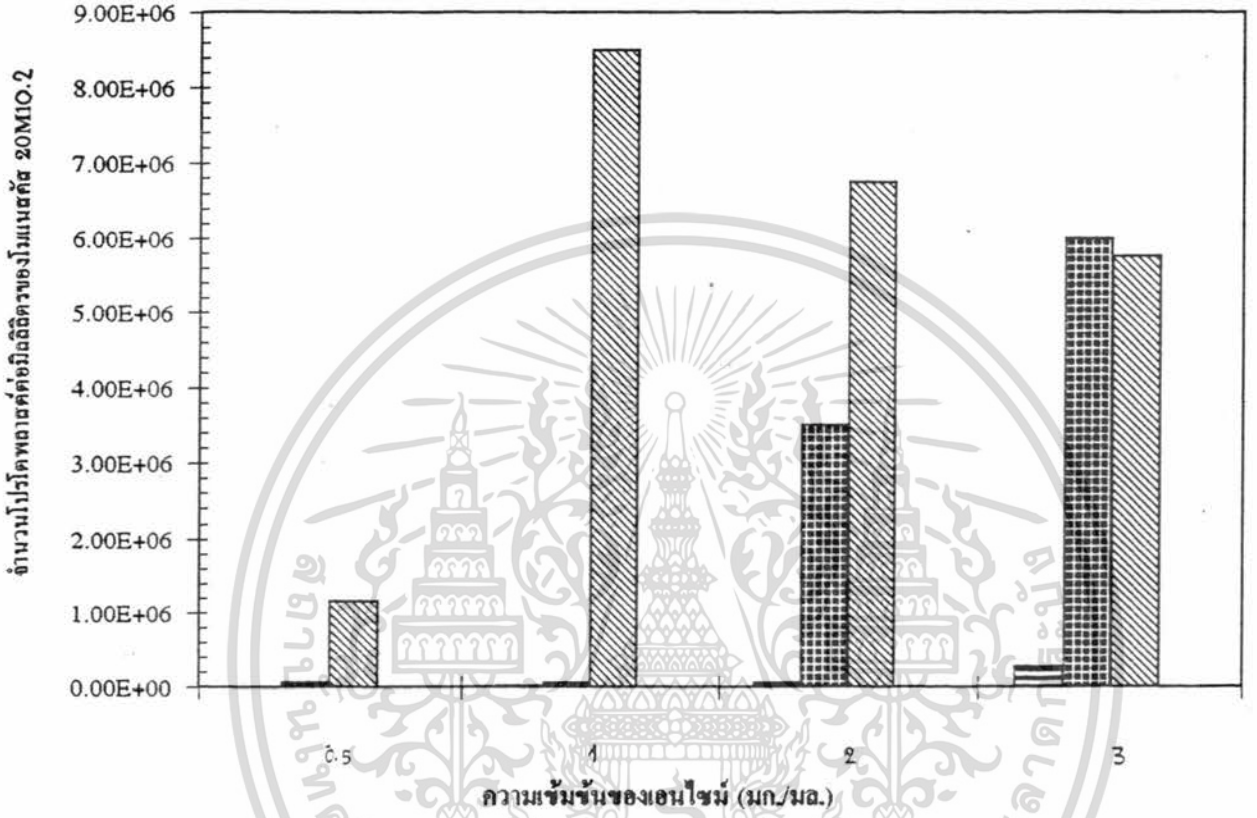
กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของไลซิ่งเอนไซม์ที่ 0.5,1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ ของ *Monascus* sp. KB11304

ชั่วโมงที่ 1 ชั่วโมงที่ 2 ชั่วโมงที่ 3



กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่ 0.5 1 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp KB20M1

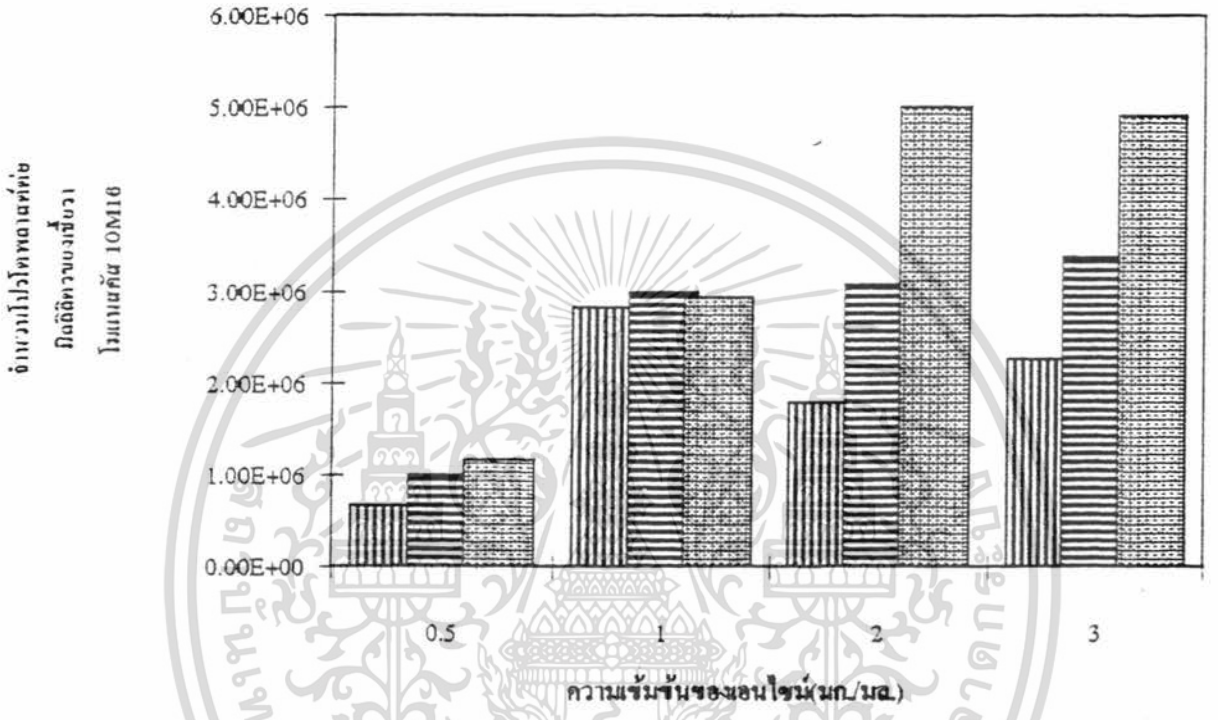
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่ 0.5 ,1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ ของ *Monascus* sp. KB20M10.2

ชั่วโมงที่ 1
ชั่วโมงที่ 2
ชั่วโมงที่3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮซิ่งเอนไซม์ 0.5 ,1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์ของ *Monascus* sp. KB10M16

ซ้ำโมงที่ 1

ซ้ำโมงที่ 2

ซ้ำโมงที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น

เมื่อทำการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ ตามรูปที่ 8 (ตรวจเอกสาร) ระหว่างสายพันธุ์ KB 20M1 กับสายพันธุ์ KB 11304 , KB 20M10.2 และKB 10M16 ได้ผลดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์และจำนวนโคโลนีที่นับได้ของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ และลูกผสมทั้ง 3 คู่

สายพันธุ์	จำนวนโปรโตพลาสต์ (ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนโคโลนีที่นับได้ในอาหาร regenerate medium		
	ที่แยกได้เริ่มต้น	ก่อนหลอม-รวมกัน	เจือจางในน้ำและเลี้ยงบน CM.	เจือจาง 10^{-2} บนอาหาร CM.	เจือจาง 10^{-2} บนอาหาร MM.
KB11304	5.9×10^{6}	1.18×10^{6}	0	53.33	25.33
KB 20M10.2	9.9×10^{6}	1.98×10^{6}	0	35.67	0
KB10M16	9.25×10^{6}	1.85×10^{6}	0	27.33	0
KB 20M1	3.8×10^{6}	1.14×10^{6}	0	55.67	26.67
11304+20M1	-	1.55×10^{6}	0	95	72.63
10M16+20M1	-	2.08×10^{5}	0	70.67	40.6
20M1+20M10.2	-	1.99×10^{5}	0	75	45.27

เมื่อคำนวณหาความถี่ของการหลอมรวมกัน และความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ จะได้ดังตารางที่ 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 แสดงอัตราการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์และอัตราการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับเป็นเซลล์ของสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์ลูกผสม

สายพันธุ์	ความถี่ของการหลอมรวมกัน	ความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์เป็นเซลล์ ($X\ 10^{-3}$)
KB11304	-	4.5
KB20M10.2	-	1.8
KB10M16	-	1.4
KB20M1	-	4.88
KB20M1+KB11304	0.76	6.13
KB20M1+KB10M16	0.57	3.39
KB20M1+KB20M10.2	0.60	3.77

ความถี่ของการเปลี่ยนจากโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์

$$= \frac{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่เปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ได้ (บนอาหาร CM)}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์เริ่มต้น}}$$

ความถี่ของการหลอมรวมกัน

$$= \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหาร MM.}}{\text{จำนวนโคโลนีบนอาหาร CM.}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การทดสอบการเจริญของเชื้อในอาหาร minimal medium

ผลการทดสอบหาการเจริญของลูกผสมและสายพันธุ์พ่อแม่ ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา ประมาณ 7 วัน ได้ผลดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของโคโลนีในอาหาร minimal media ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน

Monascus sp. สายพันธุ์	เส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของโคโลนี ในอาหาร Minimal media (เซนติเมตร)
KB11304	2.85
KB20M10.2	-
KBM16	-
KB20M1	3.2
ลูกผสมระหว่าง KB11304 กับ KB20M1 (โคโลนีที่)	
1	4.1
2	3.9
3	3.7
4	3.3
5	3.7
6	3.0
7	4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกผสมระหว่าง KB20M1 กับKB20M10.2 (ไคโลนิวคลีโอไทด์)	
1	2.50
2	2.88
3	2.73
ลูกผสมระหว่าง KB20M1 กับKB10M16 (ไคโลนิวคลีโอไทด์)	
1	2.75
2	2.8
3	3.0

5. ผลการหาความเป็น auxotrophic mutant ของเชื้อรา *M.*sp ทั้ง 4 สายพันธุ์ ในอาหาร synthetic minimal media ที่มีกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ดังตารางที่ 7-8 จะได้ผลการเจริญของเส้นใยทั้ง 4 สายพันธุ์ดังตารางที่ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา 4 สายพันธุ์ใน อาหาร synthetic minimal media

อาหาร สูตร	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (เซนติเมตร) KB11304	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (เซนติเมตร) KB20M1	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (เซนติเมตร) KB10M16	เส้นผ่านศูนย์กลาง โคโลนี (เซนติเมตร) KB 20M10.2
A	1.67	2.7	3.23	1.8
B	2.22	2.65	0	0
C	2.43	3.15	0	0
D	2.54	2.58	0	0
E	2.85	3.02	0	0
F	2.33	3.27	2.2	1.8
G	1.8	3.66	0	0
H	2.34	2.88	0	0
I	1.8	2.85	0	0
J	2.53	3.15	0	0
K	2.7	2.1	0	0
L	2.5	2.96	0	0
M	1.97	2.75	0	0
N	1.85	2.23	0	0
O	2.68	3.17	2.07	1.63
P	2.4	3.2	0	0
control	2.4	3.2	0.1	0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางพบว่า *Monascus*.sp KB20M1 และ KB11304 เจริญได้ดีในอาหารทุกสูตร แสดงว่าเป็นสายพันธุ์ prototroph ส่วน KB20 M 10.2 และ KB10M16 เจริญได้ในอาหารที่มี กรดอะมิโนอะดีนีนเท่านั้น เนื่องจากเจริญได้เฉพาะสูตรอาหาที่มีอะดีนีนเท่านั้น เชื้อโมแนสคัสสายพันธุ์กลาย KB20M10.2 และ KB10M16 อาจเป็น adenine auxotrophic muant

เมื่อทดสอบผลการเจริญในอาหาร synthetic minimal media ที่มีกรดอะมิโนอะดีนีน เปรียบเทียบกับอาหารที่มีกรดอะมิโนทุกชนิดยกเว้น อะดีนีนผลการทดสอบแสดงได้ดังตารางที่19

ตารางที่ 19 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของโคโลนี ของสายพันธุ์ adenine auxotrophic mutant ในอาหาร synthetic minimal media ที่มีอะดินินและไม่มีอะดีนินเป็นแหล่งไนโตรเจน

อาหาร	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) 20 M 10.2	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) KB 10 M 16
synthetic minimal media + adenine(50 ug/l)	2.9	2
synthetic minimal media +19 amino acid without adenine	0.2	0.1

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *Monascus*.sp KB10M16 และ KB20M10.2ในอาหาร synthetic minimal media ซึ่งประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน ได้แก่ yeast nitrogen base without amino acid yeast extract กรดอะมิโนจำนวน 19 ชนิด และเปรียบเทียบผลการเจริญในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันได้ดังตารางที่ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของสายพันธุ์ Adenine auxotrophic mutant ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน

อาหาร Synthetic minimal media ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) KB20M10.2	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) KB10M16
อะดีนิน	2.9	2.0
กรดอะมิโน 19 ชนิดยกเว้น อะดีนิน	0.2	0.2
ไม่มีแหล่งไนโตรเจน	0.1	0.1
yeast extract	5.68	3.7

ตารางที่ 21 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ เชื้อรา *Monascus.* sp.2 สายพันธุ์ ในอาหารต่างกัน

ที่มาของความแปรปรวน	Degree of Freedom	ความแปรผัน (SS)	ความแปรปรวน (MS)	อัตราส่วน F
-*Monascus.* sp	1	27.49	27.49	67.5**
-อาหาร	3	29.04	9.68	
-ความคลาดเคลื่อน	3	1.21	0.40	
รวม	7			

** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่มีความเชื่อมั่น 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ*Monascus* sp. KB 20M10.2 ในอาหาร synthetic minimal media ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันได้แก่ Adenine , กรดอะมิโนทั้งหมดยกเว้น adenine และ Yeast extract เปรียบเทียบการเจริญกับอาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ที่มาของความแปรปรวน	Degree of freedom	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่มอาหารที่ต่างกัน	3	63.0264	21.0088	167.936**
ภายในกลุ่ม	8	1.0008	0.01251	
รวม				

จากตารางที่ 22 พบว่า อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันทำให้อัตราการเจริญของ *Monascus* sp.KB20M10.2ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 23 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของ *Monascus* sp. KB 10M16 ในอาหารSynthetic minimal mediaที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันได้แก่ Adenine ,กรดอะมิโนทั้งหมดยกเว้น adenine และ Yeast extract เปรียบเทียบการเจริญกับ อาหารที่ไม่มีกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ที่มาของความแปรปรวน	Degree of freedom	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่มอาหารที่ต่างกัน	3	27.9225	9.3075	398.608**
ภายในกลุ่ม	8	0.1868	0.02335	
รวม	11			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 23 พบว่า อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันทำให้อัตราการเจริญของ *Monascus* sp.KB 10M16ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่งทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 %

6.ผลการทดลองหาปริมาณดีเอ็นเอในลูกผสมระหว่าง*Monascus*.sp. KB20M1 กับ KB11304

จากการหาปริมาณดีเอ็นเอของลูกผสมทั้ง 7 โคโลนีที่ได้จากการหลอมรวมกันระหว่าง *Monascus*.sp. KB20M1 กับ KB11304 และสายพันธุ์พ่อแม่คือ KB20M1 และ KB11304 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอกับกราฟมาตรฐานของ คาล์ฟ ไทมัสดีเอ็นเอ จะได้ผลดังตารางที่ 24

ตารางที่ 24 แสดงปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบระหว่างลูกผสมทั้ง 7 โคโลนี กับสายพันธุ์พ่อแม่ดั้งเดิม (KB11304 และ KB20M1)

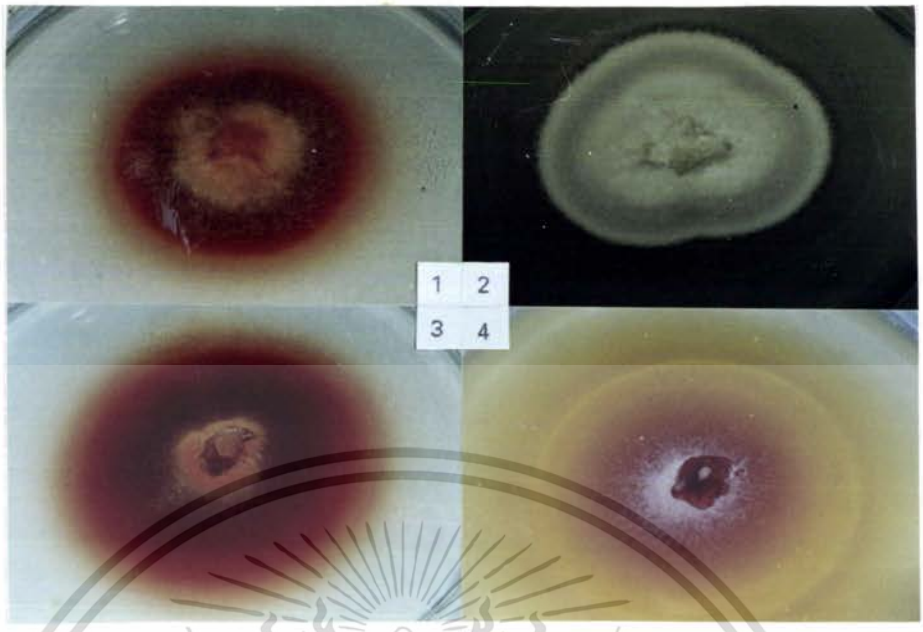
สายพันธุ์ของเชื้อรา	ผล OD ที่ 600 นาโนเมตร	ผลปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนเท่าของดีเอ็นเอพ่อแม่
Monascus.sp KB11304	0.250	0.565	0.565
Monascus.sp KB20M1	0.265	0.599	0.599
ลูกผสมโคโลนีที่ 1	0.505	1.141	1.96
ลูกผสมโคโลนีที่ 2	1.987	4.491	7.72
ลูกผสมโคโลนีที่ 3	2.747	6.208	10.65
ลูกผสมโคโลนีที่ 4	0.490	1.107	1.587
ลูกผสมโคโลนีที่ 5	0.690	1.559	2.66
ลูกผสมโคโลนีที่ 6	0.332	0.750	1.29
ลูกผสมโคโลนีที่ 7	0.250	1.243	2.135

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

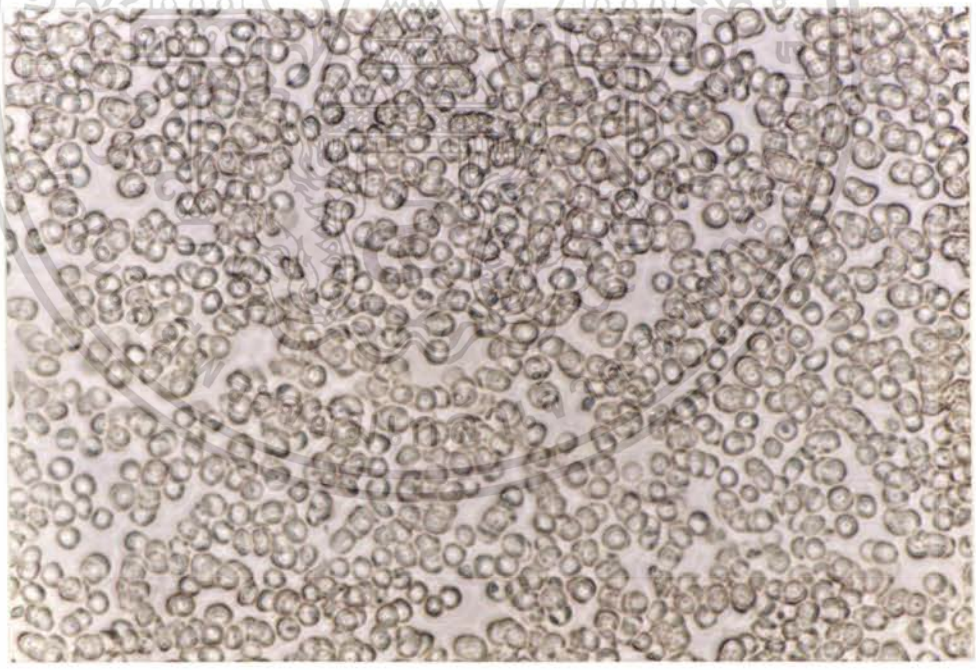
ตารางที่ 25 แสดงความกว้างเส้นใยของลูกผสมที่เกิดจากการทำหลอมรวมโปรโตรพลาสต์ ระหว่างสายพันธุ์ KB 11304 และ KB 20M1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

สายพันธุ์	ความกว้างเส้นใย (ไมครอน)
Monascus sp KB 11304	2.0-5.0
Monascus sp KB 20M1	3.0-5.0
ลูกผสมโคโลนีที่1	6.0
ลูกผสมโคโลนีที่2	5.1
ลูกผสมโคโลนีที่3	5.5
ลูกผสมโคโลนีที่4	5.0
ลูกผสมโคโลนีที่5	6.2
ลูกผสมโคโลนีที่6	5.3
ลูกผสมโคโลนีที่7	5.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

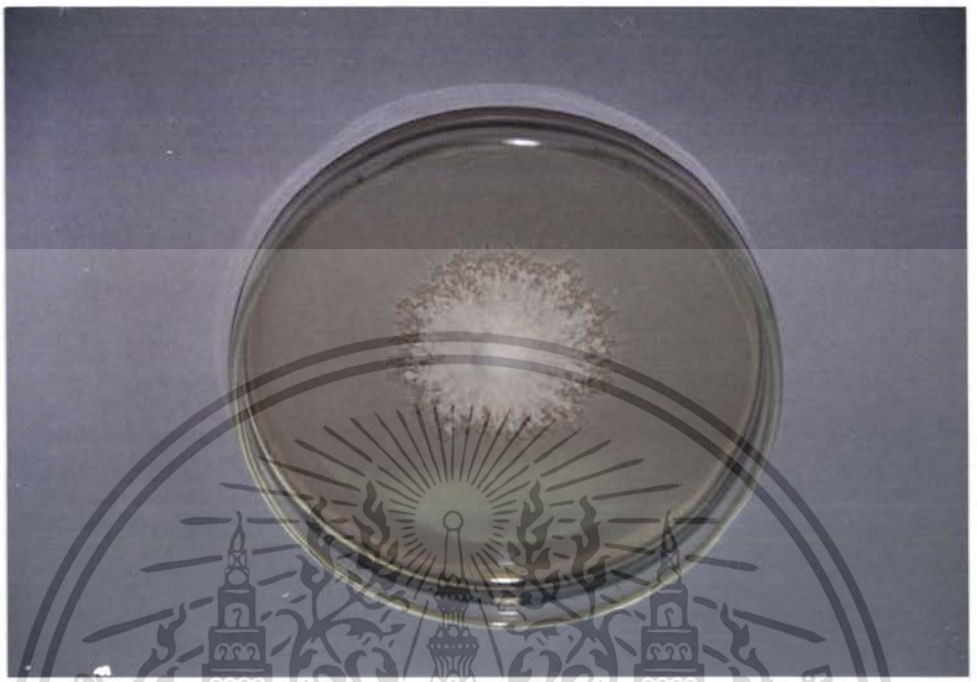


รูปที่ 9 แสดงลักษณะการเจริญเชื้อรา *Monascus* sp. KB11304 (1) , KB10M16(3), KB20M10.2(4) ,KB20M1(2) ที่เลี้ยงบนอาหาร MYS ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน



รูปที่ 10 แสดงโปรโตพลาสต์ที่แยกได้หลังจากบ่มด้วยไลซิ่ง เอนไซม์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และผ่านการกรองด้วย synthcglass เพื่อแยกเส้นใยออก

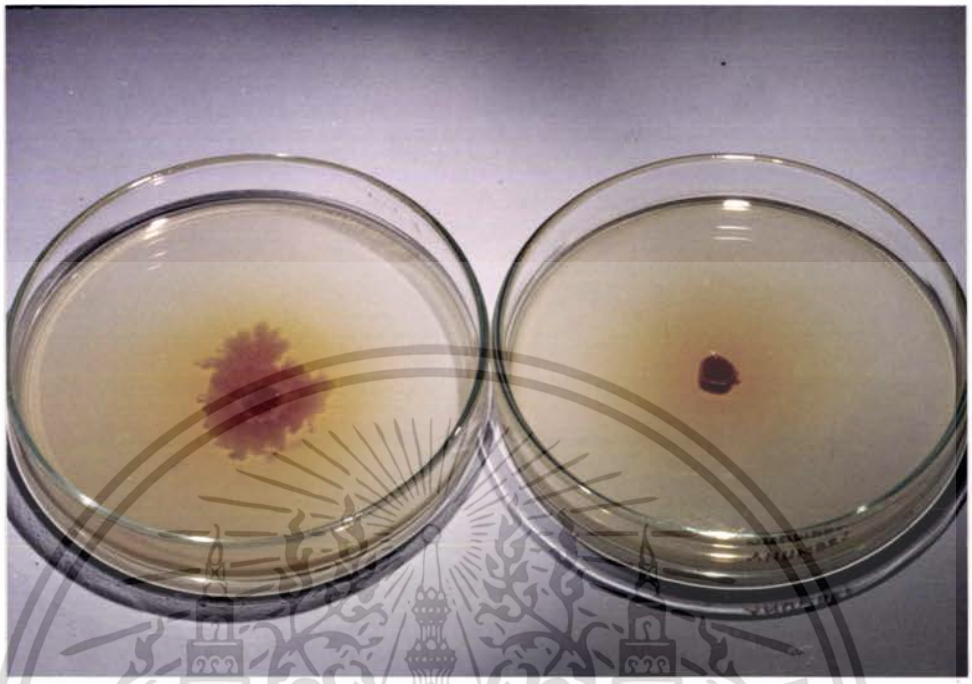
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



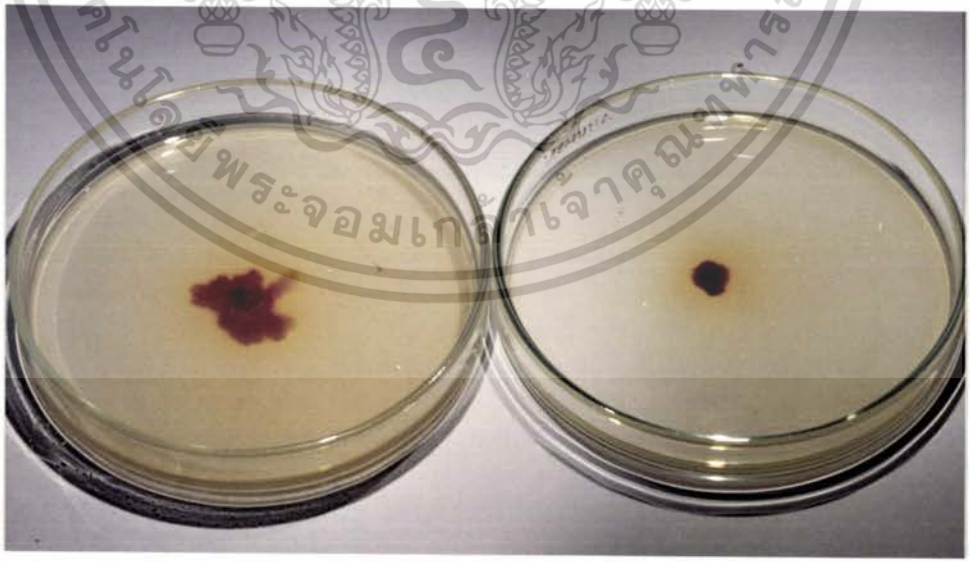
รูปที่ 11 แสดงการเจริญของสายพันธุ์โปรโตโทรฟ *Monascus* .sp KB 20M1 ใน อาหาร synthetic minimal media อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 วัน

รูปที่ 12 แสดงการเจริญของสายพันธุ์โปรโตโทรฟ *Monascus* .sp KB11304 ใน อาหาร synthetic minimal media อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

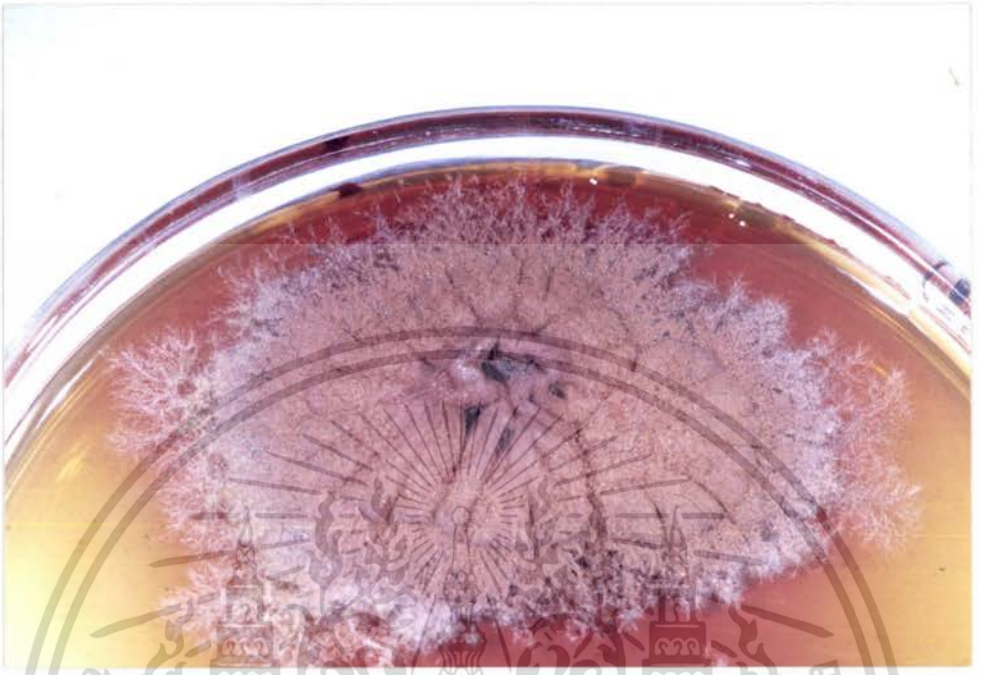


รูปที่ 13 แสดงการเจริญเติบโตของ *Monascus*.sp KB20M10.2 ในอาหาร synthetic minimal media ที่เติมอะดีนิน (ด้านซ้าย) และไม่มีการเติมอะดีนิน (ด้านขวา) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ถึง 12 วัน



รูปที่ 14 แสดงการเจริญของ*Monascus*.spKB10M16 ในอาหาร synthetic minimal media ที่เติมอะดีนิน (ด้านซ้าย) และไม่มีการเติมอะดีนิน (ด้านขวา) เป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ถึง 12 วัน

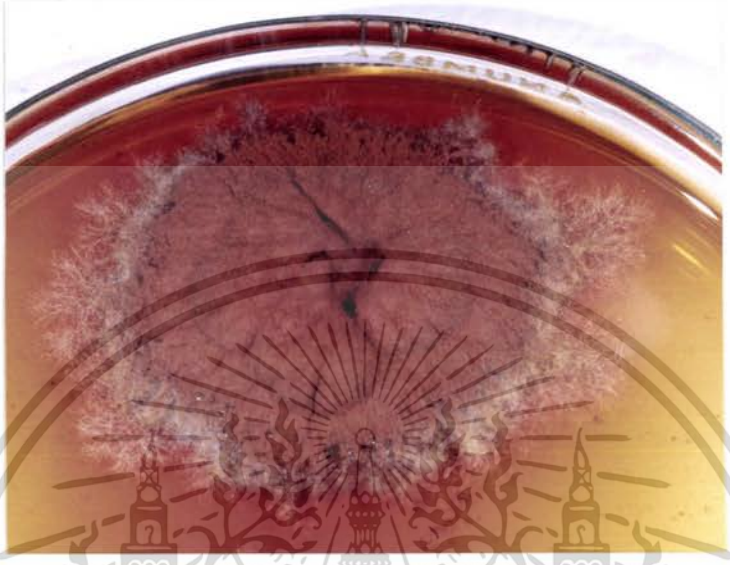
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 1 ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB11304 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

รูปที่ 16 แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 2 ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB11304 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

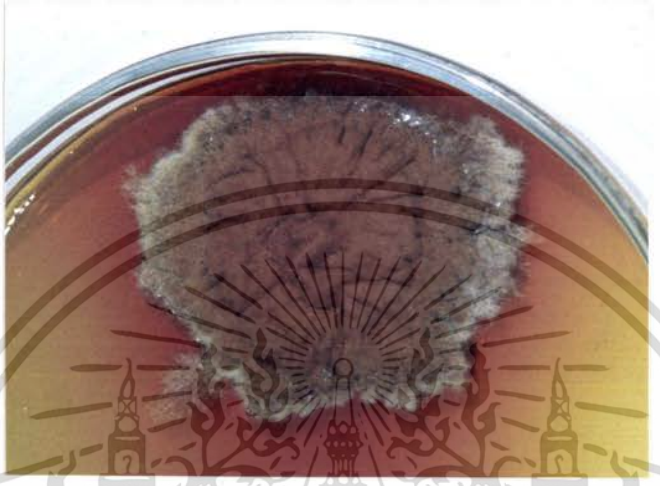
เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 3 ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB11304 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

รูปที่ 18 แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 4 ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB11304 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 19 แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 5 ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB11304 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

รูปที่ 20 แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 6 ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB11304 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

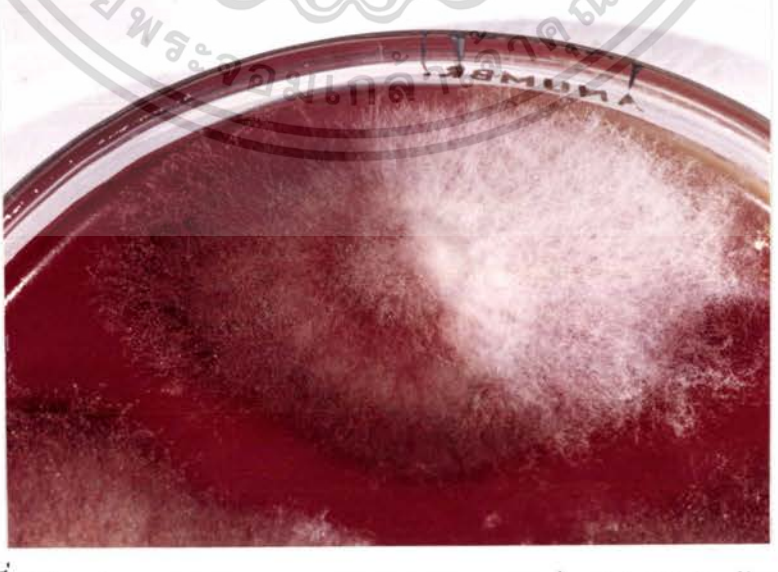
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 21 แสดงการเจริญของลูกผสมโคโลนีที่ 7 ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB11304 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

รูปที่ 22 แสดงการเจริญของลูกผสม ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB20M10.2 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 23 แสดงการเจริญของลูกผสม ซึ่งได้จาก การหลอมรวมระหว่าง *Monascus*.sp KB 20M1 กับ KB10M16 ในอาหาร minimal media บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 ถึง 10 วัน



รูปที่ 24 แสดงการแยก sector ของลูกผสมระหว่าง KB20M1 กับ KB11304 เมื่อไม่ได้ผ่านการฉายรังสี UV 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 25 แสดงกรดอะมิโน 20 ชนิดที่ใช้ในการหาออกโซโทรฟมิวแตนท์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและวิจารณ์

สรุปผล

1. จากการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ต่าง ๆ ต่อการแยกโปรโตพลาสต์

เอนไซม์ Chitinase : Zymolyase: Cellulase ในอัตราส่วน 1:1:1, 1:2:1, 1:1:2 1:2:2 และ 3:2.5:5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร กับการใช้ไลซิ่งเอนไซม์เข้มข้น 3 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร พบว่า ไลซิ่งเอนไซม์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเกิดโปรโตพลาสต์ ได้สูงถึง 9.25 $X10^6$ โปรโตพลาสต์ ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเอนไซม์ Chitinase:Zymolyase:Cellulase สัดส่วน 3:2.5:5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเกิดโปรโตพลาสต์คือ ไลซิ่งเอนไซม์ นอกจากนี้จากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าประสิทธิภาพการทำงานไลซิ่งเอนไซม์ดีมาก สามารถย่อยเส้นใยได้เป็นท่อนๆ ละเอียดดีกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นที่ใช้

2. การหาความเข้มข้นของไลซิ่งเอนไซม์ที่เหมาะสมกับอัตราการเกิดโปรโตพลาสต์

จากการทดลองเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นไลซิ่งเอนไซม์ 0.5, 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 3.0 มก./มล. มีจำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดในชั่วโมงที่ 3คือ $9.25X10^6$,$4.91X10^6$, $5.75X10^6$ และ $4.40X10^5$ ในเชื้อรา *Monascus* sp KB11304 , KB10M16 ,KB20M10.2 และ KB20M1 ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการเกิดโปรโตพลาสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์คือ ไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้น 3.0 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร

3. การทำโปรโตพลาสต์ฟื้นชั่น

จำนวนโปรโตพลาสต์ที่แยกได้ใน 4 สายพันธุ์ประมาณ 10^6 โปรโตพลาสต์ ต่อมิลลิลิตร และจำนวนโคโลนีของโปรโตพลาสต์ที่ขึ้นบนอาหาร CM คือ 53.33,35.67 27.33. 55.67 ของ KB11304. KB20M10.2, KB10M16 และ KB20M1 ตามลำดับ

เมื่อเจือจางโปรโตพลาสต์ด้วยน้ำก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหาร CM จะไม่พบโคโลนีขึ้นเลย เนื่องจากโปรโตพลาสต์แตกหมด เป็นการยืนยันว่าโปรโตพลาสต์ที่แยก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ มีความบริสุทธิสูง ไม่มีเส้นใยเจือปนอยู่

ในอาหาร MM ที่เจือจาง 10^{-2} พบว่า KB20M10.2 และ KB10M16 ไม่สามารถเจริญบนอาหารนี้ได้ มีจำนวนโคโลนีเป็นศูนย์ แต่เชื้อ KB11304 และ KB20M1 เจริญได้ 25.33 และ 26.67 โคโลนีตามลำดับ อาจจะประเมินได้ว่า KB20M10.2 และ KB10M16 เป็นออกโซโทรฟมิวแตนท์ เพราะในอาหาร MMไม่มีการเติมกรดอะมิโนลงไป

เมื่อทำการหลอมโปรโตพลาสต์พบว่า ระหว่าง KB20M1 กับKB11304 , KB20M1 กับ KB10M16 และ KB20M1 กับ KB20M10.2 ที่เจือจาง 10^{-2} ลงบนอาหาร CM และ MM นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นได้เป็น 95 ,70.67, 75 และ 72.63, 40.6 ,45.27 ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าในอาหาร MM ซึ่งเติมเชื้อ KB20M10.2 KB10M16 ไม่สามารถเจริญได้แต่เมื่อนำมาหลอมรวมกันแล้วมีการเจริญเกิดขึ้นอาจเป็นไปได้ว่าเกิดการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมเกิดขึ้นในลูกผสมนำยีนทั้งสองมาร่วมกัน ทำให้สามารถเจริญบนอาหาร MM ได้

และเมื่อนำลูกผสม 3 คู่ที่ได้นำไปเจือจางในน้ำก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหาร CM ปรากฏว่าไม่มีโคโลนีของลูกผสมขึ้นแสดงว่าต้องเป็นโปรโตพลาสต์แน่นอน และไม่มีเส้นใยหรือสปอร์ปนอยู่ในสารละลายโปรโตพลาสต์ที่นำมาเพาะเลี้ยง

จากการทดลองจะได้ลูกผสมระหว่าง KB20M1 กับ KB11304 มีทั้งหมด 7 โคโลนีที่แยกได้ และลูกผสมทั้งหมด เมื่อไม่ได้ผ่านการฉายรังสี UV. จะเห็นการแยกเส้นใยและสีต่างจากกันเป็น sector เช่น ในลูกผสมระหว่าง KB20M1 กับ KB11304 จะเห็นการแยกเส้นใยออกเป็นสีขาว(KB20M1) และสีแดง (KB11304) ถ้าทิ้งไว้เป็นเวลานานๆ ประมาณ 10-13 วัน เพื่อให้ได้ลูกผสมที่คงทนจึงต้องนำลูกผสมที่หลอมรวมกันทั้งหมดไปผ่านรังสี UV เป็นเวลา 5 นาที

จากการเปรียบเทียบผลที่ได้พบว่าลูกผสมมีลักษณะโตได้ไว และสร้างสีเร็วในปริมาณมาก เมื่อเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การหาอัตราการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์และอัตราการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์

พบว่า ความถี่ของการเปลี่ยนโปรโตพลาสต์กลับเป็นเซลล์ เท่ากับ 4.5 1.8 ,1.4 และ 4.88 ($X10^{-3}$) ของเชื้อรา *Monascus*.sp KB11304 , KB20M10.2 KB10M16 และ KB20M1 ตามลำดับ แสดงว่าสายพันธุ์ KB11304 และ KB20M1 มีประสิทธิภาพในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ได้มากกว่าสายพันธุ์ที่เหลือ

ความถี่ของการหลอมรวมกัน เท่ากับ 0.76, 0.57 และ 0.60 ในเชื้อรา *Monascus*.sp KB20M1 รวมกับ KB11304 , KB10M16 และ KB20M10.2 ตามลำดับ พบว่าความถี่ของการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ทั้ง 3 คู่มีค่าใกล้เคียงกัน คู่ผสมระหว่าง KB10M16 กับ KB20M1 มีประสิทธิภาพในการหลอมรวมกันได้ต่ำที่สุด ประสิทธิภาพในการหลอมรวมกันสูงที่สุดคือคู่ผสมระหว่าง KB11304 กับ KB20M1

5.ผลการทดลองหาปริมาณดีเอ็นเอในลูกผสมระหว่าง *Monascus*.sp KB20M1 กับ KB11304

จากการทดลองพบว่าลูกผสมโคโลนีที่ 1 มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่เป็น 2 เท่า แสดงว่าน่าจะเป็นลูกผสม(fusant) ที่เกิดจากการหลอมรวมกันระหว่างสองโปรโตพลาสต์ ส่วนโคโลนีที่2 และ 3 มีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่มาก ๆ คือเกือบ 8-11 เท่า แสดงว่าเกิดการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์มากกว่าสองโปรโตพลาสต์ขึ้นไป

นอกจากการหาปริมาณดีเอ็นเอในลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่แล้ว ยังสามารถใช้ลักษณะของเส้นใยและการสร้างสี ขนาดของเส้นใย ทำให้สามารถสรุปได้ว่าน่าจะเป็นลูกผสมที่แท้จริง แต่โคโลนีที่ 2 และ 3 อาจเกิดการผสมมากกว่าสองโปรโตพลาสต์ขึ้นไปทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์

จากการทดลองทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่น พบว่าควรใช้เทคนิคอื่นเพิ่มเติม ในการตรวจสอบลูกผสมที่ได้นอกเหนือจากการใช้ auxotrophic mutant เนื่องจาก เชื้อรา KB10M16 และ KB20M10.2 เป็น auxotroph แต่ KB20M1 ที่เป็นตัวยืนพื้นในการหลอมรวมโปรโตรพลาสเป็น prototroph ทำให้คู่ผสมที่ได้ระหว่าง KB11304 กับ KB20M1 ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วย auxotrophic mutant ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มเติม คือหาปริมาณดีเอ็นเอในคู่ผสมที่เกิดจาก KB20M1 กับ KB11304 ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้พบว่า การทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นด้วยสารเคมี PEG(polyethylene glycol) ทำให้เกิดการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์ 2 โปรโตพลาสต์ขึ้นไป ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้ในการหลอมรวมกันของ KB11304 กับ KB20M1 มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 2-11 เท่า แต่จากการตรวจสอบด้วยวิธีนี้พอสรุปได้ว่า fusant ที่ได้น่าจะเป็นลูกผสมที่แท้จริง

คุณสมบัติลูกผสมที่ได้จะมีการสร้างสีในปริมาณมาก การเจริญของเส้นใยพบว่าในลูกผสมมีขนาดมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณเกือบ 2 เท่า และใช้เวลาในการเจริญเพียงแค่ 4 วันก็สามารถสร้างสีได้ปริมาณมาก ในลูกผสมที่เกิดจาก KB11304,KB20M1

ปัญหาพิเศษนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการเตรียมทำโปรโตพลาสต์ฟิวชั่นโดยใช้เครื่อง Somato fusion ในโอกาสหน้าต่อไป เมื่ออัตราการหลอมรวมกันของโปรโตพลาสต์โดยใช้สารเคมี และอัตราการกลับมาเป็นเซลล์ของโปรโตพลาสต์มีค่าสูงพอ ซึ่งสามารถใช้เทคโนโลยีใหม่ๆเข้ามาช่วยให้มีการผสมกันระหว่างแค่ 2 โปรโตพลาสต์ของสายพันธุ์พ่อกับแม่เท่านั้น และควรทำการศึกษาหลอมรวมกันระหว่างสายพันธุ์ KB11304 โดยให้เป็นสายพันธุ์ยืนพื้นเปรียบเทียบกับ KB20M1 เป็นสายพันธุ์ยืนพื้นเปรียบเทียบการสร้างสีและปริมาณเอนไซม์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

ชุลี ชัยศรีสุข. 2536.การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของราข้าวแดง(*Monascus* sp. KB6SR) เพื่อใช้เป็นแหล่งโครโมโซมที่คงสภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์, มก. 11: 122-129.

เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล , ประสิทธิ์ แซ่ลี้ และ ปนัดดา แซ่อึ้ง. 2519. สีแดงจากข้าว(อั้งคัก). วารสารอาหาร 8(1) : 51-55

ประสาทพร สมิตะมาน . 2528. โปรโตพลาสต์ เทคนิคการเลี้ยงและการประยุกต์ใช้. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 124 น.

พลายแก้ว ไชยเบญวงศ์ และบุษบา ยงสมิทธ์ .2534ก. การศึกษาเบื้องต้นโคจิเชื้อราแดงโมนาสคัส เตรียมจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ , น. 277-282. *ใน* รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 29 สาขาวิชาวิทยาศาสตร์-เทคโนโลยี.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

พลายแก้ว ไชยเบญวงศ์ และบุษบา ยงสมิทธ์ .2534ข. การศึกษาการปรับสภาพของวัตถุดิบต่อคุณภาพการหมักข้าวแดง , น. 283-291. *ใน* รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 29 สาขาวิชาวิทยาศาสตร์-เทคโนโลยี.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

วรรณภา ทาบโลกา. 2529. ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตสีของโมนาสคัสที่เจริญบนอาหารแป้งมันสำปะหลังในสภาพหมักเปียก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมชาย ไกรรักษ์. 2536. ศักยภาพของเชื้อราโมนาสคัสสายพันธุ์ชนิดใหม่ ในการผลิตสีเหลืองธรรมชาติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

สุภาพร จันทร์ศิริโพธา. 2531. การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อราแดง เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตสีโดยวิธีการกลายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536. การมานิพูเลทสายพันธุ์จุลินทรีย์(โปรโตพลาสต์ฟิวชันและการประยุกต์) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

Ainswart, G.C.,F.K. Sparrow and A.S. Sussman. 1973. The Fungi. Vol. IV A. Academic press ,Inc., New York. 621 p.

Alexopoulos, C.J. and C.W. Mims.1979. Introductory Mycology.John Wiley & Son, Inc., New York. 632 p.

Anne, J. and J.F. Peberdy. 1976. Induced fusion of fungal protoplast following treatment with polyethylene glycol. J . of Gen. Microbiol., 92; 413-417.

Anne, J.,H. Eyssen. and P.Desumer.1978. Hybridization between *Penicillium* sp. following induced protoplast fusion .In Genetics of Industrial Microorganism.

Ball,C. and M.P. Mcgonagle . 1978. Developement and evaluation of a potency index screen for detecting mutants of P. chrysogenum having increased penicillin yieid. Journal of Applied Bacteriology . 45:67-74.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Baltz, R.H. and P. Garrison. 1981. Protoplast fusion in streptomyces: condition for efficient recombination and cell regeneration J.Gen.Microbiol. 127: 137-146.

Barmard ,E.L. and P.E. Cannon. 1987. A new species of Monascus from pine tissue in Flrida. Mycologoa 76(3):476-48.

Beckerich, I.M., P. Fourmier,C. Gaillardin, H. Heslot, M. Rochet and Treton.1984. Yeast.pp.115-157. In Ball (ed.). Genetic and Breeding of industrail Microorganisms.CRC Press,Inc.Baca Roton.

Birch ,A.J., P.Fitton, E.Pride, A.J. Ryan, H. Smith and W.B. Whalley. 1958. The mold pigment scerlotiorin, p.4576. Cited by M.Kurono,K.Nakaaishi,K.Shindo and M.Tada. Biosynthesis of monascorubrin and monascoflavin. Chem. Pharm.Ball.11:359-362.

Border, C.U. and P.E. Koehler. 1980. Pigment produced by *Monascus perpureus* with regard to Quality. J.Food Sci. 45:579-569.

Burton, K.1956. A study of the condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimeter estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62:315-323.

Calm, C.T. 1976. Starting investigational and Production culture .Proc. Biochemist. 11(3):7-12.

Carels, M. and Shepherd,D. 1975. Sexual reproduction cycle of *Monascus* sp. in submerged shaken culture.J. Bact. 122(1):288-294.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Carels ,M. and D. Shepherd. 1977. The effect of difference nitrogen sources on pigment production and sporulation of Monascus sp. in submerged shaken culture. Can. J. Microbial. 23: 1360-1372.

Chiu, S.W. and S.W. Chan. 1992. Production of pigment by *Monascus perpureus* using sugar cane bagasse in roller bottle cultures. World J. Microbiol. Biotechnol. 8: 68-70.

Carels, M. and D. Shepherd. 1975. Sexual reproduction cycle of *Monascus* sp. in submerged shaken culture.J. Bact. 122(1):288-294.

Cole, G.T. and W.B. Kendrick. 1968. Conidium ontogeny in hyphomycetes. The imperfect state of *Monascus ruber* and its meristem orthrosprore. Can J.Bot. 46:987-992.

Evan , P. J. and H.Y. Wang. 1984. Pigment production from immobilized *Monascus* sp. utilizing polymeric resin adsorption . App. Environ. Microbiol.. 47(6) :1323-1326.

Farahnak,F., T. Seiki, D.D.Y. Ryu and D. Ogrydziak. 1986. Construction of lactose assimilating and high-ethanol-producing yeast by protoplast fusion.Appl. Environ.Microbiol.5(2):362-367.

Ferenczy. L. and A. Maraz. 1977. Transfer of mitochondria by protoplast fusion in *Saccharomyces*. Appl. J. Genet.53:41-49.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fodor, K. and L. Alfoidi . 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium* .Proc. Natl. Acad. Sci. 78(6) : 2147-2150.

Han, O.H. 1990a. Optimizeation of Monascus pigment production in solid-state fermentation,pp.260-263. In G.A.F. Hendry and J.D. Houghton(eds.).Nateral Food Colorants Blackie and Son., New York . 280 P.

Hawksworth, D.L. and J.I. Pitt. 1983. A new taxonomy for Monascus species base on cultural and microscopical characters. Austl J. Bot. 31:51-61.

Haws, E.J.,J.S.E. Holker.,A. Kelly,A.D.G. Powell and A. Robertson. 1959.The chemistry of fungi part XXXVII. The structure of rubropunctation. J. Chem.Soc. 1959:3598-3610.

Hendry ,G.A.F. and J.D. Houghton . 1992. Nateral Food Colorants.Blackies and Son., New York. 280 p.

Hesseltine,C.W. 1965. A millienium of fungi ,food and fermentation.Mycologia. 57:179-181.

Hiroi, T., T. Shima and N.Ogasanara. 1979. Hyperpigment -productive mutant of *Monascus anka* for solid culture.Agr. Biol .Chem. 43(9):1975-1976.

Hoopwood,D.A. 1981.Genetic study with bacterial protoplast.Ann Rev. Microbiol. 35:237-272.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Johns,M.R. and D.M. Stuart. 1991. Producing of pigment by *Monascus perpureus* in solid culture. J.Indust .Microbiol. 8:23-28.

Kao,K.N. and M.R. Michaylule.1974. A method for high frequency intergenic fusion of plant protoplast . Plata.115:355-367.

Kevei, F. and J.F. Peberdy .1977. Intraspecific hybridization between *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus rugulisa* by fusion of somatic protoplasts. J. Gen.Microbiol. 102:255-262.

Kirimura, K., I. Nakajima, S.P. Lee , S.Kawabe and S.Usami .1986.Cytric acid and production by the diploid strain of *Aspergillus niger* obtained by Protoplast fusion .App. Microbiol Biotechnol. 25:504-506.

Kiyohara, H.,T. Watanabe,J.Imai,N. Takizawa,K.Nagao and A. Yamamoto. 1990. Intergeneric Hybridization Between *Monascus anka* and *Aspergillus oryzae* by protoplast fusion. Appl. Microbiol.Biotechnol. 33:671-676.

Kiguchi, T. and S.O. Yanagai. 1985. Intraspecific heterokaryon and fruit body formation in Coprinus macrorhizus by protoplast fusion of auxotroph mutants. Appl. Microbiol Biotechnol. 25:504-506.

Kurono,M.,K. Nakanishi, K.Shindo and M. Tada. 1963.Biosynthesis of monascorubin and manascoflavin. Chem. Pharm.Bell. 11:359-362.

Kolotila,M.P., P.J. Hollingaworth and P.A. Volz. 1978. Surface features of *Monascus ruber van* tieghem cleistothecia.Bot. Gaz. 139(2): 256-260.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin,C.F. 1973. Isolation and cultural conditons of *Monascus sp.* for production of pigment in submerg culture. J.Ferment. Technol. 51(6):407-414.

Lin,T.F. and A.L. Demain . 1991. Effect of nutrition of *Monascus sp.* on formation of red pigments. appl. Microbiol.Biotechnol. 36:70-75.

Lin,T.F. and Izuka. 1982. Production of extracellular pigment of *Monascus kaoliang* sp. nov.Appl.Envirin.Microbiol. 43(3):671-676.

Lotong ,S.,S. Veskijikul, W Yongmanitchai and J. Kumnuanta. 1988. Construction of high ethanol producing and acid tolorant yeast by intergeneric protoplast fusion . Micribial Utilization of Renewable Resource.Vol.6:359-364.

Mchand, P.S., W.B. Whalley and F.C. Chen. 1973. Isolation and structure of ankaflavin: a new pigment from *Monascus anka.* Phytochemistry 12:2531-2532.

Mchan,F. and G.T. Johnson. 1970. Zinc and amino acid : important components of a medium promoting growth of *Monascus perpureus*.Mycologia 62:1019-1031.

Naganshi, K., M. Ohashi., S. Kumasaki and S. Yamamura. 1959.Monascorubin structure of monascirubin and monascamine .J.Am. Chem.Soc.81:6339-6340.

Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa. 1974.Formation and reversion of streptomyces protoplast :cultural conditions and morphological study. J.Gen. Microbiol. 80:389-400.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ogawa, K., H. Ohara and N. Toyama . 1988. Intraspecific hybridization of *Aspergillus awamori* var . Kawachi by protoplast fusion .Agric. Biol. Chem.52(2): 337-342.

Palo , M. A.L.,Vidal Adeva and M.M. Leticia . 1960.A study on angkak and its production. Philippines J. Sci. 89:1-19.

Perberdy,J.F.1979. Fungal protoplast: Isolation reversetion and fusion. Ann.Rev. Microbial. 33:21-39.

Schaeffer, P.S., B. Cami , and R.D. Hotchikiss .1976. Fusion of bacterial protoplast . Proc. Natl.Acad. Sci.7(6):2151-2155.

Schineider, W.C. 1956. Phosphorus compound in animal tissue. I. Extraction and estimate of deoxypentose nucleic acid. J. Biochem. 62:316-320.

Shepherd,D. 1970. The relationships between pigment production and Sporulation in Monascus sp., pp.103-118.

Sherman, F.,G.R. Fink and C.W. Lawrence. 1977. Laboratory mannual (methods in yeast genetics) . Cold spring haber ,New York.

Stasz,T.E.,G.E. Harman and N.F. Needen.1988.Protoplast preparation and fusion in two biocontrol strain of *Trichoderma hazianum*. Mycologia. 80(2):141-150.

Stephen, G.G., C.J. Pachal and I. Russel . 1983.Current development in the genetic manipulation of brewing yeast strains. J.Inst. Brew. 189:170-187.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stumpf, P.K. 1947.A colorimetric method for the dettermination of deoxyribonucleic acid. J. Biol.Chem. 169:367-371.

Su,Y.C. and J.H. Huang. 1980. Fermentative production of anka-pigments (Monascus pigments).Proc.Nat.Sci.Counc.ROC. 4(2):201-215.

Sweeny ,J.G., M.C. Estrada-Valdes,G.A. Iacobucci,H.Sato and S. Sakamura. 1981. Photoprotection of the red pigments of *Monascus anka* in aqeous media by 1,4,6-trihydroxy-naphthalene.J.Agric.Food.Chem.29:1189-1193.

Turner,W.B. 1971. Fungal Metabolites ,pp. 445-459.In J.E. Smith and D.R. Berry (eds.) .The Filamentous Fungi .V.2:Biosynthesis and Metabolism.Edward Arnold,London. 520p.

Toyomasu, T. and K. Mori. 1987.Fruit body formation of the fusion products obtained on interspecific protoplast fusion between Pleuritus species .Agric. Biol. Chem.51(7):2037-2040.

Van de Loo,H.M. 1976. An improved method for the quantitative determimination of hexosamine according to Elson and Morgan.Anal .Biochem.76:556-560.

Wong, H.C. and P.E. Koehler.1981. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus perpureus* by carbon and nitrogen concentrations. Mycologia. 73:649-654.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yongsmith, B., L. Chitradon, S. Krairak,W. Tabloka and R. Bavavoda. 1990.Cassava fermaentation of yellow pigments and enzymes of a mutant of *Monascus* spp. in submerge cultivation. Microbial Utilization of Resources. 7:354-363.

Yongsmith, B., W. Tabloka, W. yongmanitchai and Bavavoda .1993.Culture conditions for yellow pigment formation by *Monascus* sp. KB 10 grown on cassava medium .World J. Microbiol. Biotechnology. 9:85-90.

Zamir,L.O. 1980.The biosynthesis of patulin and penicillin acid , p .223-268.In P.S. Steyn(ed.) .The Biosynthesis of Mycotoxin.Academic Press,Inc.,New York.

Zimmerman,U. and P. Scheurich.High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. *Planta*.1981;151:26-32.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหล่านี้นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นอาหารบางชนิดที่ระบุไว้โดยเฉพาะ และ pH เริ่มต้นของอาหารทุกชนิดเท่ากับ 7

1. MYS (Malt-yeast extract-starch-agar) (วรรณภา ,2539)

Peptone	5.0 กรัม
Yeast extract	3.0 กรัม
Malt extract	3.0 กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร
Agar	15.0 กรัม

2. Hypertonic Hernerberg medium(Complete medium) (Kiyohara,1990)

Glucose	100 กรัม
Peptone	10 กรัม
KNO_3	2 กรัม
$NH_4H_2PO_4$	2 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
$CaCl_2$	0.1 กรัม
Agar	20 กรัม

(โดยใช้สารละลายไฮเปอร์โทนิค 0.6 M NH_4Cl แทนน้ำปริมาณ 1 ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Defined medium (Minimal medium)(McHan และ Johnson,1970)

Glucose	40.0 กรัม
$NaNO_3$	2.0 กรัม
K_2HPO_4	3.0 กรัม
KCl	0.5 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.1 กรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	0.1 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร

ในกรณีที่แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลให้นึ่งฆ่าเชื้อแยกจากส่วนอื่น ๆ แล้วนำมาผสมกันภายหลัง

4. Hyper Czapex dox medium (Anne and Peberdy,1976)

Saccharose	40.0 กรัม
$NaNO_3$	2.0 กรัม
K_2HPO_4	3.0 กรัม
KCl	0.5 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5 กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.1 กรัม

(โดยใช้สารละลายไฮเปอร์โทนิค 0.6 M NH_4Cl แทนน้ำปริมาณ 1 ลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การแยกโปรโตพลาสต์

1.1 การเตรียมโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ ตามวิธีของ ชุลี (2536)

ก. การเตรียม citrate buffer เตรียมได้โดยผสมสารละลาย B กับสารละลาย A จนได้ pH ที่ต้องการคือ 5.5

Stock solution

สารละลาย A คือ 0.2 M sodium citrate โดยละลาย 58.82 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

สารละลาย B คือ 0.2 M citric acid โดยละลาย 42.028 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

X มิลลิลิตรของสารละลาย A + Y มิลลิลิตรของสารละลาย B

A(มิลลิลิตร)	B(มิลลิลิตร)	pH
20	1	5.7
20	1.5	5.6
20	2	5.49
20	2.5	5.4

ข. การเตรียม 0.8 M $MgSO_4.7H_2O$ ใน 0.2 M sodium citrate pH 5.5

เตรียมโดยละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 197.18 กรัม ใน 0.2 M sodium citrate 1,000 มิลลิลิตร

ค. การเตรียม 0.6 M KCl

เตรียมโดยละลาย KCl 44.73 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

ง. การเตรียม ST buffer

ST buffer ประกอบด้วย 1 M Sorbitol และ 50 mM EDTA pH 8.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

ก. การเตรียมสารละลายเอนไซม์ผสม

เอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วย chitinase, zymolyase และ cellulase โดยใช้อัตราส่วนผสมต่างกันดังนี้ 1:1:1 , 1:2:1 , 1:1:2 , 1:2:2 และ 3:2.5:5 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยละลายเอนไซม์ในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 0.8 M $MgSO_4.7H_2O$ ใน 0.2 M Sodium citrate pH 5.5

ข. การเตรียมสารละลายไลซิ่งเอนไซม์ (Lysing enzyme)

โดยใช้ความเข้มข้นของ lysing enzyme ต่าง ๆ ดังนี้ คือ 0.5 ,1 , 1.5 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยละลายเอนไซม์ในโปรโตพลาสต์บัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย 0.8 M $MgSO_4.7H_2O$ ใน 0.2 M Sodium citrate pH 5.5

2. การหลอมรวมโปรโตพลาสต์

2.1 การเตรียม Fusant agent (Anne and Peberdy,1976)

ก. การเตรียม 0.05 M Glycine NaOH buffer

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน จนได้ pH เท่ากับ 7.5

Stock solution

สารละลาย A คือ 0.2 M Glycine เตรียมโดยละลาย 0.15 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

สารละลาย B คือ 0.2 M NaOH เตรียมโดยละลาย 0.08 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร

X มิลลิลิตรของสารละลาย A + Y มิลลิลิตรของสารละลาย B โดยละลายน้ำจนปริมาตรเป็น 40 มิลลิลิตร หรือมีความเข้มข้นเท่ากับ 0.05 M

ข. สารละลาย 0.05 M $CaCl_2$

เตรียมโดยละลาย 0.055495 กรัมในสารละลายข้อ ก. 10 มิลลิลิตร

ค. สารละลาย fusant agent

ใช้ Polyethylene Glycol น้ำหนักโมเลกุล 6,000 ใช้ 30 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เตรียมโดยละลาย 3 กรัมลงในสารละลายข้อ ข. จะได้ fusant agent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การหาปริมาณดีเอนเอในเส้นใย

3.1 การเตรียมสารละลาย

3.1.1 Diphenylamine reagent

Diphenylamine	2 กรัม
Glacial acetic acid	100 มล.

เก็บไว้ในที่มืด

3.1.2 1.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อเซทาลดีไฮด์

อเซทาลดีไฮด์(Acetaldehyde)	0.2 มล.

เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.

3.1.3 6% Perchloric acid

70 % Perchloric acid	6 มล.

เติมน้ำกลั่นจนครบ 70 มล.

3.1.4 95 % Ethanol ต่อน้ำ

95 % Ethanol	4 ส่วน
น้ำกลั่น	1 ส่วน

3.1.5 สารละลายอีเธอร์ต่อเอธานอล

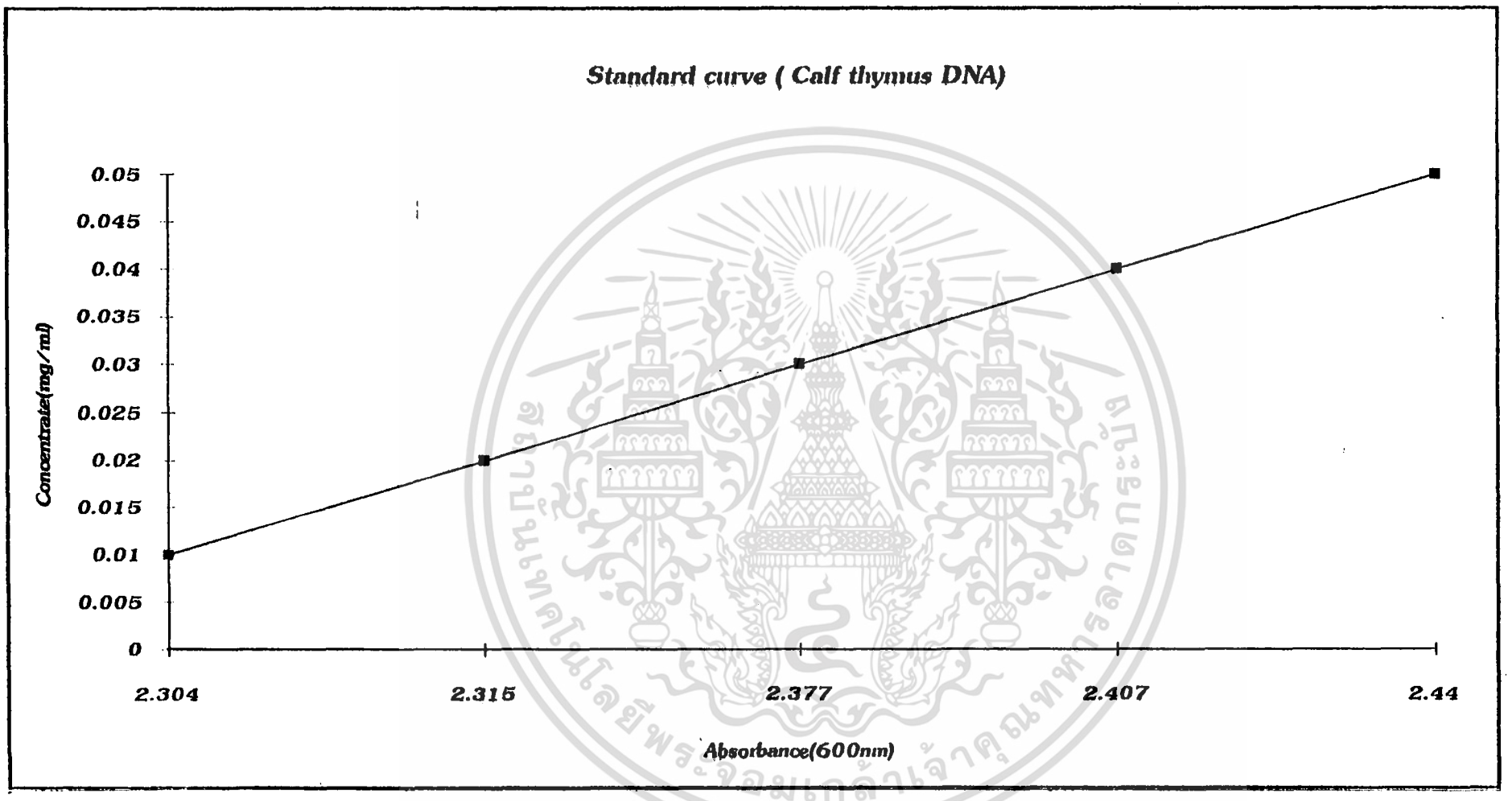
Diethyl ether	1 ส่วน
95 % Ethanol	3 ส่วน

3.2 การสร้างกราฟมาตรฐาน

ใช้คาล์ฟ ไทมัส ดีเอนเอ เป็นดีเอนเอมาตรฐาน โดยละลายคาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ ด้วยสารละลายเจือจางของ 0.0015 โมลาร์ โซเดียมซิเตรท บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เตรียมสารละลายคาล์ฟ ไทมัส ดีเอนเอที่มีความเข้มข้น 0.05 0.1 0.15 0.20 0.25 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

นำ 1 มล. ของสารละลายคาร์ฟ ไทมัส ดีเอนเอทุกความเข้มข้นมาเติม 2 มล. ของสารละลายไดเฟนีลามีน และเติม 0.1 มล. ของสารละลายอเซทาลดีไฮด์ เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



กราฟที่ 6 กราฟมาตรฐานของคาล์ฟ ไทมัส ดีเอ็นเอ

ภาคผนวก ค.

เอนไซม์และกรดอะมิโน

ก. เอนไซม์

1. เอนไซม์ lysing enzymes จาก *Trichoderma harzianum* อยู่ในรูปผงแห้ง (lyophilized powder) ประกอบด้วยโปรตีน(biuret) 80 เปอร์เซ็นต์ มีเอนไซม์ 3 ชนิดรวมกันคือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ,โปรตีเอส (protease) และ ไคติเนส(chitinase activities) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียสเป็นของ Sigma chemical Co.500 mg L-2265 lot 124H0883

2. เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) (EC 3.2.1.4) จาก *Trichoderma resei* (ATCC 26921) (9012-54-8) ของบริษัท Sigma chemical Co. USA. มี 4.8 units ต่อ 1 มิลลิกรัม ของ solid ขวดละ 10,000 units ต่อ 2.1 กรัมของ solid

3. เอนไซม์ Chitinase (EC 3.2.1.14) จาก *Streptomyces griseus* อยู่ในรูปผงแห้ง (lyophilized powder) มีโปรตีน ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (biuret) เก็บไว้ที่อุณภูมิต่ำกว่า องศาเซลเซียส ของบริษัท Sigma chemical Co. 10units C-1525 lot 35H4075

4. เอนไซม์ Lyticase crude จาก *Arthrobacter* luteus185 มิลลิกรัมของแข็ง มี 550 units ต่อ 1 มิลลิกรัมของแข็ง อยู่ในรูปผงแห้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสที่ pH 7.5 ของบริษัท Sigma chemical Co. 10000 units L-8012 lot 103 H6823

ข.กรดอะมิโน 20 ชนิด ของบริษัท Sigma chemical Co.

1.Guanine(α-amino-6-hydroxypurine hydrochloride) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_6H_5N_5O.HCl$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 187.6

2.Histidine(L-α-amino-β-imidazolepropionic acid) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_6H_9N_3O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 155.2

3.Adenine(6-aminopurine) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_5N_5$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 135.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.L-valine (L-2-amino-3-methylbutanoic acid) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_{11}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 117.1

5.Uracil(2,4-dihydroxypyrimidine)มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_4H_4N_2O$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 112.06

6.L-proline(2-pyrrolidinecarboxylic acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_9NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 115.13

7.Glutamic acid (2-aminopentanedioic acid)สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_9NO_4$ น้ำหนักโมเลกุล 147.13

8.Glutamine (2-aminoglutaramic acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_{10}N_2O_3$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ146.15

9.Glycine(aminoacetic acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_2H_5NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 75.07

10.Tyrosine(β-(p-hydroxyphenyl)alanine) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_9H_{11}NO_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 181.19

11.L-Tryptophane (l-α-aminoindole-3-propionic acid)มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{11}H_{12}N_2O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 204.22

12.Aspartic acid (aminosuccinic acid) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_4H_7NO_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 3.10

13.Asparagine(L-β-asparagine)สูตร โครงสร้างเป็น $C_4H_8N_2O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 132.12

14.Cysteine (2-aminopropanoic acid)สูตรโครงสร้างเป็น $C_6H_{12}N_2O_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 121.16

15.Methionone(2-amino-4-(methylthio)butyric acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_{11}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 149.21

16.Phenylalanine (β-phenylalanine)สูตรโครงสร้างเป็น $C_9H_{11}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 165.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.L-valine (L-2-amino-3-methylbutanoic acid) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_{11}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 117.1

5.Uracil(2,4-dihydroxypyrimidine)มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_4H_4N_2O$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 112.06

6.L-proline(2-pyrrolidinecarboxylic acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_9NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 115.13

7.Glutamic acid (2-aminopentanedioic acid)สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_9NO_4$ น้ำหนักโมเลกุล 147.13

8.Glutamine (2-aminoglutaramic acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_{10}N_2O_3$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ146.15

9.Glycine(aminoacetic acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_2H_5NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 75.07

10.Tyrosine(β-(p-hydroxyphenyl)alanine) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_9H_{11}NO_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 181.19

11.L-Tryptophane (l-α-aminoindole-3-propionic acid)มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{11}H_{12}N_2O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 204.22

12.Aspartic acid (aminosuccinic acid) มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_4H_7NO_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 3.10

13.Asparagine(L-β-asparagine)สูตร โครงสร้างเป็น $C_4H_8N_2O_3$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 132.12

14.Cysteine (2-aminopropanoic acid)สูตรโครงสร้างเป็น $C_6H_{12}N_2O_4$ มีน้ำหนักโมเลกุล 121.16

15.Methionone(2-amino-4-(methylthio)butyric acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_5H_{11}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 149.21

16.Phenylalanine (β-phenylalanine)สูตรโครงสร้างเป็น $C_9H_{11}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 165.19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17.Threonine(2-amino-3-hydroxybutyric acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_4H_9NO_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 119.12

18.Serine(2-amino-3-hydroxypropionic acid) สูตรโครงสร้างเป็น$C_3H_7NO_3$ มีน้ำหนักโมเลกุล 105.09

19.Lysine(2,6-diaminohexanoic acid) สูตรโครงสร้างเป็น$C_6H_{14}N_2O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 146.19

20.Isoleucine (2-amono-3-hydroxyvaleric acid) สูตรโครงสร้างเป็น $C_6H_{13}NO_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 131.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้