บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันการใช้สารให้ความหวาน เช่น น้ำตาลซูโครส ในอุตสาหกรรมอาหารมีความต้องการมากขึ้น แต่ราคาของน้ำตาลซูโครส มีแนวโน้มที่จะสูงเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้น การเลือกใช้สารให้ความหวานตัวอื่น เช่น ฟรักโทสจะช่วยทดแทนความต้องการนี้ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสม และมีความหวานกว่าซูโครสถึง 1.7 เท่า (1) น้ำเชื่อมฟรักโทส นิยมใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม, ผลไม้กระป๋องและขนมหวาน เป็นต้น กลูโคสไอโซเมอเรส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลฟรักโทส จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ ทั้งแบคทีเรียและ Actinomycetes โดยเฉพาะใน *Streptomyces sp.* จากการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ จากแหล่งดินในประเทศไทย โดย นางสาวนฤมล ศุภจรรยา (2) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่า *Streptomyces sp.190-1* สามารถผลิตเอนไซม์นี้ในปริมาณสูง เมื่อทำการปรับปรุง สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ และการทำงานของเอนไซม์แล้ว จะสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 171-299 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อมา นางสาว ศิริลักษณ์ ธีระดากร (3) ทำการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ในการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า *Streptomyces sp.190-1* ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้สูงถึง 1,100 หน่วย ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวัสดุเหลือใช้จากการเกษตรที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ และได้ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเช่น รำข้าว,กากถั่วเหลือง เปลือกเมล็ดฝ้าย ทั้งนี้ เพราะการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสโดย *Streptomyces sp.190-1* ต้องการไซโลสเป็นสารชักนำ

ได้มีรายงานว่า การสังเคราะห์กลูโคสไอโซเมอเรสในจุลินทรีย์หลายชนิดก็ต้องอาศัยน้ำตาลไซโลสเป็นตัวชักนำเช่นกัน (4) ดังนั้น ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จึงต้องเลี้ยงในอาหารที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ แต่น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์นั้นมีราคาแพง จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้โดยตรงในการผลิตระดับอุตสาหกรรม Takasaki (5, 6) พบว่า *Streptomyces albus* สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรส

ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลน หรือวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่นเปลือกข้าวโพด, ฟางข้าง และ รำข้าว เป็นต้น ทั้งนี้ เนื่องจากเชื้อนี้สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยนไซแลนให้เป็นไซโลสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นได้มีผู้พบว่า *Streptomyces sp.* อีกหลายสายพันธุ์ สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้เช่นกัน (7, 8,9) ดังนั้น หากสามารถปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Streptomyces sp.190-1* ที่สร้างกลูโคสไอโซเมอเรสให้สามารถสร้างเอนไซม์ไซแลนเนสได้ ก็จะสามารถเลี้ยงเชื้อและชักนำให้ผลิตเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ โดยไม่ต้องเติมไซโลสซึ่งเป็นตัวชักนำ การสร้างเอนไซม์กลูโคส-ไอโซเมอเรสลงไปอีก

การปรับปรุงสายพันธุ์ใน *Streptomyces*

การปรับปรุงสายพันธุ์ เป็นการทำให้จุลินทรีย์นั้นมีลักษณะใหม่ตามต้องการ เช่น ปรับปรุงให้ผลิตสารได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม หรือให้ได้สารชนิดใหม่ เช่น ยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ โดยการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม วิธีการที่นำไปใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์มี 3 วิธี ได้แก่

1. การกลายพันธุ์ (mutation)
2. การรีคอมบิเนชัน (recombination) รวมถึงการคอนจูเกชัน (conjugation) และการเชื่อมโปรโตพลาสท์ (protoplast fusion)
3. การทำยีนโคลนนิง (gene cloning)

วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์แต่ละวิธีมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไป และในบางกรณีอาจใช้ทั้ง 3 วิธีการร่วมกัน เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ข้อดีของการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ คือ ทำได้ง่าย และไม่ต้องการความรู้ในรายละเอียดด้านพันธุกรรม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างสารของจุลินทรีย์นั้นมากนัก ได้ผลรวดเร็วเมื่อใช้วิธีการที่เหมาะสมและถูกต้อง ส่วนการทำรีคอมบิเนชันนั้นใช้ได้ดีในการสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่ต้องการรวมคุณสมบัติต่าง ๆ ของจุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมหรือทางชีวเคมีที่ไม่เหมือนกัน เข้าไว้ด้วยกัน ส่วนการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการทำยีนโคลนนิงนั้น จะมีประโยชน์มากในจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาถึงลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการปรับปรุงแล้วอย่างละเอียด

Streptomyces sp. เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม โดยพบว่า สารหลายชนิดที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น ยาปฏิชีวนะ สารต้านมะเร็ง (anticancer agent) และเอนไซม์หลายชนิดผลิตได้โดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ (10) ในธรรมชาติจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะเกิดการรีคอมบิเนชันแบบคอนจูเกชัน โดยการส่ง DNA บางส่วนผ่าน conjugation tube ทำให้มีการถ่ายทอดลักษณะจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งไปยังอีกชนิดหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตาม การนำวิธีคอนจูเกชันมาใช้เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากมีความถี่ในการรีคอมบิเนชันต่ำมาก คือ ประมาณ 10^{-6} หรือต่ำกว่า (11) และในบางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถเกิดการคอนจูเกชันได้ ดังนั้น อีกวิธีการหนึ่งซึ่งสามารถใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์โดยอาศัยการรีคอมบิเนชันก็คือ การเชื่อมโปรโตพลาสท์ (protoplast fusion) ซึ่งให้ความถี่ของรีคอมบิเนชันสูง

การเชื่อมโปรโตพลาสท์ (protoplast fusion) เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันของสารพันธุกรรม ทั้งในจุลินทรีย์ที่เป็น ยูคาริโอท และโปรคาริโอท เทคนิคนี้ไม่ต้องการข้อมูลด้านพันธุศาสตร์ละเอียดมากนัก เนื่องจากไม่ต้องใช้ transducing phage หรือ plasmid หรือ sex factor เหมือนวิธีการอื่น ในจุลินทรีย์ที่มีความถี่ในการรีคอมบิเนชันต่ำ ๆ หรือจุลินทรีย์ที่ไม่พบว่าสามารถเกิดการคอนจูเกชันได้ หากใช้เทคนิคการเชื่อมโปรโตพลาสท์แล้ว จะช่วยให้มีความถี่ในการรีคอมบิเนชันสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การเชื่อมโปรโตพลาสท์ต้องใช้วิธีการที่เหมาะสมเพื่อทำให้เกิดโปรโตพลาสท์ที่เสถียร และมีการเชื่อมรวมกันอย่างมีประสิทธิภาพ ตลอดจนมีความสามารถในการกลับคืนรูปเป็นเซลล์ปกติ หลังจากที่ได้ทำการเชื่อมโปรโตพลาสท์แล้ว

การเชื่อมโปรโตพลาสท์ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ

1. <u>การเตรียมโปรโตพลาสท์</u> (protoplast preparation) เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนเซลล์ให้เป็นโปรโตพลาสท์ โดยการย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสม โปรโตพลาสท์อาจถูกทำลายได้ถ้าอยู่ในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติกไม่เหมาะสม ดังนั้น การเก็บรักษาโปรโตพลาสท์จึงต้องทำในสารละลายที่เป็น isotonic

2. <u>การเชื่อมโปรโตพลาสท์</u> (protoplast fusion) เป็นขั้นตอนของการเหนี่ยวนำให้โปรโตพลาสท์ของเชื้อ 2 ชนิดมาเชื่อมรวมกัน โดยการใช้สารเคมี หรือกระแสไฟฟ้าเป็นตัวเหนี่ยวนำ เมื่อมีการเชื่อมรวมกันแล้ว จะได้เป็นลูกผสมที่มีสภาพเป็นดิพพลอยด์ (diploid) มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด ชั่วระยะหนึ่ง พบว่าในโปรคาริโอท เช่น Bacillus และ Streptomyces การรีคอมบิเนชันจะเกิดในความถี่ที่สูงเนื่องจากโครโมโซมอยู่อย่างอิสระในไซโตพลาสซม ส่วนในยูคาริโอท เช่น เชื้อรา นั้น เมื่อมีการเชื่อมโปรโตพลาสท์แล้วจะต้องมีการหลอมนิวเคลียสเกิดขึ้นด้วย จึงจะเกิดการรีคอมบิเนชันที่แท้จริงขึ้น

สารที่นิยมใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมกันของโปรโตพลาสท์ ได้แก่ โพลีเอทธิลีนไกลคอล (PEG) ซึ่งในครั้งแรกนั้นใช้ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของพืช (12) และพบว่าสามารถใช้ได้ดีใน *Streptomyces sp.* (13 - 17) เช่นกัน

3. <u>การเปลี่ยนโปรโตพลาสท์ไปเป็นเซลล์ปกติ</u> (protoplast regeneration) หลังจากที่โปรโตพลาสท์รวมตัวกันแล้ว โปรโตพลาสท์จะต้องถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นเซลล์ปกติอีกครั้งหนึ่ง เพื่อที่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ทั้งนี้ เนื่องจากโปรโตพลาสท์เป็นโครงสร้างที่เพิ่มจำนวนไม่ได้ ในช่วงนี้โครโมโซมอาจมีการเลือกสรร หรือเข้าชุดกันใหม่ (reassort)และเกิด crossing over ทำให้มีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม ในที่สุดลูกผสมที่ได้จะแบ่งตัว ทำให้มีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (Haploid) ได้เป็นลูกผสมลักษณะใหม่ที่มีความเสถียร (stable) เกิดขึ้น

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดและการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์</u>

ความสามารถในการเกิดเป็นโปรโตพลาสท์ การเชื่อมโปรโตพลาสท์และการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์นั้น จะแตกต่างกันอย่างมาก ในจุลินทรีย์แต่ละชนิด การที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งสามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสท์ได้ดีนั้น ไม่ได้หมายความว่าประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์จะต้องดีด้วยเสมอไป ความแตกต่างในรายละเอียดของสภาวะแวดล้อมหรือเทคนิคที่ใช้ในการทดลอง ทั้งก่อนการทำให้เกิดโปรโตพลาสท์และในระหว่างการรีเจนเนอเรท อาจมีผลอย่างมากต่อประสิทธิภาพใน

การเกิดโปรโตพลาสท์ และความถี่ในการรีเจนเนอเรท ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ ได้แก่

1. ความเข้มข้นของไกลซีน

การเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไกลซีนอยู่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการเกิดโปรโตพลาสท์ โดย Sagara และคณะ (18) รายงานว่า เมื่อเติมไกลซีนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่ทำให้การเจริญของเชื้อ *S. griseoflavus* ลดลง จะเป็นผลทำให้ไมซีเลียม มีความไวต่อไลโซไซม์มากกว่าไมซีเลียมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมไกลซีน เนื่องจากไกลซีนความเข้มข้นสูงจะทำให้การสร้างผนังเซลล์ผิดปกติ โดยไกลซีนจะเข้าไปแทนที่อลานีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ และมีผลลดการยึดตัวกันของผนังเซลล์ (cross -link) (19)

Okanishi และคณะ (20) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของไกลซีนที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *S. griseus* และ *S. venezuelae* จะแตกต่างกัน โดย *S. griseus* จะเกิดโปรโตพลาสท์ได้ดีเมื่อความเข้มข้นของไกลซีนเป็น 0.8% ในขณะที่ *S. venezuelae* ต้องใช้ไกลซีน 2% Hopwood และคณะ (11) ได้รายงานยืนยันข้อสังเกตนี้ โดยพบว่าจากการศึกษาในเชื้อ *Streptomyces* 5 ชนิด ความเข้มข้นที่เหมาะสมของไกลซีนจะแตกต่างกันไปอยู่ในช่วง 1.0 ถึง 4.0% แต่ก็มีผู้รายงานว่าการใช้เชื้อบางชนิดที่มีอายุน้อยมาก กล่าวคือ เป็นสปอร์ที่พึ่งเริ่มงอกในช่วงเวลา 2-3 ชั่วโมง แม้ไม่ได้เติมไกลซีนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อก็สามารถเกิดโปรโตพลาสท์ได้ดี แต่ถ้าใช้ไมซีเลียมที่มีอายุมากขึ้น การจะทำให้การเกิดโปรโตพลาสท์จำเป็นต้องมีไกลซีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และยังมีผู้พบอีกว่าบางครั้งการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมไกลซีนลงไปก็สามารถทำให้เกิดโปรโตพลาสท์ได้โดยไม่ต้องใช้ไลโซไซม์ (21) อย่างไรก็ตาม ส่วนใหญ่แล้วไกลซีนเข้มข้น 0.5% จะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับ *Streptomyces* โดยทั่วไป (22)

2. อายุของเชื้อ

อายุของเชื้อที่ใช้ในการทำโปรโตพลาสท์ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการรีเจนเนอเรท จากการศึกษาใน *Streptomyces* 2 ชนิด โดย Baltz (14) พบว่าประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์ ที่เตรียมได้จากเชื้อที่มีอายุอยู่ในช่วงเวลาต่าง ๆ ของวงชีวิต จะมีค่าแตกต่างต่างกันไป ใน *S. griseofuscus* จะสามารถรีเจนเนอเรทได้ดีที่สุด เมื่อใช้โปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากเชื้อที่มีอายุอยู่ในช่วงต่อระหว่าง exponential phase และ stationary phase ไมซีเลียมที่มีอายุเลยจากช่วงนี้ไป เมื่อนำไปเตรียมโปรโตพลาสท์จะรีเจนเนอเรทได้น้อยลง ส่วน *S. fradiae* รีเจนเนอเรทได้ดี เมื่อใช้โปรโตพลาสท์ที่เตรียมได้จากไมซีเลียม ที่มีการเจริญอยู่ในช่วงต้นของ exponential phase ในขณะที่ไมซีเลียมที่เจริญอยู่ในช่วง exponential ตอนกลางถึงตอนปลาย จะรีเจนเนอเรทได้น้อยลง Okanishi และคณะ (20)รายงานว่าสำหรับโปรโตพลาสท์ของ *S. griseus* และ *S. venezuelae* ที่เตรียมได้จากไมซีเลียมที่เจริญอยู่ในช่วง exponential phase ตอนกลางจะรีเจนเนอเรทได้ดีที่สุด แต่ก็มีผู้ที่รายงานว่าการใช้ไมซีเลียมที่มีอายุต่างกัน อาจไม่มีผลต่อการรีเจนเนอเรทเลยก็ได้ (23)

3. บัฟเฟอร์ที่ใช้รักษาสภาพโปรโตพลาสท์

Okanishi และคณะ (20) รายงานว่า โปรโตพลาสท์จะเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพและมีความเสถียรเมื่อเก็บรักษาในสารละลายที่เป็น hypertonic ซึ่งมี 10 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์และ 25 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ อยู่ หรือที่เรียกว่าบัฟเฟอร์ P โดยถ้าไม่มีแมกนีเซียมคลอไรด์และแคลเซียมอยู่ จะเกิดโปรโตพลาสท์น้อย และมีการแตกมากใน *S. griseus* นอกจากนี้ซูโครสก็เป็นตัวที่ช่วยรักษาสภาพโปรโตพลาสท์ด้วย

Hooley และคณะ (29) ศึกษาการเกิดโปรโตพลาสท์ของเชื้อ 7 ชนิด พบว่าสารที่ใช้รักษาสภาพโปรโตพลาสท์ที่เหมาะสมในเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน โดย 2 สายพันธุ์จะเกิดโปรโตพลาสท์ได้ดีเมื่อใช้ซูโครสเป็นตัวรักษาสภาพในบัฟเฟอร์ P

3 สายพันธุ์เกิดโปรโตพลาสท์ได้ดีเมื่อใช้ 0.3 โมลาร์ กลูโคส เป็นตัวรักษาสภาพ และอีก 2 สายพันธุ์ จะเกิดโปรโตพลาสท์ได้ดีเมื่อใช้ 0.3 โมลาร์ ของ adonitol หรือ inositol แทน 0.3 โมลาร์ ของซูโครสในบัฟเฟอร์ P

Illing และคณะ (25) ได้ปรับปรุงสูตรของบัฟเฟอร์ P โดยการเติม 1% BSA ลงไปในบัฟเฟอร์ ทำให้โปรโตพลาสท์ของ *S. clavuligerus* ซึ่งปกติจะสูญเสีย viability อย่างรวดเร็วเมื่อเก็บรักษาในบัฟเฟอร์ P ที่อุณหภูมิห้อง มีอัตราการอยู่รอดสูงกว่า เมื่อใช้บัฟเฟอร์ P เพียงอย่างเดียว และยังเป็นผลให้ความถี่ในการรีเจนเนอเรทสูงขึ้นอีกด้วย

4. <u>การเกิดออโตอินฮิบิชัน (auto inhibition)</u>

ในระหว่างการรีเจนเนอเรทของ *Streptomyces* หลายสายพันธุ์ พบว่ามีปรากฏการณ์ออโตอินฮิบิชันเกิดขึ้น กล่าวคือ โปรโตพลาสท์ที่สามารถรีเจนเนอเรทได้เร็วกว่า จะไปยับยั้งการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์ ที่อยู่บริเวณข้างเคียง (11, 14, 30) เนื่องจากการรีเจนเนอเรทนั้นเกิดไม่พร้อมกันขึ้นอยู่กับไมซีเลียมที่ใช้ ดังนั้น โปรโตพลาสท์ที่สามารถเจริญได้เร็วกว่าอาจสร้างสารปฏิชีวนะ หรือเอนไซม์ที่ย่อยสลาย (lytic enzyme) ออกมายับยั้งการเจริญของโคโลนีที่เจริญได้ช้ากว่า หรืออาจเนื่องจากอาหารที่มีอยู่นั้นหมดไป จึงทำให้โปรโตพลาสท์ที่รีเจนเนอเรททีหลัง ไม่สามารถเจริญต่อไปได้(31)การกำจัดเอาน้ำออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการรีเจนเนอเรทบางส่วนจะช่วยกำจัดการเกิดออโตอิฮิบิชันได้ พบว่าการกำจัดน้ำออกไปประมาณ 15 ถึง 22 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักจะช่วยลดการเกิดออโตอินฮิบิชันได้ดีที่สุด เพราะช่วยลดการแพร่กระจายของสารยับยั้ง ที่ปล่อยออกมาจากโปรโตพลาสท์ที่รีเจนเนอเรทก่อน และยังเป็นผลให้ความถี่ในการรีเจนเนอเรทสูงขึ้นอีกด้วย (30)

5. <u>องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการรีเจนเนอเรท</u>

Okanishi และคณะ (20) ได้ทำการศึกษาการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์อย่างจริงจัง พบว่าเชื้อแต่ละชนิดสามารถรีเจนเนอเรทได้ดีในอาหารเลี้ยง

เชื้อต่างชนิดกัน และความเข้มข้นที่ต่างกันของแต่ละองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น แมกนีเซียมคลอไรด์, แคลเซียมคลอไรด์, ฟอสเฟต หรือกรดคาสอมิโน จะมีผลทำให้รีเจนเนอเรทได้ดีต่างกัน เขาได้ปรับปรุงเป็นสูตรอาหาร สำหรับใช้ในการรีเจนเนอเรท R_1 และ R_2 ซึ่งเมื่อให้โปรโตพลาสท์ของ *S. griseus* รีเจนเนอเรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ R_1 จะให้ความถี่เป็น 41% และโปรโตพลาสท์ของ *S. venezuelae* ให้ความถี่ของการรีเจนเนอเรทบนอาหารเลี้ยงเชื้อ R_2 เป็น 51% ได้มีผู้นำสูตรอาหารนี้ไปปรับปรุงเพื่อใช้ในการรีเจนเนอเรทของเชื้อชนิดต่างๆ อีกมากมาย (11, 14, 17, 24, 25) จนถึงปัจจุบันได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารที่ใช้ในการรีเจนเนอเรทเป็น R_6 ซึ่ง Illing และคณะ (25) ได้ทำการปรับปรุงจากสูตรอาหาร R_5 เพื่อใช้รีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *S. clavuligerus* ซึ่งเดิมรีเจนเนอเรทได้ไม่ดีบนอาหารชนิดอื่น โดย R_6 ได้เปลี่ยนบัฟเฟอร์เป็น MOPS แทนบัฟเฟอร์ TES ที่เคยใช้ใน R_2 และเพิ่ม dextrin เข้าไป สูตรอาหาร R_6 นี้ยังสามารถใช้ได้ผลดีกว่าใน *S. coelicolor* และ *S lividans* เมื่อเลี้ยงเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร R_2 ซึ่งปรับปรุงโดย Okanishi และคณะ

Pigac และคณะ (26) รายงานว่า การเติม เจลาติน ลงในอาหารที่ใช้สำหรับรีเจนเนอเรทจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรทได้ 3-5 เท่า ในขณะที่ Merdamadi - Tehrani และคณะ (27) รายงานว่า การเติมเจลาติน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ R_2 อาจจะไปเพิ่มหรือลดประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรทก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแต่ละชนิด

6. <u>กรรมวิธีที่ใช้ในการรีเจนเนอเรท</u>

การปรับปรุงกรรมวิธีที่ใช้ในการกระจายโปรโตพลาสท์และบ่ม เพื่อให้เกิดการรีเจนเนอเรทจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรทสูงขึ้น Shirayama และคณะ (28) ใช้วุ้นอ่อน (soft agar) 0.6% ผสมกับโปรโตพลาสท์แล้วจึงเทราดทับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ พบว่าทำให้มีการรีเจนเนอเรทได้ดีขึ้น นอกจากนี้ การทำให้ผิวหน้าของอาหารวุ้น ซึ่งอยู่ชั้นล่างแห้งก่อนที่จะกระจายโปรโตพลาสท์หรือการบ่มโปรโตพลาสท์ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น 26° ซ. ก็มีส่วนช่วยให้การรีเจนเนอเรทดีขึ้น

7. สภาวะทางกายภาพ

นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาแล้ว สภาวะทางกายภาพหรือสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญต่อการรีเจนเนอเรทของโปรโตพลาสท์เช่นกัน กล่าวคือ

7.1 อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญของเชื้อก่อนเตรียมโปรโตพลาสท์

มีรายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ก่อนเตรียมโปรโตพลาสท์มีผลอย่างมากต่อการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ใน *Streptomyces* บางสายพันธุ์ (32) จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการรีเจนเนอเรท Baltz และคณะ (30) พบว่า *S. fradiae* จะรีเจนเนอเรทได้ดีเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 29 °ซ. หรือต่ำกว่า และถ้าเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ ประสิทธิภาพในการรีเจนเนอเรทจะลดลง และถ้าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเป็นอุณหภูมิเดียวกับที่ใช้ในการรีเจนเนอเรทพบว่าที่ 32°ซ หรือต่ำกว่านี้จะทำให้รีเจนเนอเรทได้ดี ขณะที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้การรีเจนเนอเรทลดลง และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ อาจไม่ใช่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการรีเจนเนอเรทเช่นกัน อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงเชื้อที่ 30°ซ จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการรีเจนเนอเรทใน *Streptomyces* โดยทั่วไป

7.2 อุณหภูมิที่ใช้บ่มระหว่างการรีเจนเนอเรท

Baltz และคณะ (30) ยังได้รายงานอีกว่า นอกจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแล้ว อุณหภูมิที่ใช้บ่มระหว่างการรีเจนเนอเรท ก็มีผลต่อการรีเจนเนอเรทเช่นกัน เมื่อบ่มโปรโตพลาสท์ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงคือในช่วง 37-42°ซ การรีเจนเนอเรทจะลดลงอย่างมาก และการบ่มที่อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ 29-30°ซ จะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการรีเจนเนอเรทโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces* ส่วน Keller และคณะ (23) ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้บ่มเช่นกัน และรายงานว่า อุณหภูมิต่ำสุดที่ทำการศึกษาคือที่ 23°ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการรีเจนเนอเรทและยังช่วยให้การรีเจนเนอเรทเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ในระยะเวลาที่เร็วกว่าเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูง 1-2 วัน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเชื่อมโปรโตพลาสท์

1. โพลีเอทธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol, PEG)

การใช้ PEG เป็นสารเหนี่ยวนำ เริ่มครั้งแรกในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของพืช (12) และต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *Streptomyces* ซึ่งได้มีการเลือกใช้ PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล และความเข้มข้นแตกต่างกันไป แล้วแต่ความเหมาะสมในแต่ละการวิจัย กล่าวคือ

Hopwood และคณะ (33) รายงานว่า ความถี่ของการรีคอมบิเนชันสูงสุดเมื่อใช้ PEG 1000 เข้มข้น 50% และการเติม dimethyl sulphoxide (DMSO) ซึ่งเคยมีรายงานว่า จะช่วยให้ความถี่ในการรีคอมบิเนชันสูงขึ้น ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของเซลล์สัตว์ กลับมีผลเพียงเล็กน้อยเมื่อนำมาใช้กับ *S. coelicolor* และเมื่อใช้ PEG ที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้ ความถี่ในการรีคอมบิเนชันจะลดลงอย่างเห็นได้ชัด ส่วน PEG ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 50% ก็ทำให้การรีคอมบิเนชันลดลงเช่นกัน เนื่องจากที่ความเข้มข้นสูง ๆ PEG จะมีความหนืดสูง ทำให้เคลือบโปรโตพลาสท์ได้ยาก และกินเวลานาน

Baltz (14) ใช้ PEG 6000 เข้มข้น 40% ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *S. fradiae* ได้ความถี่ในการรีคอมบิเนชัน 0.3% ซึ่งค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้ อาจเนื่องจาก PEG มีความหนืดมากเกินไป หรือเป็นความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม และต่อมาเขาพบว่าเมื่อใช้ PEG 1000 ที่ความเข้มข้น 40-60% จะทำให้การรีคอมบิเนชันดีขึ้น

Ochi และคณะ (17) รายงานว่าการใช้ PEG 4000 จะให้ประสิทธิภาพในการรีคอมบิเนชันดีที่สุด และประสิทธิภาพจึงลดลงเมื่อน้ำหนักโมเลกุลของ PEG เพิ่มขึ้น

Keller และคณะ (23) รายงานว่า การใช้ PEG 4000 จะให้ความถี่ในการรีคอมบิเนชันสูงกว่าเมื่อใช้ PEG 1000 หรือ 6000 ส่วน Valin และคณะ

(35) รายงานว่า ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *S. rimosus* จะมีความถี่ในการรีคอมบิเนชันสูงสุด เมื่อใช้ PEG 6000 เข้มข้น 50% ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้ PEG 1500 หรือ PEG 4000

Hranueli และคณะ (36) รายงานว่า เมื่อใช้PEG 1550 เข้มข้น 40% จะทำให้ *S. rimosus* มีความถี่ในการรีคอมบิเนชันสูงสุด

อย่างไรก็ตาม การใช้ PEG ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายสูงกว่า 40% และมีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 4000 จะช่วยให้การเชื่อมโปรโตพลาสท์เกิดได้ดีที่สุดและเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงหรือต่ำกว่านี้ จะทำให้การรีคอมบิเนชันลดลง

2. <u>อัตราส่วนของโปรโตพลาสท์ที่ใช้</u>

โดยทั่วไปนิยมใช้อัตราส่วนของสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ ในอัตราส่วน 1:1 (11, 30, 35) แต่ก็มีผู้รายงานว่า ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *S. chrysomallus 560* และ *S. chrysomallus 2010* นั้น เมื่อใช้อัตราส่วนของโปรโตพลาสท์ของ *S. chrysomallus* 2010 ซึ่งมีการรีเจนเนอเรทไม่ดีในอัตราส่วนที่มากกว่า *S. chrysomallus 560* ซึ่งมีการรีเจนเนอเรทดีกว่า เท่ากับ 5:1 จะช่วยให้การรีคอมบิเนชันดีกว่าเมื่อใช้ในอัตราส่วน 1:1

3. <u>ระยะเวลาที่ใช้ในการเชื่อมโปรโตพลาสท์</u>

Ochi และคณะ (17) รายงานว่า การเชื่อมโปรโตพลาสท์จะมีประสิทธิภาพดีที่สุด ในช่วงเวลาหลังจากที่เติม PEG ลงไปทันที แต่การเชื่อมรวมตัวกันอย่างสมบูรณ์นั้นจะใช้เวลา 15-20 นาที เช่นเดียวกับที่ Hranueli และคณะ (36) รายงานว่า ถึงแม้ว่าการยึดติดกันของโปรโตพลาสท์จะเกิดในทันทีที่ได้เติม PEG ลงไป แต่การเชื่อมรวมตัวกันอย่างสมบูรณ์นั้นต้องใช้เวลานานถึง 30 นาที

การนำเทคนิคการเชื่อมโปรโตพลาสท์ไปประยุกต์ใช้

ดังได้กล่าวแล้วว่า การเชื่อมโปรโตพลาสท์เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการชักนำให้เกิดการรีคอมบิเนชันทางพันธุกรรม ได้มีผู้นำข้อดีนี้ไปใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Streptomyces* เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตหรือให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ที่มีสมบัติตามต้องการ กล่าวคือ Valin และคณะ (35) รายงานว่า การเชื่อมโปรโตพลาสท์ของ *S. rimosus* ทำให้ลูกผสมที่ได้ ผลิตออกซีเตตราซัยคลิน ได้สูงขึ้นจากเดิม 4 - 5 เท่า Thomas และCrawford (37) เชื่อมโปรโตพลาสท์ระหว่าง *S. viridosporus* T7A และ *S. setonii* 75 Vi 2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายลิกนิน ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ จะสร้างสารที่ใช้ในการย่อยสลายลิกนิน เพิ่มขึ้นจากเดิม 155 - 264 % Ogata และคณะ (38) รายงานถึงการเชื่อมโปรโตพลาสท์ ของ *S. azureus* ทำให้ได้ลูกผสมที่สามารถสร้าง ไธโอสเตรพตอน (thiostrepton) ได้สูงขึ้น นอกจากนี้ Yamashita และคณะ (39) ยังได้รายงานถึงการสร้างยาปฏิชีวนะชนิดใหม่ของลูกผสม ซึ่งได้จากการเชื่อมโปรโตพลาสท์ ของ *S. griseus* ที่ผลิตสเตรพโตมัยซิน กับ *S. tenjimariensis* ที่ผลิตอิสทามัยซิน

จากรายงานข้างต้นนี้ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp.190-1* ที่ผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสให้ผลิตไซแลนเนสได้ด้วย โดยการใช้เทคนิคการเชื่อมโปรโตพลาสท์ เช่นกัน

เหตุจูงใจในการทำวิจัย

จากความต้องการใช้สารให้ความหวานเป็นจำนวนมาก ในประเทศไทย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมน้ำอัดลมนั้น มีแนวโน้มที่จะนำเอาฟรักโทสไซรัป มาใช้แทนน้ำตาลทราย เนื่องจากฟรักโทสไซรัปเป็นของเหลวซึ่งมีข้อดีในแง่ช่วยประหยัดและลดขั้นตอนในการผลิต (40) ประกอบกับได้มีการศึกษาถึงการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรส ของ *Streptomyces sp. 190-1* ซึ่งแยกได้จากแหล่งดินในประเทศไทย (2, 3) ที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ ปริมาณใกล้เคียงกับที่จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ ซึ่งใช้อยู่ในอุตสาหกรรมผลิตได้ (41) โดยใช้ไซโลสเป็นตัวชักนำในการสร้างเอนไซม์ และได้มีการ

ศึกษาถึงการผลิตไซแลนเนสของ *Streptomyces sp. 42-9* (42) ซึ่งสามารถย่อยสลายไซแลนให้เป็นไซโลสโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบดังนั้น การรวมลักษณะที่ดีของ *Streptomyces sp.* 190-1 เข้ากับ *Streptomyces sp.42-9*จะทำให้ได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ ที่สร้างเอนไซม์ไซแลนเนสมาย่อยสลายไซแลนให้เป็นไซโลสและจะมีผลชักนำการสร้างเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสได้ ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการผลิตกลูโคสไอโซเมอเรสได้มาก

จากรายงานการศึกษา เทคนิคในการเชื่อมโปรโตพลาสท์ ดังกล่าวมาข้างต้น พบว่า สามารถทำได้ง่าย และไม่ต้องการข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ของเชื้อนั้นละเอียดมาก ได้ความถี่ในการรีคอมบิเนชันค่อนข้างสูง และเกิดได้ทั้งในเชื้อชนิดเดียวกัน (intra specific) และต่างชนิดกัน (inter specific) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ ที่จะปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces sp.* 190-1 โดยใช้เทคนิคการเชื่อมโปรโตพลาสท์กับ *Streptomyces sp.* 42-9 เพื่อให้ได้ลูกผสมสายพันธุ์ใหม่ ที่ผลิตได้ทั้งเอนไซม์กลูโคสไอโซเมอเรสและไซแลนเนส