ว. เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 24 : 339 - 346 (2533)

เทคนิคการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ osmotolerant yeast

Protoplast Isolation Technique of Osmotolerant Yeast

มณี ตันติรุ่งกิจ และ อรวรรณ อนุวงษ์ปฐม [1]

Manee Tantirungkij and Orawan Anuvongpathom

ABSTRACT

Protoplasts of osmotolerant yeast strain AM-06 and AM-35 were isolated by digesting cell wall with lytic enzyme mixture containing 10 mg zymolyase-5000, 0.1 M 2-mercaptoethanol and 2/15 M phosphate buffer (pH 7.5) in the presence of 0.6 M and 1.0 M KCl, respectively. The higher yield of protoplast formation was obtained from cells in log phase. In term of osmotic stabilizer, sorbitol and mannitol can be used instead of KCl.

บทคัดย่อ

ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ osmotolerant yeast สายพันธุ์ AM-06 และ AM-35 นั้น ทำได้โดยนำเซลล์ในช่วง log phase มาย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่มี zymolyase-5000 10 มก., 0.1 M 2-mercaptoethanol และ 2/15 M phosphate buffer (pH 7.5) เป็นองค์ประกอบและมี 0.6 M KCl เป็น osmotic stabilizer สำหรับเชื้อ AM-06 และ 1.0 M KCl เป็น osmotic stabilizer สำหรับเชื้อ AM-35 นอกจากนี้ยังสามารถใช้ sorbitol และ mannitol แทน KCl ได้อีกด้วย

คำนำ

โปรโตพลาสต์คือ โครงสร้างของเซลล์พืชหรือจุลินทรีย์ที่ไม่มีผนังเซลล์ (Cell wall) ห่อหุ้ม ซึ่งได้มาจากการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ เมื่อนำไปเลี้ยงในสภาพที่เหมาะสม โปรโตพลาสต์นี้จะสามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญแบ่งเซลล์ได้ การเตรียมโปรโตพลาสต์นั้น ก็เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านต่าง ๆ คือ 1) การเตรียม cell free extract (intracellular enzyme, DNA) และ organelles ต่าง ๆ ภายใน cell (mitochondria, nuclei) 2) การศึกษาถึงคุณสมบัติทาง

[1] ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง ม.ก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Central Laboratory and Greenhouse Complex, KURDI, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

กายภาพและชีวเคมี รวมทั้งขบวนการสังเคราะห์ของสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ (cell wall metabolism, nucleic acid metabolism, amino acid transport system) และ 3) การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ (protoplast fusion, transformation)

ในปี ค.ศ. 1957 Eddy และ Williamson ได้เตรียมโปรโตพลาสต์ของยีสต์ขึ้นสำเร็จเป็นครั้งแรกโดยใช้ snail - gut enzyme ย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces calbergensis* เป็นเวลา 2 – 3 ชม. โดยมี rhamnose เป็น osmotic stabilizer ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของยีสต์นั้น มี 3 องค์ประกอบสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ 1) lytic enzyme ซึ่งใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ของยีสต์ ซึ่งในปัจจุบัน lytic enzyme ที่ใช้มีด้วยกันหลายชนิดทั้งที่เตรียมจากหอยทากและจุลินทรีย์ เช่น glusulase, helicase, β -glucuronidase, zymolyase 60000, lytic enzyme LI. mutanase และ Novozyme เป็นต้น (Potter *et al.*, 1985) และอาจใช้ protease (Peberdy, 1979) หรือสารประกอบพวก thiol (Deutch and Parry, 1974) ร่วมด้วย ซึ่งจะช่วยให้เซลล์เปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสต์ได้ดีขึ้น 2) osmotic stabilizer ซึ่งจำเป็นต่อการรักษาสภาพของโปรโตพลาสต์ สารที่นิยมใช้นั้นมีทั้งพวก inorganic salt (KCl, $MgSO_4$), sugar (rhamnose, maltose, lactose) และ sugar alcohol (sorbitol, mannitol) และความเข้มข้นที่นิยมใช้คือ 0.6-1.0 M ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารและสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ (Kuo & Yamamoto, 1975) เช่นใช้ 0.8 M sorbitol สำหรับโปรโตพลาสต์ของ *Saccharomyces cerevisiae* (Stewart and Russel, 1979), ใช้ 0.6 M KCl สำหรับโปรโตพลาสต์ของ *Kluyveromyces* spp. (Johannsen *et al.*, 1984) และใช้ 1.0 M sorbitol สำหรับโปรโตพลาสต์ของ *Zygosaccharomyces fermentati* และ *S. cerevisiae* (Pina *et al.*, 1986) และ 3) ยีสต์ที่ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์พบว่า นอกจากสายพันธุ์ของยีสต์เองแล้ว physiological stage ของยีสต์นั้นก็เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการแยกโปรโตพลาสต์จากเซลล์โดยพบว่าเซลล์ของยีสต์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนเป็นโปรโตพลาสต์ได้ดีในช่วง log phase (Peberdy, 1979) นอกจาก 3 องค์ประกอบที่กล่าวมาแล้ว ความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่และเจริญแบ่งเซลล์ของโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ก็เป็นอีกคุณสมบัติที่จะต้องคำนึงถึง พบว่า โปรโตพลาสต์ของยีสต์จะสามารถสร้างผนังเซลล์ที่สมบูรณ์และเจริญแบ่งเซลล์ได้ใน osmotically stabilizer medium ที่มีปริมาณ gelatin อยู่ 30 – 40% (W/V) หรือวุ้น 2 – 3% (W/V) หรือ polyethylene glycol 35% (W/V) (Svoboda and Piedra, 1983) แม้ว่าจะมีโปรโตพลาสต์ของยีสต์บางสายพันธุ์ สามารถสร้างผนังเซลล์ได้ในอาหารเหลวก็ตาม

osmotolerant yeast เป็นยีสต์ที่สามารถทนต่อแรงดันออสเมติกสูงได้ และสามารถเจริญได้ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูง เช่น *Saccharomyces rouxii* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการหมักซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว เป็นต้น เนื่องจากการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ osmotolerant yeast นั้น มีการศึกษากันน้อยมาก ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาวิจัยถึงเทคนิคต่าง ๆ ที่เหมาะสม ในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ osmotolerant yeast สายพันธุ์พื้นบ้านที่มีอยู่ เพื่อที่จะได้นำโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ ไปใช้ในการศึกษาด้านต่าง ๆ อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

osmotolerant yeast จาก stock culture ของหน่วยจุลชีววิทยาประยุกต์ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ AM-06 และ AM-35 ซึ่งเจริญได้ในที่ซึ่งมีเกลือ 5 และ 15% ตามลำดับ

2. การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อยีสต์

นำเชื้อ AM-06 และ AM-35 ซึ่งเจริญบน YPD agar slant (1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% dextrose และ 2% agar) 1 loop ใส่ลงในอาหาร YPD broth ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที 30 °ซ. นาน 15 – 18 ชม. แล้วนำมาเพาะเชื้อในอาหาร YPD broth ปริมาตร 100 มล. ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มล. โดยปรับให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีค่า Optical density (O.D.) เท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 660 nm. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 30 °ซ. แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 3 ชม. เป็นเวลา 48 ชม. เพื่อหาอัตราการเจริญ โดยการวัดค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 660 nm.

3. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ osmotic stabilizer ที่เหมาะสมในการรักษาสภาพโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้

นำเชื้อ AM-06 และ AM-35 มาเลี้ยงใน YPD broth ที่ 30 °ซ. ให้มีช่วงการเจริญอยู่ใน log phase จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง เติมสารละลาย lytic enzyme mixture ซึ่งประกอบด้วย 1) osmotic stabilizer ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ KCl, sorbitol และ mannitol ความเข้มข้น 1.5 - 5.0 M ปริมาตร 4 มล. (เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6 และ 2.0 M) 2) 0.1 M 2-mercaptoethanol 1 มล. 3) 2/15 M phosphate buffer (pH 7.5) 4 มล. และ 4) 10 มก./มล. Zymolyase-5000 ใน phosphate buffer (pH 7.5) 1 มล. ทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane filter (pore size = 0.45 μ) บ่มไว้ที่ 30 °ซ. นาน 3 ชม. เก็บโปรโตพลาสต์ที่ได้โดยปั่นให้ตกตะกอนที่ 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างโปรโตพลาสต์ 2 ครั้ง และ resuspend โปรโตพลาสต์ด้วย osmotic stabilizer ชนิดและความเข้มข้นที่ใช้ใน enzyme mixture ปิเปตดูด suspension ของโปรโตพลาสต์ 0.1 มล. หยดลงบน osmotically stabilized YPD medium (YPD agar ที่มี osmotic stabilizer) แล้วเททับด้วย osmotically stabilized YPD medium (วุ้น 3%) เขย่าเบา ๆ ให้โปรโตพลาสต์กระจายไปทั่วผิวหน้าอาหารอีกส่วนหนึ่งหยด suspension 0.1 มล. ลงบน YPD agar และเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้า ทำอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. นาน 2 วัน ทำการนับโคโลนีที่ปรากฏบนอาหารแล้วเปรียบเทียบผลการเกิดโปรโตพลาสต์ เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของ osmotic stabilizer ที่เหมาะสมโดยคำนวณจากสมการดังต่อไปนี้

$$P = \frac{A - B}{A} \times 100$$

P = เปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์

A = จำนวนโคโลนีบน osmotically stabilized YPD medium

B = จำนวนโคโลนีบน YPD medium

4. การศึกษา physiological stage ที่เหมาะสมของเชื้อที่จะนำมาใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

นำเชื้อ AM-06 และ AM-35 มาเลี้ยงใน YPD broth ที่ 30 °ซ. ให้มีช่วงการเจริญอยู่ใน log phase, late log phase และ stationary phase มาย่อยสลายผนังเซลล์ตามวิธีในข้อ 3 โดยใช้ osmotic stabilizer ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมตามข้อมูลจากข้อ 3 และเปรียบเทียบผลการเกิดโปรโตพลาสต์เพื่อหาช่วงอายุการเจริญที่เหมาะสม

5. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ lytic enzyme ในการเตรียมโปร–โตพลาสต์

นำเชื้อ AM-06 และ AM-35 มาเลี้ยงใน YPD broth ที่ 30 °ซ. ให้มีช่วงการเจริญเหมาะสมตามข้อมูลจากข้อ 4 มาย่อยสลายผนังเซลล์ตามวิธีในข้อ 3 โดยใช้ lytic enzyme mixture ซึ่งประกอบด้วย 1) osmotic stabilizer ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมตามข้อมูลจากข้อ 3 4 มล. 2) 0.1 M 2-mercaptoethanol 1 มล. 3) 2/15 M phosphate buffer (pH 7.5) 4 มล. และ 4) lytic enzyme ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ zymolyase-5000 10, 20 และ 30 มก./มล. และ Lyticase 2, 4 และ 6 มก./มล. ใน phosphate buffer (pH 7.5) 1 มล. และเปรียบเทียบผลการเกิดโปรโตพลาสต์เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ lytic enzyme

ผลและวิจารณ์

1. อัตราการเจริญของเชื้อ AM-06 และ AM-35

เมื่อเลี้ยงเชื้อ AM-06 และ AM-35 ในอาหารเหลว YPD บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ. จะเห็นได้ว่า เชื้อ AM-06 มีอัตราการเจริญที่รวดเร็วและสูงกว่า AM-35 (Figure 1) เนื่องจากเชื้อ AM-35 จะมีช่วง log phase เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมประมาณ 6 ชม. แต่อย่างไรก็ดีเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีการเจริญสูงสุดภายใน 24 ชม. เช่นเดียวกัน

2. ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ osmotic stabilizer ที่เหมาะสมในการรักษาสภาพของโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้

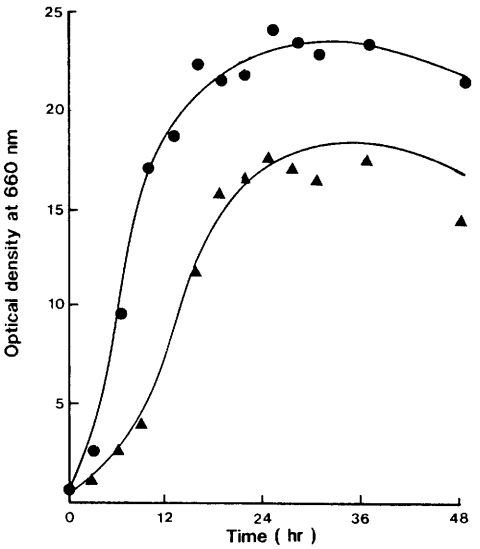

Figure 1 Growth curves of osmotolerant yeast strain AM-06 (▲) and AM-35 (●) cultivated in YPD broth with shaking at 200 rpm at 30°C.

ทำการย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อ AM-06 และ AM-35 ด้วย lytic enzyme mixture ที่มี osmotic stabilizer ต่าง ๆ กันคือ KCl 0.6-2.0 M, sorbitol 0.6-2.0 M และ mannitol 0.6-1.0 M (เนื่องจาก mannitol ที่ความเข้มข้นสูง ไม่สามารถละลายน้ำได้ดีที่

อุณหภูมิห้อง) พบว่า osmotic stabilizer ที่เหมาะสมในการรักษาสภาพของโปรโตพลาสต์ของ AM-06 คือ KCl 0.6-0.8 M (Figure 2) และ mannitol 0.6-0.8 M (Figure 4) ส่วน sorbitol นั้นไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็น osmotic stabilizer ของโปรโตพลาสต์ของ AM-06 เนื่องจากไม่สามารถรักษาโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นให้คงสภาพอยู่ได้ (% การเกิดโปรโตพลาสต์ = 0) ดังแสดงใน Figure 3 ส่วน osmotic stabilizer ที่เหมาะสมในการรักษาสภาพของโปรโตพลาสต์ของเชื้อ AM-35 คือ KCl, sorbitol และ mannitol ความเข้มข้น 0.8 M ขึ้นไป และจากกราฟที่แสดงไว้ใน Figure 2, 3 และ 4 พบว่าเชื้อ AM-06 มีแนวโน้มที่จะต้องการ osmotic stabilizer ความเข้มข้นต่ำกว่า AM-35 ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อ AM-06 สามารถเจริญได้ในที่มีเกลือ (5%) ต่ำกว่าเชื้อ AM-35 (ประมาณ 15%) ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Arnold and Garrison (1979) ซึ่งพบว่า *Saccharomyces rouxii* ซึ่งเป็น osmophilic yeast จะเกิดโปรโตพลาสต์ได้ดีเมื่อย่อยสลายผนังเซลล์ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่มี KCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 M ขึ้นไป และจะมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ความเข้มข้น 2.0 M ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ KCl 0.6 M สำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ AM-06 และ KCl 1.0 M สำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ AM-35 เนื่องจาก KCl มีราคาถูกและหาได้ง่ายกว่า sorbitol และ mannitol นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการละลายสูงอีกด้วย

3. ผลการศึกษา physiological stage ที่เหมาะสมของเชื้อที่จะนำมาใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

เมื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อ AM-06 อายุ 9, 15 และ 24 ชม. และเชื้อ AM-35 อายุ 12, 18 และ 24 ชม. ซึ่งเป็นเชื้อที่เจริญอยู่ในช่วง log phase, late log phase และ stationary phase ตามลำดับ ด้วย lytic enzyme mixture ที่ KCl 0.6 M สำหรับ AM-06 และ KCl 1.0 M สำหรับ AM-35 ผลปรากฏว่า

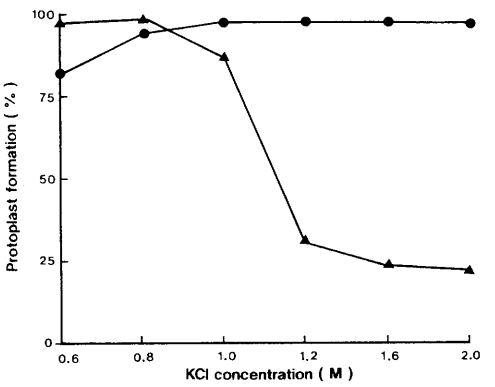

Figure 2 Effect of KCl concentration on protoplast formation of strain AM-06 (▲) and AM-35 (●).

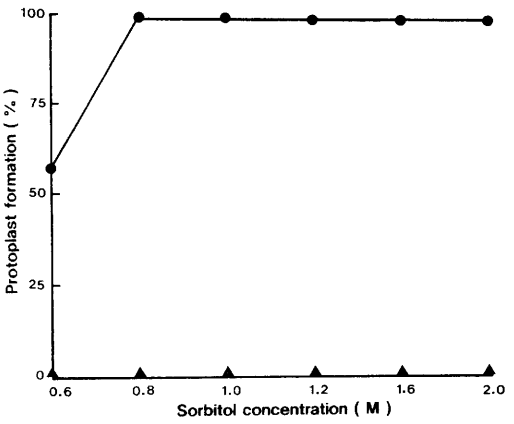

Figure 3 Effect of sorbitol concentration on protoplast formation of strain AM-06 (▲) and AM-35 (●).

ช่วงการเจริญที่เหมาะสมของเชื้อ AM-06 คือช่วง log phase และ late log phase (เชื้ออายุประมาณ 9 – 15 ชม.) ส่วนช่วง stationary phase ไม่เหมาะสมที่จะนำมาทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ (Figure 5) ส่วนเชื้อ AM-35 สามารถเกิดโปรโตพลาสต์ได้ดีในทุกช่วงอายุการเจริญตั้งแต่ log phase-stationary phase (เชื้ออายุประมาณ 12 – 24 ชม.) โดยทั่วไปเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนไปเป็นโปรโตพลาสต์ได้ดีในช่วง log phase และจะเปลี่ยนเป็นโรคโปรโตพลาสต์ได้ยากขึ้นเป็นลำดับเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น (Peberdy, 1979) ทั้งนี้เป็นเพราะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ของยีสต์ในช่วง late log phase (Deutch and Parry, 1974) และเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานจึงควรเลือกใช้เชื้อ AM-06 อายุประมาณ 12 ชม. และเชื้อ AM-35 อายุประมาณ 15 ชม. ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

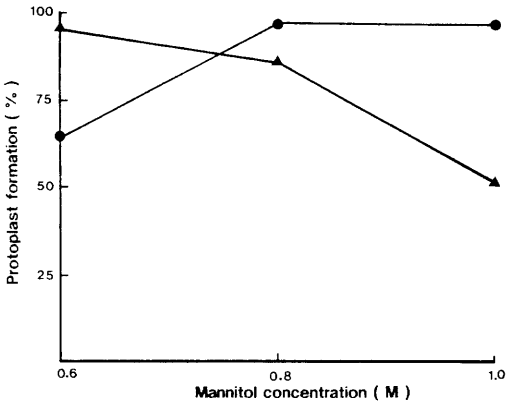

Figure 4 Effect of mannitol concentration on protoplast formation of strain AM-06 (▲) and AM-35 (●).

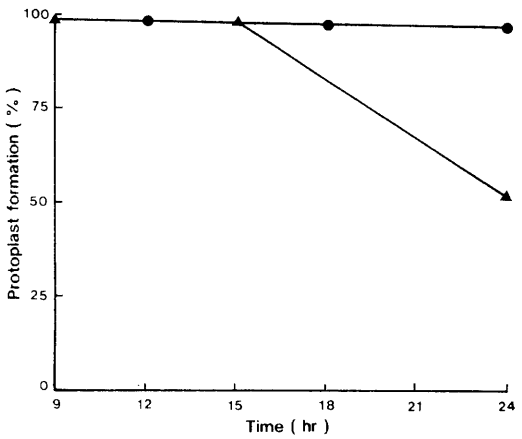

Figure 5 Effect of physiological stage on protoplast formation of strain AM-06 (▲) and AM-35 (●).

4. ผลการศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของ lytic enzyme ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

เมื่อนำเชื้อ AM-06 อายุ 12 ชม. และ AM-35 อายุ 15 ชม. มาย่อยสลายผนังเซลล์ด้วย lytic enzyme mixture ซึ่งประกอบด้วย lytic enzyme ชนิดและความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ Zymolyase-5000 ความเข้มข้น 10, 20 และ 30 มก./มล. และ lyticase ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มก./มล. พบว่าเอนไซม์ Zymolyase-5000 ความเข้มข้น 10–30 มก./มล. เหมาะสมที่จะนำไปย่อยสลายผนังเซลล์ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ (Figure 6 A) ส่วนเอนไซม์ lyticase มีแนวโน้มว่าที่ความเข้มข้น 4 มก./มล. (Figure 6 B) น่าจะทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ดี หากมีการปรับส่วนผสมใน enzyme mixture ให้เหมาะสมกว่านี้ ส่วน lyticase ความเข้มข้น 6 มก./มล. นั้นเป็นความเข้มข้นที่สูงเกินไปเพราะทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโปรโตพลาสต์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดซึ่งถ้าใช้เอนไซม์ดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่ำกว่านี้หรือปรับเวลาการบ่มของการย่อยสลายผนังเซลล์ให้น้อยลง ก็น่าจะทำให้เกิดโปรโตพลาสต์ได้ดีเช่นเดียวกัน

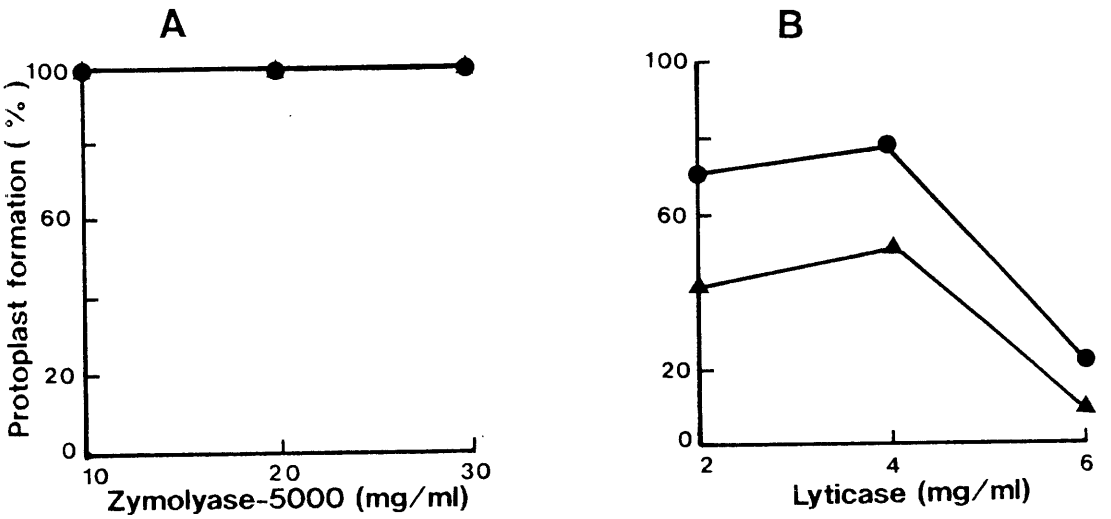

Figure 6 Effect of lytic enzyme concentration on protoplast formation of strain AM-06 (▲) and AM-35 (●) A, Zymolyase-5000 ; B, Lyticase.

สรุป

สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรโตพลาสต์ของ osmotolerant yeast สายพันธุ์ AM-06 และ AM-35 มีข้อแตกต่างกันดังนี้คือ สายพันธุ์ AM-06 ช่วงอายุ 9 – 15 ชม. ย่อยสลายผนังเซลล์ใน lytic enzyme mixture ประกอบด้วย 1.5 M KCl 4 มล. 0.1 M 2-mercaptoethanol 1 มล. 2/15 M phosphate buffer (pH 7.5) 4 มล. และ 10 มก./มล. Zymolyase-5000 ใน phosphate buffer (pH 7.5) 1 มล. และใช้ 0.6 M KCl เป็น osmotic stabilizer เพื่อรักษาสภาพของโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ ส่วนสายพันธุ์ AM-35 ใช้เชื้อช่วงอายุ 15 – 18 ชม. ในการย่อยสลายผนังเซลล์ด้วย enzyme mixture ที่ประกอบด้วย 2.5 M KCl 4 มล. 0.1 M 2-mercaptoethanol 1 มล. 2/15 M phosphate buffer (pH 7.5) 4 มล. และ 10 มก./มล. Zymolyase-5000 ใน phosphate buffer (pH 7.5) 1 มล. และใช้ 1.0 M KCl เป็น osmotic stabilizer เพื่อรักษาสภาพของโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้

เอกสารอ้างอิง

Arnold, W.N. and R.G. Garrison. 1979. Isolation and Characterization of protoplasts from *Saccharomyces rouxii.* J. Bact. 137 : 1386 - 1394.

Deutch, C.E. and J.M. Parry. 1974. Sphaeroplast formation in yeast during the transition from exponential phase to stationary phase J. Gen. Microbiol. 80 : 259 - 268.

Eddy, A.A. and D.H. Williamson. 1957. A method of isolating protoplasts from yeast. Nature 179 : 1252 - 1253.

Johannsen, E., J. Halland and A. Opperman. 1984. Protoplast fusion within the genus *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt. Can. J. Microbiol. 30 : 540 - 552.

Kuo, S.C. and S. Yamamoto. 1975. Preparation and growth of yeast protoplasts. Method in Cell Biology II : 169 - 183.

Peberdy, J.F. 1979. Fungal protoplasts : Isola tion, reversion and fusion. Ann. Rev. Microbiol. 32 : 21 - 39.

Pina, A., I.L. Calderon and I. Benitrz. 1986. Intergeneric hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces fermentati* obtained by protoplast fusion. App. Env. Microbiol. 51 : 995 - 1003.

Potter, A.A., A. Nasim, R.S. Zitomer and C.P. Hollenberg. 1985. Gene cloning in *Saccharomyces cerevisiae*. pp. 127 - 146. *In* J.R. Dillon, A. Nasim and E.R. Nestman (eds.), Recombinant DNA methodology. John Wiley & Sons, New York.

Stewart, G.G. and I Russel. 1979. Current use of the " new " genetics in research and develoрment of brewer's yeast strains. European Brewery Convention, Proceedings of the 17th Congress, West Berlin 475 - 490.

Svobods, A. and D. Piedra. 1983. Reversion of yeast protoplasts in media containing polyethylene glycol. J. Gen Microbiol. 129 : 3371 - 3377.