บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์ไลเพส

เอนไซม์ไลเพส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) และยังมีชื่อเรียกอื่นอีก เช่น เอซิลกลีเซอรอล ไฮโดรเลส (acylglycerol hydrolase) ไตรเอซิลกลีเซอรอล ไฮโดรเลส (Triacylglycerol hydrolase) นอกจากนี้คณะกรรมการเอนไซม์ (Enzyme Comission; EC) ได้กำหนดการตั้งชื่อเอนไซม์ (nomenclature) โดยได้จัดแบ่งเอนไซม์ออกเป็นพวกต่าง ๆ (classification) ตามชนิดปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเร่ง โดยกำหนดเป็นรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) รหัสเอนไซม์นี้ประกอบด้วยตัวเลขสี่ชุด แต่ละชุดจะแยกออกจากกันโดยจุด ตัวเลขชุดแรกจะบ่งถึงพวก (class) ที่เอนไซม์นั้นถูกจัดไว้ ซึ่งมีหกพวก ส่วนตัวเลขชุดที่สองและชุดที่สามของรหัสเอนไซม์ จะบอกถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง สำหรับตัวเลขชุดที่สี่จะช่วยแยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคล้ายกันออกจากกัน ซึ่งเอนไซม์ไลเพสมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ที่บ่งบอกปฏิกิริยาดังนี้

E.C.3.-.-. - Hydrolases.

E.C.3.1.-. - Acting on ester bonds.

E.C.3.1.1. - Carboxylic ester hydrolases.

E.C.3.1.1.3 Triacylglycerol lipase.

ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเพส

ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) (Brockerhoff และ Jensen, 1974) ซึ่งจะได้กรดไขมัน (free fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) เป็นผลิตภัณฑ์ และยังพบว่าไดกลีเซอไรด์ (diglycerides) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglycerides) อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ (Macrae, 1983) ไลเพสจะทำการย่อยสารตั้งต้นได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในรูปอิมัลชัน (oil-water interface) (Cihangir และ Sarikaya, 2004) เนื่องจากสารตั้งต้นอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble water) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial rate) อาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ในพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสารตั้งต้น

นอกจากไลเพสจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ ยังมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาอื่น ๆ ได้อีกหลายปฏิกิริยาดังรูปที่ 2 เช่น เมื่อในปฏิกิริยามีสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ไลเพสสามารถทำให้เกิดการย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลสิสได้ ซึ่งก็เป็นการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ จะได้เอสเทอร์และน้ำเป็นผลิตภัณฑ์ หรือเร่งปฏิกิริยาที่มีการโยกย้ายหมู่เอซิล (acyl groups) สารจำพวกแอลกอฮอล์ (alcohols) เอสเทอร์ (ester) ไกลโคไซด์ (glycosides) และเอมีน (amines) เป็นต้น (Schmidt-Dannert และคณะ, 1994; Gupta และคณะ, 2004).

<u>ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส</u>

Ester hydrolysis:

$R_1–COO–R_2 + H_2O \rightarrow R_1–OH + R_2–COOH$

$R_1–COO–R_2 + H_2O_2 \rightarrow R_1–OH + (Peroxy)R_2–COOH$

Ester synthesis:

$R_1–OH + R_2–COOH \rightarrow R_1–COO–R_2 + H_2O$

Intramolecular esterification:

$HO–R–COOH \rightarrow R–COO–R$ (Lactones)

Synthesis of estolides and other polymers:

$R_1–COOH + HO–R_2–COOH \rightarrow R_1–COO–R_2–COOH$

Interesterification:

$R_1–COO–R_2 + R_3–COO–R_4 \rightarrow R_1–COO–R_4 + R_3–COO–R_2$

Transesterification by acidolysis:

$R_1–COO–R_2 + R_3–COOH \rightarrow R_1–COO–R_3 + R_2–COOH$

Transesterification by alcoholysis:

$R_1–COO–R_2 + R_3–OH \rightarrow R_1–COO–R_3 + R_2–OH$

Transesterification by aminolysis:

$R_1–COO–R_2 + R_3–NH_2 \rightarrow R_1–CONH–R_3 + R_2–OH$

รูปที่ 2 ปฏิกิริยาที่สามารถเร่งได้โดยไลเพส

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ก็เป็นปฏิกิริยาที่มีการโยกย้ายหมู่เอซิลระหว่างสาร ปฏิกิริยานี้เป็นการสังเคราะห์เอสเทอร์ในระบบที่มีน้ำน้อย (Shimada และคณะ, 1993) หรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันที่มีแอลกอฮอล์และน้ำมันจากพืชเป็นสารตั้งต้น (substrate) และเร่งด้วยเอนไซม์ไลเพส เป็นปฏิกิริยาที่น่าสนใจในการนำมาไปทำการสังเคราะห์เอสเทอร์ หรือการผลิตไบโอดีเซล (biodiesel)

ความจำเพาะของไลเพส

Macrae (1983) จำแนกไลเพสโดยแบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ได้เป็น 3 กลุ่ม ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่หนึ่ง คือ ไลเพสที่มีความจำเพาะกับตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3-specific lipase) ซึ่งไฮโดรไลส์ (hydrolyze) ไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันอิสระและ 1,2- หรือ 2,3-ไดกลีเซอไรด์ และได้ 2-โมโนกลีเซอไรด์ แต่เนื่องจากกลีเซอไรด์ที่ได้นี้มักไม่เสถียร ถ้าให้เวลาในการย่อยนานขึ้นก็จะเกิดการเคลื่อนย้ายหมู่เอซิลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์และ 1- หรือ 3-โมโนกลีเซอไรด์ แต่ถ้าให้ปฏิกิริยาการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์ก็จะได้กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ตัวอย่างของแหล่งไลเพสในกลุ่มนี้ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus* และไลเพสจากรำข้าว

กลุ่มที่สอง คือ ไลเพสที่ไม่มีความจำเพาะต่อทั้งตำแหน่งและชนิดของกรดไขมันในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (Non-specific lipase) สามารถที่จะไฮโดรไลส์ไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นกรดไขมันอินสระและกลีเซอรอลได้อย่างสมบูรณ์ แต่อาจพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของไลเพสในกลุ่มนี้ เช่น ไลเพสจาก *Candida cylindracea*, *Corrynebacterium acnes*, *Staphyococcus aureus* และไลเพสจากตับอ่อนสุกร

กลุ่มที่สาม คือ ไลเพสที่มีความจำเพาะกับชนิดของกรดไขมัน (fatty acid-specific lipase) ซึ่งไลเพสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มักไม่แสดงคุณสมบัตินี้ แต่มีจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Geotrichum candidum* ที่ผลิตไลเพสที่ไฮโดรไลส์กลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันสายโมเลกุลยาวซึ่งประกอบด้วยพันธะคู่ที่เป็น cis-form ในตำแหน่งที่ 9 ได้ดี ส่วนกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) หรือชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่ไม่มีพันธะคู่ในตำแหน่งที่ 9 จะถูกไฮโดรไลส์ได้ไม่ค่อยดี

แหล่งของไลเพส

ไลเพสพบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ (Sztajer และคณะ, 1988) โดยในสัตว์จะพบได้ที่ตับอ่อน (pancreatic lipase) และในน้ำนม (milk lipase) พบในพืชจำพวกถั่ว ข้าวสาลี ฝ้าย และละหุ่ง ส่วนไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด และยังผลิตไลเพสในปริมาณที่สูงกว่า Eukaryotes ส่วนมากในทางการค้าจะใช้ไลเพสจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์ (Sharma Chisti และ Banerjee, 2001) โดยจุลินทรีย์จำนวนมากสามารถผลิตได้ทั้งจากรา ยีสต์ และ แบคทีเรีย แต่ละชนิดให้ไลเพสที่มีคุณสมบัติต่างกันอย่างไรก็ตามไลเพสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเพสจากพืชหรือสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่า

พืชและสัตว์ มีคุณสมบัติที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด ด่าง มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด (Cardenas และคณะ, 2000) ง่ายในการผลิต การเก็บเกี่ยว และการทำให้บริสุทธิ์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชสัตว์ ดังนั้นไลเพสที่ได้มาจากจุลินทรีย์จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท อย่างไรก็ตามเนื่องจากไลเพสที่ได้จากแต่ละแหล่งมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังนั้นการนำไลเพสไปใช้จึงต้องเลือกไลเพสให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ จุลินทรีย์จำพวกราที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเพสได้จะได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก และถูกนำมาใช้ประโยชน์ในปัจจุบัน ซึ่งได้แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์จำพวกราที่สามารถผลิตไลเพสได้ ดังตารางที่ 1

การสร้างไลเพสของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเพสได้ จะมีทั้งที่สามารถผลิตไลเพสที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular lipases) และไลเพสที่ผลิตอยู่ภายในเซลล์ (intracellular lipases) กล่าวคือ จุรินทรีย์มีความสามารถผลิตเอนไซม์อยู่ภายในเซลล์ จะถูกตรึงนำมาใช้ในการตรึงแบบใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็นตัวเร่ง (immobilized whole cell biocatalyst) ซึ่งการตรึงแบบใช้เซลล์ทั้งเซลล์เป็นตัวเร่งจะเป็นวิธีที่ง่ายในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ปล่อยออกมานอกเซลล์ก็จะง่ายต่อการตรึงและแยกเอนไซม์ออกมาใช้ เอนไซม์ไลเพสที่นำมาใช้เพื่อผลิตไบโอดีเซลจะนิยมใช้ไลเพสจากจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ปล่อยออกมานอกเซลล์ และพบว่าราเส้นใย (filamentous fungi) จะเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าว ไลเพสจากราจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมในหลาย ๆ ด้านร่วมทั้งนำมาใช้เป็นเอนไซม์ตรึงรูปที่ใช้ในการผลิตไบดีเซล

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์จำพวกราที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเพสได้

สกุล	ชนิด	อ้างอิง
Acremonium	*A. strictum*	Okeke และ Okolo, 1990
Alternaria	*Alternaria brassicicola*	Berto และคณะ, 1997
Aspergillus	*A. awamori*	Satyanarayan และ Johri, 1981
	A. carneus	Helisto และ Korpela, 1998
	A. flavus	Long และคณะ, 1996, 1998
	A. fumigatus	Satyanarayan และ Johri, 1981
	A. japonicus	Satyanarayan และ Johri, 1981
	A. nidulans	Mayordomo และคณะ, 2000
	A. niger	Chen และคณะ, 1995
	A. oryzae	Ohnishi และคณะ, 1994
	A. repens	Kaminishi และคณะ, 1999
Ashbya	*Ashbya gossypii*	Stahmann และคณะ, 1997
Beauveria	*Beauveria bassiana*	Hegedus และ Khachtourians,1988
Eurotrium	*E. herbanorium*	Kaminishi และคณะ, 1999
Fusarium	*F.heterosporum*	Takahashi และคณะ, 1998
	F.oxysporum	Rapp,
Geotrichum	*G. candidum*	Sugihara และคณะ, 1991; Ghosh และคณะ, 1996
Humicola	*H. lanuginosa*	Ghosh และคณะ, 1996; Takahashi และคณะ, 1998; Plou และคณะ, 1998;

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สกุล	ชนิด	อ้างอิง
Mucor	*M. miehei*	Rantakyla และคณะ, 1996;
		Lacointe และคณะ, 1996;
		Plou และคณะ, 1998
	M. javanicus	Ishihara และคณะ, 1975
	M. circinelloides	Balca และคณะ, 1998
	M. hiemalis	Ghosh และคณะ, 1996
	M. racemosus	Ghosh และคณะ, 1996
Ophiostoma	*O. piliferum*	Brush และคณะ, 1999
Penicillium	*P. cyclopium*	Chahinian และคณะ, 2000
	P. citrinum	Sztajer และ Maliszewska, 1989
	P. roqueforti	Petrovic และคณะ, 1990
	P. fumiculosum	Hou, 1994
	Penicillium sp.	Helisto และ Korpela, 1998
	P. camambertii	Ghosh และคณะ, 1996
	P. wortmanii	Costa และ Peralta, 1999
Rhizomucor	*R. miehei*	Merek และ Bednasski, 1996;
		Weber และคณะ, 1999;
		Jaeger และ Reetz, 1998;
		Dellamora-Ortiz และคณะ, 1997
Rhizopus	*Rhizopus delemar*	Klein และคณะ, 1997;
		Espinosa และคณะ, 1990;
		Haas และคณะ, 1992;
		Lacointe, และคณะ, 1996
	Rhizopus oryzae	Salleh และคณะ, 1993;
		Coenen และคณะ, 1997;

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สกุล	ชนิด	อ้างอิง
		Beer และคณะ, 1998;
		Essamri และคณะ, 1998;
		Takahashi และคณะ, 1998;
		Hiol และคณะ, 2000
	Rhizopus arrhizus	Sztajer และ Maliszewska, 1989;
		Elibol และ Ozer, 2001
	Rhizopus nigricans	Ghosh และคณะ, 1996
	Rhizopus nodosus	Nakashima และคณะ, 1988
	Rhizopus microsporous	Ghosh และคณะ, 1996
	Rhizopus chinensis	Ghosh และคณะ, 1996
	Rhizopus japonicus	Nakashima และคณะ, 1988
	Rhizopus niveus	Kohno และคณะ, 1994, 1999

ที่มา : Sharma , Chisti และ Banerjee (2001)

การตรึงเอนไซม์

การตรึงเอนไซม์เป็นการทำโมเลกุลเอนไซม์ให้ถูกจับไว้ในขอบเขตจำกัดแต่ยังมีกัมมันตภาพการเร่งปฏิกิริยา (catalytic activity) เหมือนเดิม การตรึงรูปเอนไซม์นี้จะสามารถทำให้เอนไซม์ที่ถูกตรึงนำกลับคืนมาใช้ได้อีก และถูกนำไปใช้ในระบบต่อเนื่องได้ การตรึงเอนไซม์มีหลายวิธีซึ่งวิธีการและการเลือกชนิดของวัสดุค้ำจุนขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ แต่ละวิธีก็มีข้อดีข้อเสียต่างกันออกไป เช่น การตรึงแบบดูดซับทางกายภาพ (Physical adsorption) โดยการยึดเอนไซม์บนวัสดุค้ำจุนด้วยพันธะอย่างอ่อนบนวัสดุค้ำจุนที่เป็นของแข็ง (Bosley และ Pielow, 1997) วิธีนี้ไม่มีหรือมีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อการเปลี่ยนแปลงความคงรูปของเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง เป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อน แต่มีข้อเสีย คือเอนไซม์เกาะกับวัสดุตรึงไม่แน่น เพราะแรงเกาะน้อย ตัวค้ำจุนที่ใช้เป็นพวกสารอนินทรีย์ เช่น ทราย ซิลิกาเจล อลูมินัมออกไซด์ แคลเซียมคาร์บอเนต และแคลเซียมซัลเฟต (Minovska และคณะ, 2004) การตรึงเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (Walt และ Agayn, 1994) วิธีนี้เอนไซม์จะหลุดออกจากตัวค้ำจุนยาก เนื่องจากมีการยึดพันธะที่แข็งแรง แต่การเกิดพันธะโควาเลนต์จะกระทบกระเทือนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงรูปและบริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งมีผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และอาจจะเปลี่ยน

ความจำเพาะต่อสับเสตรท และการตรึงรูปเอนไซม์แบบกักเอนไซม์ไว้ในโครงร่าง 3 มิติของเจล เอนไซม์ที่ตรึงแล้วจะมีความเสถียร (Kennedy และ Melo, 1990) แต่สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้อาจส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จึงต้องเลือกสภาวะที่มีผลกระทบน้อยที่สุด วัสดุค้ำจุนก็มีมากมายหลายชนิดให้เลือกใช้ ก็จำเป็นที่ต้องศึกษาถึงคุณสมบัติของวัสดุค้ำจุนเพื่อจะได้เลือกใช้ได้อย่างเหมาะสม แต่กว่าจะได้วัสดุค้ำจุนที่เหมาะสมก็ต้องมีการทดลองตรึงเอนไซม์บนวัสดุค้ำจุนชนิดชนิดนั้น ๆ ว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงใด ตัวอย่างมีความน่าสนใจที่จะถูกเลือกนำมาใช้เป็นวัสดุค้ำจุน ได้แก่ โดโลไมต์ (dolomite) ซึ่งเป็นแร่หินตะกอนชนิดหนึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกลือเชิงคู่ คือ แคลเซียมคาร์บอเนต และแมกนีเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3.MgCO_3$) เข้าใจกันว่าแร่นี้เดิมคือแคลไซต์ ($CaCO_3$) แต่ต่อมาแมกนีเซียมเข้าแทนที่แคลเซียมบางส่วนในแร่ ในอุตสาหกรรมทั่ว ๆ ไปโดโลไมต์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมก่อ สร้างนำหินคาร์บอเนตมาใช้ทำเป็นหินย่อย ตลอดจนนำมาใช้ในด้านการเกษตร เช่นใช้ในการปรับปรุงคุณภาพดิน (soil conditioner) สมบัติของแร่โดโลไมต์ ที่มีผิวหน้าโค้ง สีขาวหรือชมพู ธาตุเจือปนที่พบอยู่เสมอมี เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โคบอล(Co)สังกะสี (Zn) และตะกั่ว (Pb) เนื่องโดโลไมต์มีราคาไม่สูงและหาซื้อได้ในท้องถิ่นจึงอาจเป็นวัสดุที่น่าสนใจที่จะนำมาเป็นวัสดุค้ำจุนในการตรึงรูปเอนไซม์ วัสดุค้ำจุนอีกชนิดที่น่าสนใจ คือ ไดอะตอมมาเชียส เอิร์ธ (Diatomaceous earth) ดินเบาหรือดินไดอะตอม เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า kieselguhr เป็นดิน ที่เกิดจาก ซากพืชเซลล์เดียว ที่มีโครงสร้าง เป็นรูพรุนขนาดเล็ก จำนวนมาก ซึ่งมีลักษณะเป็นผงละเอียดและเบา ซึ่งมีความพรุน 60.85เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับการเผาที่อุณหภูมิสูง และ เติมสารเร่งปฏิกิริยา บางชนิด เช่น แคลเซียม คลอไรด์ (Calcium Chloride)ซึ่งมีคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำมาเป็นวัสดุค้ำจุนยิ่งนั้นเพราะมีความพรุนสูงนั้นเอง

ประโยชน์และความสำคัญของไลเพสในด้านอุตสาหกรรม

มีการนำไลเพสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภทเช่น อาหาร ยา และน้ำยาซักล้าง เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง การผลิต aliphatic acid การผลิตหมากฝรั่ง และยาสีฟัน รวมทั้งการกำจัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน (Macrae, 1983)

<u>อุตสาหกรรมอาหาร</u>

ไลเพสเป็นเอนไซม์ที่ถูกนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมักเพราะไลเพสจะเป็นตัวผลิตกลิ่นรส (flavor) ให้อาหารชนิดนั้น ๆ มีกลิ่นรสเฉพาะตัวและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รูปแบบการใช้ไลเพสในอุตสาหกรรมอาหารหมักนั้น มีทั้งวางใจเติมไลเพสลงไปเพื่อให้ได้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้แก่ โยเกิร์ต (yoghurt) คุกกี้ (cookie) บลู ชีส (blue cheese) อิตาเลียน ชีส (Italian cheese) เค้ก

(cake) และ ช็อกโกแล็ต (chocolate) เป็นต้น (Arnold และคณะ, 1975) หรืออาจใช้ไลเพสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเหล่านั้นเป็นตัวให้กลิ่นรสก็ได้ เช่น lactic acid bacteria จะผลิตไลเพสทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะในอาหารเนื้อหมัก พวกไส้กรอกอิตาเลียนและในผักดอง พวกแตงกวาดอง และกระหล่ำปลีดอง ไลเพสยังสามารถใช้ในการปรับปรุงน้ำมันและไขมันให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด เช่น เนยโก้โก้ (cocoa butter) และเนยเทียม (margarine) นอกจากนี้ยังช่วยในการผลิตน้ำมันชนิดที่มีกรดไขมันที่จำเป็นสูงซึ่งจะทำให้น้ำมันมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ การใช้ประโยชน์และคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น

นอกจากนี้ยังมีการนำไลเพสเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันด้วย เพราะกรดไขมันที่ได้จากกระบวนการผลิตทางเคมีต้องใช้ความร้อนและความดันสูง ทำให้มีข้อเสีย คือ ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงที่สามารถทนความร้อนสูงได้ รวมทั้งวิธีนี้สิ้นเปลืองพลังงาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีคล้ำ และมีการสลายตัวของสารที่ไม่ต้องการด้วยซึ่งถ้าใช้ไลเพสทำงานแทนแล้ว ข้อเสียต่าง ๆ เหล่านี้จะหมดไป

<u>อุตสาหกรรมอาหารสัตว์</u>

ไลเพสถูกนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์ เพราะไลเพสช่วยการย่อยสลายไขมันให้เกิดเป็นกรดไขมันและจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ ปกติสัตว์จะสามารถสร้างไลเพสได้เอง แต่การเติมไลเพสในอาหารจำเป็นอย่างมากต่อลูกสัตว์ ซึ่งระดับ pH ในทางเดินอาหาร ยังไม่ต่ำพอที่จะทำให้ไขมันแตกตัวได้ดี อีกทั้งน้ำดีก็ยังถูกสร้างและหลั่งออกมาได้ไม่มากนัก การเติมเอนไซม์นี้นับเป็นการช่วยเสริมประสิทธิภาพการย่อยสลายอาหารของสัตว์

<u>อุตสาหกรรมการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ</u>

เชื้อเพลิงทางเลือกใหม่ ๆ สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลกำลังมีความสำคัญเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปัจจุบัน เนื่องจากการลดลงของปริมาณน้ำมันปิโตรเลียมในธรรมชาติและผลกระทบจากแก๊สที่เกิดจากการกลั่นน้ำมันปิโตรเลียมที่มีต่อสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าไตรกลีเซอไรด์สามารถนำมาใช้เป็นพลังงานให้กับเครื่องยนต์ดีเซลได้ แต่การนำไตรกลีเซอไรด์ที่อยู่ในน้ำมันสกัดจากพืชหรือสัตว์ไปใช้กับเครื่องยนต์โดยตรงยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ พบปัญหาหลายอย่างในการนำน้ำมันดังกล่าวมาใช้ ได้แก่ มีความหนืดสูง เนื่องจากมีกรดไขมันอิสระเป็นองค์ประกอบสูงซึ่งทำให้เกิดการออกซิเดชัน (oxidation) และโพลิเมอไรเซชัน (polymerization) เมื่อเก็บน้ำมันไว้ หรือระหว่างการเผาไหม้เป็นผลให้เกิดสารประกอบพวกกัม (gum) มีลักษณะเหนียวเคลือบติดเครื่องยนต์ ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการพัฒนาน้ำมันที่สกัดจากพืชหรือสัตว์โดยวิธีต่างๆ เพื่อลดความหนืดและปริมาณของสารพวก polyunsaturated ซึ่งเป็นสารตั้งต้นใน

กระบวนการโพลิเมอไรเซชัน กระบวนการหลัก ๆ ที่ใช้ในการพัฒนาน้ำมันสกัดจากพืชและสัตว์ให้มีความเหมาะสมกับเครื่องยนต์มีอยู่หลายวิธี (Ma, และ Hanna,1999) เช่น

ไพโรไลซีส (pyrolysis) เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารโดยใช้พลังงานความร้อนในสภาวะที่มีอากาศหรือแก๊สไนโตรเจน (Ma, และ Hanna,1999)

ไมโครอิมัลซิฟิเคชัน (micro-emulsification) ซึ่งเป็นการนำของเหลวสองชนิดที่ไม่สามารถรวมตัวกันได้ตามธรรมชาติมาทำให้รวมตัวกันได้โดยอาศัยแรงกลและสารลดแรงตึงผิวในการผลิตไบโอดีเซลจะนำน้ำมันที่สกัดจากพืชหรือสัตว์มาผสมกับตัวทำละลายบางชนิด เช่น เมทานอล (methanol) เอทานอล (ethanol) และ 1-บิวทานอล (1-butanol) การผสมดังกล่าวช่วยทำให้ความหนืดของน้ำมันสกัดจากพืชหรือสัตว์ตามธรรมชาติลดลง (Ma, และ Hanna,1999)

ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยไลเพสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เกิดเป็น กรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า แอลกอฮอไลซีส (alcoholysis) เป็นการแทนที่แอลกอฮอล์ที่มีอยู่ในหมู่เอสเทอร์เดิมด้วยแอลกอฮอล์ตัวใหม่ แอลกอฮอล์ที่เหมาะสมนำมาใช้แทนที่ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล โพรพานอล (propanol) บิวทานอล และ เอมิลแอลกอฮอล์ (amyl alcohol) จากการทดลองพบว่า เมทานอลและเอทานอล เป็นแอลกอฮอล์ที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตไบโอดีเซล โดยเฉพาะเมทานอลซึ่งมีราคาถูก และมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่ดี โดยปฏิกิริยานี้ได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ไบโอดีเซลเป็นน้ำมันที่ได้จากพืช น้ำมัน ไขมันสัตว์ หรือน้ำมันที่ใช้แล้ว นำมาผ่านขบวนการที่ทำให้โมเลกุลเล็กลง ให้อยู่ในรูปของเอทิลเอสเทอร์ (ethyl esters) หรือ เมทิลเอสเทอร์ (methyl esters) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก สามารถใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลได้โดยตรง ไบโอดีเซลจะมีการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Li และคณะ, 2006) และในการใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพกับปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันมีข้อดีกว่าการใช้กรดหรือด่างซึ่งได้เปรียบเทียบดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 กล่าวคือ การใช้ไลเพสมีความจำเพาะมากกว่า ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อัลคิลเอสเทอร์ที่จำเพาะ และสามารถแยกผลิตภัณฑ์ร่วมที่เป็นกลีเซอรอล ออกได้ง่าย และบริสุทธิ์กว่าการใช้กรดหรือด่างเป็นตัวเร่ง (Kose และคณะ, 2001) และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้แม้ว่ามีปริมาณกรดไขมันอิสระสูง ดังนั้นจากข้อเสียต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วนี้ จึงได้มีการพิจารณานำเอาไลเพสมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยไลเพสจากทั้งที่ปล่อยออกมานอกเซลล์และที่อยู่ภายในเซลล์นั้น สามารถนำมาใช้ในปฏิกิริยานี้ได้ทั้งในระบบที่มีน้ำและไม่มีน้ำด้วย ซึ่งการใช้เอนไซม์นี้สามารถนำมาใช้ได้ เพื่อแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจากการใช้กรดหรือด่างเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ การที่ง่ายในการเก็บกลีเซอรอล โดยที่ไม่ต้องใช้กระบวนการที่ยุ่งยากใด ๆ เลย และกรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำมันหรือไขมันที่ใช้แล้ว ก็สามารถเปลี่ยนมาเป็น เมทิลเอสเทอร์ได้อย่างสมบูรณ์ด้วย แต่

อย่างไรก็ตามต้นทุนการผลิตไบโอดีเซลจากการใช้ไลเพสเป็นตัวเร่งนี้ยังสูงกว่าการใช้ด่างอยู่มาก จึงต้องมีการพัฒนาการผลิตไลเพสต่อไป

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบระหว่างวิธีการใช้ด่างเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและการใช้ไลเพสเร่งปฏิกิริยาในการผลิตไบโอดีเซล

	กระบวนการที่ใช้ด่างเป็นตัวเร่ง	**กระบวนการที่ใช้ไลเพสเร่ง**
อุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกิริยา	60-70	30-40
กรดไขมันอิสระที่อยู่ในวัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์สบู่	เมทิลเอสเทอร์
น้ำที่อยู่ในวัตถุดิบ	รบกวนปฏิกิริยา	ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา
ปริมาณของเมทิลเอสเทอร์	ปกติ	สูงกว่า
การเก็บกลีเซอรอล	ยาก	ง่าย
การทำให้เมทิลเอสเทอร์บริสุทธิ์	ล้างซ้ำ	ไม่มี
ราคาของตัวเร่งปฏิกิริยา	ถูก	ค่อนข้างแพง

ที่มา: Fukada และคณะ (2001)

การนำไลเพสมาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ริฟิเคชันยังไม่นิยมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากราคาของไลเพสค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยสามารถใช้ไลเพสตรึงรูปเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันให้เหมาะสมกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จะสามารถแก้ปัญหาราคาน้ำมันดีเซลที่สูงขึ้น โดยผลิตไบโอดีเซลมาใช้ทดแทนน้ำมันดีเซล และยังแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการใช้น้ำมันไบโอดีเซล จะเกิดคาร์บอนมอนนอกไซด์น้อยเนื่องจากการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่า ไอเสียน้อยกว่า เพราะปริมาณออกซิเจนในไบโอดีเซลจึงทำให้การสันดาปเกิดขึ้นได้สมบูรณ์กว่าน้ำมันดีเซล และไม่มีกำมะถัน จึงไม่มีปัญหาเรื่องของปริมาณของซัลเฟต นอกจากนี้ยังมีเขม่าคาร์บอนน้อย ทำให้ไม่เกิดการอุดตันของระบบไอเสีย และช่วยยืดอายุการทำงานของเครื่องยนต์ (Gerpen, 2005)

อุตสาหกรรมอื่น ๆ

อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องหนัง ก็นำไลเพสเข้าไปช่วยในการขจัดเศษไขมันที่ไม่ต้องการออกจากวัตถุดิบก่อนนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์หนังด้วย (Posorske, 1984)

นอกจากนี้ alkaline lipase ยังสามารถนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ 2 ทางสำคัญ คือ หนึ่งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก และสองเพื่อใช้แทน pancreatic lipase ในทางการแพทย์

ไลเพสถูกนำไปใช้เป็นเร่งในปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ได้มากมาย เช่น สังเคราะห์กรดไขมันและกลีเซอรอล สังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ สังเคราะห์ terpene alcohol สังเคราะห์ flavor ester สังเคราะห์เปปไทด์ (peptide) สังเคราะห์สารลดแรงตึงผิว (biosurfactant)

นอกจากไลเพสจะมีประโยชน์มากมายในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ แล้ว แต่ก็ทำให้เกิดโทษได้เช่นกัน คือ ในผลิตภัณฑ์ธัญชาติ จะทำให้เกิดสีน้ำตาลเข้มของเค้กผสมข้าวโอ๊ต และเกิดการแปรสีน้ำตาล (brown discoloration) ของรำข้าวสาลี ในผลิตภัณฑ์นม และ ผลิตภัณฑ์น้ำมัน ไลเพสจะทำให้เกิดกลิ่นหืน เป็นต้น

มิวเทชัน (Mutation)

มิวเทชัน เป็นการการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ทำให้โครงสร้างของสารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป และสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นถัดไป

ชนิดของมิวเทชัน

การเกิดมิวเทชันสามารถแบ่งได้ตามลักษณะของการเกิดมิวเทชันได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. มิวเทชันที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous mutation) หมายถึง มิวเทชันที่เกิดขึ้นได้เอง มิวเทชันแบบนี้เกิดจากการจับคู่เบสผิดในระหว่าง DNA replication แล้วไม่มีการแก้ไขซ่อมแซมความผิดพลาดนี้ให้ถูกต้องดีเอ็นเอสายที่สร้างขึ้นมาแบบผิด ๆ จะทำหน้าที่เป็นต้นแบบของดีเอ็นเอรุ่นถัดไป ทำให้เซลล์รุ่นต่อไปได้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่แตกต่างไปจากเดิม มิวเทชันแบบนี้มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมากในธรรมชาติ อาจเป็นผลมาจากรังสี สารเคมี หรืออุณหภูมิที่มีอยู่ตามธรรมชาติ มิวเทชันที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจะมีอัตราการเกิดที่ค่อนข้างต่ำคือน้อยกว่าหนึ่งในล้าน แต่มีอัตราการเกิดมิวเทชันที่ต่ำมาก เช่น *E. coli* มีอัตราการเกิดมิวเทชัน 2×10^{-6} ต่อยีน ในแมลงหวี่มีอัตราการเกิดมิวเทชัน 3×10^{-5} เป็นต้น

2. การชักนำให้เกิดมิวเทชัน (induced mutation) หมายถึงมิวเทชันที่เกิดจากการชักนำด้วยปัจจัยภายนอกอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ความผิดพลาดในการจำลองตัวของดีเอ็นเอเอง ทำให้เพิ่มอัตรามิวเทชันให้เกิดขึ้นมากกว่าที่จะปล่อยให้เป็นไปตามธรรมชาติ มิวเทชันที่เกิดจากการชักนำเกิดจาก

มิวทาเจน (mutagen) ชักนำให้สารพันธุกรรมเกิดมิวเทชันในอัตราที่สูงมากขึ้น มิวทาเจนเหล่านั้นได้แก่ รังสี ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภทได้แก่ รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) รังสีเหล่านี้มีพลังงานสูง มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ และอิเล็คตรอนที่หลุดออกมานี้จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงไปชนอะตอมอื่น ๆ จนพลังงานของอิเล็คตรอนลดลง จากการเกิดประจุบวกและลบทำให้ต้องเกิดปฏิกิริยาเคมีทำให้มีประจุเป็นกลาง เพื่อให้โครงสร้างของอะตอมคงที่ ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม และโครมาติด โดยบริเวณที่แตกหักนี้จะเกี่ยวข้องกับส่วนที่ต่อกันของน้ำตาล และหมู่ฟอสเฟตของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดมิวเทชันชนิดดิลิชัน (deletion) การขาดหายของส่วนใดส่วนหนึ่งของแท่งโครโมโซม ส่งผลให้ยีนบริเวณนั้นขาดหายไป และมิวเทชันชนิดอินเวอร์ชัน (inversion) การเปลี่ยนสลับชิ้นส่วนบนแท่งโครโมโซม ทำให้ลำดับของยีนบนแท่งโครโมโซมเปลี่ยนไป รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน เช่นรังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา นิวตรอน และรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) เป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำจะไม่ก่อให้เกิดไอออนตามทางที่รังสีเคลื่อนผ่าน แต่ก็มีผลในการชักนำให้เกิดมิวเทชันได้ดีและไม่ก่อให้เกิดการตายที่สูงโดยทำให้เกิดมิวเทชันชนิด การแทนที่เบส (base substitution) รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต ส่วนมิวทาเจนที่เป็นสารเคมี มีกลไกในการชักนำให้เกิดมิวเทชันแตกต่างกันไป มีมากมายหลายชนิด และมีผลเกิดมิวเทชันแตกต่างกันออกไป บางชนิดนอกจากเป็น มิวทาเจนแล้วยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย (carcinogen) ด้วย มิวทาเจนทางเคมีสามารถแบ่งได้เป็น 4 จำพวก ได้แก่ (1) สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่าง ๆ ในดีเอ็นเอ (base analogs) ซึ่งคล้ายจนสามารถหลอกเอนไซม์ DNA polymerase ให้เอนไซม์นำเข้าไปแทนที่ deoxyribonucleotide ปกติในระหว่างการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอได้ เมื่อ base analogs เข้าไปเป็นส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอแล้ว ในกระบวนการ DNA replication ครั้งต่อไป สายดีเอ็นเอที่มี base analogs อยู่จะทำให้เกิดมิวเทชันมากขึ้น เนื่องจาก base anologs ไม่ใช่เบสปกติจึงจับคู่เบสผิดไปจากเดิม ตัวอย่างของ base analogs คือ 5′ - bromouracil ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้าย thymine (2) สารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเบส เช่น nitrous acid เมื่อทำปฏิกิริยากับเบสแล้วทำให้เบสสูญเสียหมู่อะมิโนไป (deamination) ดังเช่น adenine ซึ่งจับคู่เบสกับ thymine เมื่อเกิด deamination เป็น hypoxanthine จะจับคู่เบสกับ cytosine แทน จึงทำให้เกิดการแทนที่เบสแบบ transition ได้ (3) Intercalating agent เช่น ethidium bromide และ (4) Alkylating agent จะทำหน้าที่เติมหมู่อัลคิล เช่น เมทิล หรือเอทิลให้กับเบสบางชนิดในดีเอ็นเอที่หมู่อะมิโน หรือหมู่คีโตของเบสทำให้มีโครงสร้างเปลี่ยนไป และทำให้เกิดการผิดพลาดในการจับคู่กัน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสได้ระหว่างที่มีการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอแบบทรานซิชัน (transition) เช่น ethylmethanesulphonate (EMS) *N*-methyl-*N*′-nitro-*N*-

nitrosoguanidine (NTG) mustard gas (di-(2-chloroethyl)sulfide) ซึ่งเป็นก๊าซอันตรายใช้ในการสงคราม

การซ่อมแซมดีเอ็นเอ

การซ่อมแซมดีเอ็นเอ เป็นกระบวนการที่เซลล์ใช้รักษาสภาพไว้ให้คงเดิมหลังจากเกิดการมิวเทชันขึ้น ซึ่งการซ่อมแซมนี้มีหลายประเภทขึ้นกับความผิดปกติที่เกิดขึ้น สามารถแบ่งการซ่อมแซมดีเอ็นเอเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ 4 ประเภทคือ

-โฟโตรีแอคติเวชัน (photoreactivation repair) เป็นการใช้แสงในช่วงคลื่นที่มองเห็น (visible light) สลายพันธะไพริมีดีนไดเมอร์ที่เกิดขึ้นในสาย ดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์โฟโตไลเอส (DNA photolyase)

-เอ็กซ์ซิชันรีแพร์ (excision repair) เป็นกระบวนการตัดพิวรีนไดเมอร์ที่เกิดขึ้นในสายดีเอ็นเอ ทิ้งแล้วนำเบสที่ถูกต้องมาเติม โดยอาศัยเอนไซม์หลายชนิดร่วมกันทำงาน

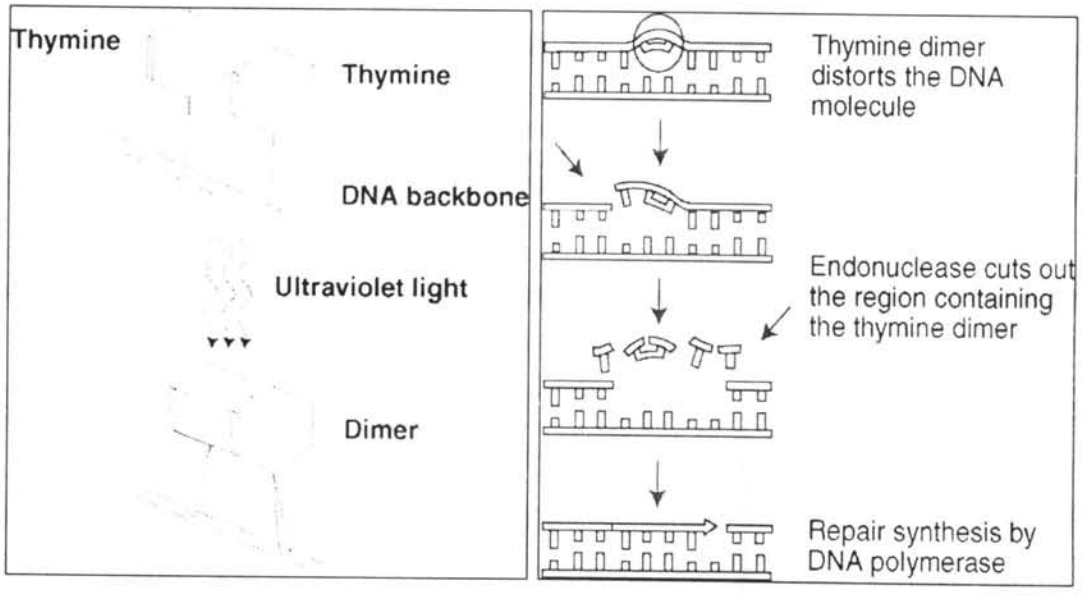
-มิสแมทช์รีแพร์ (mismatch repair) เป็นกระบวนการกำจัดเบสที่เข้าคู่ผิดในขณะเกิดการลอกแบบทิ้งไป แล้วนำเบสที่ถูกต้องมาเข้าคู่แทน

-รีคอมบิเนชันรีแพร์ (recombination repair) เป็นกระบวนการซ่อมแซม ดีเอ็นเอ ที่เข้าคู่ผิดภายหลังการลอกแบบ โดยอาศัย ดีเอ็นเอ ในโฮโมโลกัสโครโมโซมที่ถูกต้องเป็นแม่แบบ

รังสีอัลตราไวโอเลตกับมิวเทชัน

รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet: UV) เป็นมิวทาเจนทางกายภาพ (Physical mutagen) ที่นิยมใช้กันมากในการทำให้เกิดมิวเทชันกับจุลินทรีย์ เพราะวิธีการทำง่ายและสะดวกรวดเร็ว รวมทั้งก่อให้เกิดมิวเทชันได้ผลดี เซลล์หรือสปอร์ที่ผ่านมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตเมื่อเจริญเป็นโคโลนีแล้ว จะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของโคโลนีได้ได้ชัดเจน (Fantini, 1975) รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามขนาดของความยาวคลื่น คือ UV-A (320 nm-visible) UV-B (290-320 nm) และ UV-C (180-290 nm) โดย UV-B ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดมิวเทชัน เนื่องจากมีพลังงานมากพอที่จะชักนำให้เกิดมิวเทชันและไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย เมื่อดีเอ็นเอได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต จะมีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดพันธะเคมีที่ผิดปกติระหว่างเบสไพริมิดีนที่อยู่ติดกัน ส่งผลให้เกิดเป็นไพริมิดีนไดเมอร์ (pyrimidine dimer) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่ามักจะเกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) มากกว่าไซโตซีน เมื่อเกิดไทมีนไดเมอร์ขึ้น รังสีอัลตราไวโอเลตจะปล่อยพลังงานในช่วงความยาวคลื่นสั้นประมาณ 200 – 300 นาโนเมตร โดยทั่วไปดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตสามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตสูงสุดที่ความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร ทำให้เกิดไพริมิดีนไดเมอร์ขึ้น ส่งผลให้มี

การยับยั้งกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอและเกิดความผิดพลาดเกิดขึ้นขณะที่มีการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอ



รูปที่ 3 การเกิดไทมีนไดเมอร์เมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต

ส่วนการซ่อมแซมดีเอ็นเอหลังเกิดไทมีนไดเมอร์เมื่อโดนรังสีรังสีอัลตราไวโอเลตจะเกิดการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอ โดยมี 2 กลไกที่เกี่ยวข้อง คือ

1. โฟโตรีแอคติเวชัน เป็นกระบวนการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอเมื่อเกิดไทมีนไดเมอร์ โดยแสงจะไปกระตุ้นเอนไซม์โฟโตไลเอส ให้เกิดการทำงานโดยเข้าไปทำลายพันธะของไทมีนไดเมอร์ ทำให้เบสไทมีนสามารถเข้าคู่กับเบสอะดีนีนในสายตรงข้ามได้ตามปกติ ดังนั้นเมื่อเราต้องการชักนำจุลินทรีย์ให้เกิดมิวเทชันจึงจำเป็นต้องเก็บจุลินทรีย์ที่ผ่านรังสีอัลตราไวโอเลตไม่ให้ได้รับแสง เพื่อป้องกันกระบวนการโฟโตรีแอคติเวชัน

2. เอ็กซ์ซิชันรีแพร์ กลการซ่อมแซมดีเอ็นเอชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องใช้แสงเป็นตัวกระตุ้น โดยจะประกอบด้วย 4 ขั้นตอน สรุปสั้น ๆ ว่า cut-patch-cut-seal โดยขั้นตอนแรก เอนไซม์ endonuclease จะจับกับไทมีนไดเมอร์และตัดพันธะระหว่างน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟส ในบริเวณก่อนที่จะถึงไดเมอร์ จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase I จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากปลายที่ถูกตัด 3'-OH โดยใช้อีกสายเป็นแม่พิมพ์ จากนั้นก็จะมีการเชื่อมกันของปลาย 3'-OH และ 5'-P โดยเอนไซม์ไลเกส (ligase) ได้ดีเอ็นเอสายเดิม

สาร NTG กับมิวเทชัน

N–methyl–*N*-nitro–*N*–nitrosoguanidine: MNNG บางครั้งเรียก nitrosoguanidine NTG หรือ NG มิวทาเจนชนิดนี้จะเติมหมู่เมทิลหรือเอทิล ให้กับเบสกัวนีน (G) ที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 (O_6) ทำให้เกิด O_6- methyl –guanine ซึ่งสามารถจับคู่กับเบส ไทมีนได้ (G-T) หรือเกิดเติมหมู่เมทิล หรือเอทิลที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 4 (O_4) ของเบสไทมีน ทำให้ไทมีนที่มีหมู่เมทิล (O_4-methylthymine) นี้ จับคู่กับเบสกัวนีนได้ แทนที่จะจับกับเบสอะดีนีนได้อย่างถูกต้อง ดังนั้น เมื่อเกิดกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ จึงทำให้มีการเปลี่ยน G-C เป็น T-A หรือ T-A เป็น G-C ซึ่งจัดว่าเป็นเกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสแบบทรานซิชัน

กราฟความอยู่รอด (survival curve)

ในการศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเทชันในสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของมิวทาเจนและอัตราการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต (survival curve) ชนิดนั้น ๆ เพื่อหาปริมาณของมิวทาเจนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเทชัน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการได้รับมิวทาเจนและไม่ได้รับมิวทาเจน แล้วนับปริมาณสิ่งมีชีวิตที่สามารถมีชีวิตรอดภายหลังจากการได้รับมิวทาเจน จากนั้นเขียนกราฟความอยู่รอด ซึ่งเมื่อปริมาณของมิวทาเจนเพิ่มขึ้น จำนวนของสิ่งมีชีวิตที่มีชีวิตรอดจะน้อยลง ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความไว (sensitive) ต่อมิวทาเจนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของมิวทาเจน และชนิดของสิ่งมีชีวิตและชนิดของส่วนที่นำมาชักนำให้เกิดมิวเทชัน เช่น ในการศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเทชันในเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต โดยใช้เส้นใยและ สปอร์มาทำการทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า เส้นใยมีความไวต่อการได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตมากกว่าสปอร์ โดยที่การฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 60 วินาที มีอัตราการอยู่รอดของเส้นใย 10 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการอยู่รอดของสปอร์ 40 เปอร์เซ็นต์ในการชักนำให้เกิดมิวเทชันในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ มักจะใช้มิวทาเจนที่ชักนำให้เกิดมิวเทชันที่ให้อัตราการอยู่รอดที่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมักจะได้มิวแทนต์ที่ได้มีความแตกต่างจากสายพันธุ์เดิม (wild type) และมีความเสถียรภาพสูงในการถ่ายทอดลักษณะไปยังรุ่นถัดไปได้

การคัดเลือกมิวแทนต์

เมื่อเกิดการชักนำให้เกิดมิวเทชันขึ้น จำเป็นต้องคัดเลือกมิวแทนต์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีต่าง ๆ เช่น Aim test การคัดเลือก auxotropic mutant ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมบ่งชี้มิวแทนต์ได้ นอกจากนี้ resistance marker ซึ่งสามารถทำการตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็วกว่า auxotrophic marker โดยคัดเลือกโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี

การเติมสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญ เช่น คริสตัลไวโอเลต มาลาไซต์กรีน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวด์ไทป์ที่ไม่สามารถเจริญได้ (Li และ Chang, 1991) สำหรับจุลินทรีย์จำพวกรา จะนิยมใช้สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญ เช่น คีโตโคนาโซล (ketoconazole) ซึ่งจัดเป็นสารต่อต้านราชนิดหนึ่ง (imidazole antifungal) ทำหน้าที่ในการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ergosterol สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของราอีกชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงคือ แอมโฟเทอริซิน บี (Amphotericin B) ซึ่งสามารถใช้ในการยับยั้งการเจริญในราได้หลายชนิด

การชักนำให้เกิดมิวเทชันเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

การชักนำให้เกิดมิวเทชันในเชื้อจุลินทรีย์มีประโยชน์มากในการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แนวทางในการปรับปรุงคัดเลือกสายพันธุ์มักจะอาศัยเทคนิคพื้นฐาน 2 วิธี คือการใช้ความรู้ทางด้านวิศวกรรมทำการตัดต่อยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (Genetic Engineerring) ซึ่งต้องอาศัยความรู้และความชำนาญด้านเทคนิคอย่างมาก และวิธีที่ 2 การมิวเทชัน (Baltz, 1986) เนื่องจากวิธีที่ 2 เป็นวิธีที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคที่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็ว ดังจะเห็นได้จากการศึกษาวิจัยในหลายประเทศ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตสารหลากหลายชนิด อาทิ

Kuhad, Kumar และ Singh (1994) ได้ทำการชักนำ *Fusarium oxysporum* ให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ตามด้วยการชักนำด้วยสาร NTG ได้มิวแทนต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ เซลลูเลส มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นถึง 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม

Haq, Javed และ Ashaf (2002) สนใจการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ Amyloglucosidase ใน *Aspergillus niger* โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต 1.6 ×10 J/m^2/s นาน 5-40 นาที พบว่า *A. niger* GCBU-25 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 136.1 IU/ml/min เป็น 2 เท่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ไวด์ไทป์ และเมื่อนำไปเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสมสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้สูงถึง 183 IU/ml/min

จะเห็นว่าการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสาร NTG นี้มีความสำคัญมากในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ สามารถใช้ได้กับราหลายชนิด และไม่จำเพาะต่อกลุ่มของสารชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเฉพาะปัจจุบันมีความสนใจจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตไลเพสเพื่อจะนำไปพัฒนาแล้วนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ทำงานของเอนไซม์ไลเพสก็จะมีการเลือกใช้วิธีการมิวเทชัน อาทิ

Bapiraju และคณะ (2004) ศึกษาการเพิ่มการสร้างเอนไซม์ไลเพสโดยการชักนำให้เกิดมิวเทชันใน *Rhizopus* sp. โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและสาร NTG พบว่า มิวแทนต์ $BTUV_3$ที่เกิดจากการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตของสายพันธุ์ $BTNS_{12}$ สามารถสร้างเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น 110

เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับไวด์ไทป์ $BTNS_{12}$ และ เป็น 180 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม $BTNS_{24}$ และมิวแทนต์ $BTNT_2$ สร้างเอนไซม์ไลเพส ได้สูงขึ้นถึง 232 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม $BTNS_{24}$

งานวิจัยของ Savitha และคณะ (2007) ก็ทำการคัดแยกราจากดินได้ 32 ไอโซเลต แล้วนำราที่ได้จากการคัดแยกมาทดสอบเพื่อคัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสได้รา ทั้งหมด 4 ไอโซเลต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA ที่ประกอบด้วยโรดามีน บี (0.001 เปอร์เซ็นต์ w/v)และแต่ละสูตรก็จะใส่ไตรกลีเซอไรด์ (1 เปอร์เซ็นต์ v/v) ที่ต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันปาล์ม น้ำมันข้าวสาลี น้ำมันมะพร้าว น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลือง โดยพบว่า รา *Mucor* sp. สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำมันดอกทานตะวันเป็นแหล่งที่ดีที่สุดซึ่งทำให้ผลิตไลเพสได้