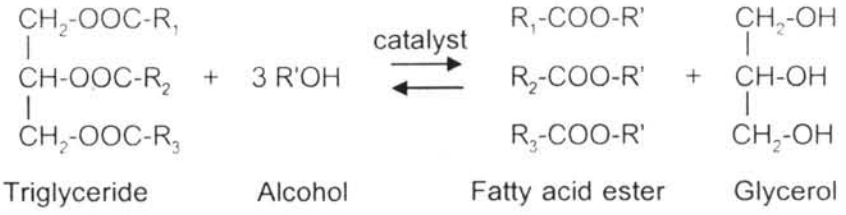
บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันมีการผลิตเอนไซม์ไลเพสมาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เนื่องด้วยคุณสมบัติที่มีความคงทนต่อค่าความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่ น้ำยาซักล้าง อาหาร เครื่องสำอาง เชื้อเพลิงชีวภาพ ยา ขจัดเศษไขมันออกจากวัตถุดิบผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง เป็นต้น (Posorske, 1984) นอกจากนี้ไลเพสสามารถนำมาเร่งปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน โดยเลือกใช้น้ำมันพืชหรือน้ำมันสัตว์กับเมทานอลหรือเอทานอลจะได้เมทิลเอสเทอร์หรือเอสทิลเอสเทอร์ซึ่งก็คือ ไบโอดีเซล (Fukuda, Kondo และ Noda, 2001)

ไลเพส (Lipase; EC 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า "glycerol ester hydrolase" เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่ง (catalyst) ของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) (Brockerhoff และ Jensen, 1974) ซึ่งจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ จะเกิดได้ในสภาวะ oil-water interface (Cihangir และ Sarikaya, 2004) นอกจากนี้ไลเพสสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เรียกว่า ทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของไตรกลีเซอไรด์กับแอลกอฮอล์
(Fukuda, Kondo และ Noda, 2001)

อย่างไรก็ตามไลเพสที่ผลิตได้ในเชิงการค้ายังมีราคาสูง ดังนั้นการพัฒนาจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มการทำงานของไลเพสเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง และพบว่ารานับเป็นจุลินทรีย์แหล่งที่ดีในการผลิตไลเพส

การชักนำให้เกิดมิวเทชันเป็นการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมเนื่องจากสิ่งก่อการกลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ รังสี สารเคมี และอุณหภูมิ การชักนำให้เกิดมิวเทชันนี้ทำให้ทราบสาเหตุที่แน่ชัดของการเกิดมิวเทชัน เช่น การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดการสร้างพันธะโคเวเลนต์ (covalent bond) ระหว่างเบสไทมีนสองตัวที่อยู่ติดกัน หรือสารเคมีบางตัวที่มีโครงสร้างคล้ายเบสในดีเอ็นเอ (base analogs) ทำให้เกิดทอโทเมอไรเซชันเช่นเดียวกับการเกิดมิวเทชันตามธรรมชาติ เป็นต้น ด้วยวิธีชักนำให้เกิดมิวเทชันนี้ถูกนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดมิวเทชันกับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ เพื่อให้สิ่งมีชีวิตนั้นผลิตสารที่ต้องการหรือสามารถเจริญได้ในภาวะแวดล้อมที่แตกต่างไปจากเดิมและนอกจากการใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในการชักนำให้เกิดมิวเทชันยังมีสารเคมีต่างๆ ที่สามารถชักนำให้เกิดมิวเทชันได้ เช่น NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้กัน เนื่องจากสารนี้สามารถชักนำให้เกิดมิวเทชันสูงในปริมาณที่ทำให้เกิดการตายต่ำ โดยสารนี้มักชักนำให้เกิดการแทนที่ของเบส โดยจะไปเติมหมู่เมทิล (methyl group) ให้กับเบสกัวนีน (G) ซึ่งเป็นผลให้สูตรโครงสร้างของเบสนั้นเปลี่ยนไป (Goodenough, 1978)

เนื่องจากไลเพสพบได้ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ไลเพสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเพสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ จึงมีการเลือกใช้ไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมกันมาก ซึ่งราก็เป็นจุลินทรีย์แหล่งที่ดีในการผลิตไลเพสเพราะให้ปริมาณเอนไซม์ที่สูง งานวิจัยนี้จะทำการคัดแยกราที่ผลิตไลเพสที่ส่งออกนอกเซลล์ในปริมาณมากจากธรรมชาติ โดยเริ่มจากการเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ เช่น ดิน ส่วนต่าง ๆ ของพืชน้ำมัน ตะกรันน้ำมัน เป็นต้น และทำการปรับปรุงพันธุกรรมของรา โดยการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและการใช้สาร NTG เพื่อให้รามีการผลิตไลเพสที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซลในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศเป็นอย่างมากในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกและชักนำให้เกิดมิวเทชันในราด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสาร NTG เพื่อเพิ่มการทำงานของไลเพส

ขั้นตอนการวิจัย

1) การแยกราจากแหล่งตัวอย่าง
2) คัดเลือกราที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส
3) การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาด้วยไลเพสของราที่ทำการคัดเลือกได้
4) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูพันธุศาสตร์ของเชื้อที่คัดเลือกได้เพื่อระบุสายพันธุ์
5) ชักนำให้เกิดมิวเทชันและการคัดเลือกในราที่คัดเลือกได้
6) ศึกษาลักษณะของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์
7) การตรึงรูปไลเพสจากราที่คัดเลือกบนวัสดุค้ำจุน
8) การศึกษาการทำปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชันของราสายพันธุ์เดิมและมิวแทนต์
9) วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนวิทยานิพนธ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รามิวแทนต์ที่มีความสามารถในการทำงานของไลเพสมากกว่าสายพันธุ์เดิม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานในด้านอุตสาหกรรม