หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายในประเทศไทย เป็นอุตสาหกรรมขนาดใหญ่และมีความสำคัญมาก น้ำตาลทรายสามารถผลิตจากพืชชนิดต่างๆ ได้ เช่น อ้อย บีทหวาน ฯลฯ แต่เนื่องจากประเทศไทยมีภูมิอากาศเป็นแบบร้อนชื้น สามารถปลูกอ้อยได้เป็นจำนวนมาก ดังนั้น จึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้ผลิตน้ำตาลทราย เพื่อการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก ซึ่งสามารถทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี

อ้อยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* มีการปลูกทั่วทุกภาคในประเทศไทย กระบวนการผลิตน้ำตาลในอุตสาหกรรม จะเริ่มด้วยการตัดอ้อยส่งเข้าโรงงาน ซึ่งจะได้รับการหีบเอาน้ำอ้อย เพื่อผ่านเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายต่อไป องค์ประกอบของน้ำอ้อย จะประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ ประมาณ 70-80 % ร่วมกับธาตุอาหารอื่นๆ ซึ่งเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ การเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ จะก่อผลเสียต่อกระบวนการผลิตน้ำตาล อาทิเช่น มีการสร้างสารเมือกออกมาทำให้น้ำอ้อยหนืดขึ้น เกิดการอุดตันของท่อและรางส่งน้ำอ้อย หรือ ทำให้น้ำอ้อยมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เกิดการบูดเปรี้ยว เป็นต้น (บุญส่ง แสงอ่อน, 2525)

แบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในน้ำอ้อย และก่อปัญหาต่อการผลิตน้ำตาลทราย คือ แบคทีเรียในกลุ่ม *Leuconostoc* spp. ซึ่งได้แก่ *L. mesenteroides* และ *L. dextranicum* (Lee and Fox, 1985) แบคทีเรียกลุ่มนี้ พบได้ทั่วไปและจะปนเปื้อนกับอ้อย ในระหว่างการเก็บเกี่ยวจากไร่และขนส่งเข้าสู่โรงงาน เชื้อดังกล่าวเจริญเติบโตได้ดีในภาวะที่อากาศร้อนชื้น และสามารถใช้น้ำตาลซูโครสเพื่อการเจริญ และยังสามารถให้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารที่มีความเหนียวหนืดคือ เดกซ์แทรน (Irvine, 1981) อันเป็นสาเหตุของปัญหาหลักในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

เดกซ์แทรนเป็นโฮโมโพลีเมอร์ของดี-กลูโคส ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,6 เป็นส่วนใหญ่ โดยอาจจะมีการแตกแขนงเป็นพันธะ α-1,3 และ α-1,4 ได้ เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Leuconostoc* spp. มีความสามารถ ในการสังเคราะห์เอนไซม์เดกซ์แทรนซูเครส (dextransucrase) หรืออีกชื่อหนึ่งคือ กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase, GTF) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นเดกซ์แทรน ตามสมการที่ 1

$$n\ \text{Sucrose} \xrightarrow[\text{หรือ GTF}]{\text{dextransucrase}} [\ \text{D-glucose}\ ]_n + n\ \text{fructose}$$

ซูโครส เดกซ์แทรน ฟรักโตส

สมการที่ 1 ปฏิกิริยาการเกิดเดกซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครส (Barnes, 1974)

เดกซ์แทรนที่สร้างขึ้น สามารถมีความยาวและขนาดโมเลกุลแตกต่างกันมาก คือ ตั้งแต่หลายพัน ขึ้นไปจนถึงหลายล้านดาลตัน โดยน้ำหนักโมเลกุลและจำนวนแขนงย่อยนี้ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เช่น เดกซ์แทรนที่ผลิตจากเชื้อ *L. mesenteroides* NRRL B-512 F พบว่ามีโครงสร้างเป็นเส้นตรง ยึดกันด้วยพันธะชนิด α-1,6 ประมาณ 95 % และแตกกิ่งออกไปยึดกันด้วยพันธะ α,1-3 ประมาณ 5 % นอกจากนี้ยังอาจพบพันธะ α,1-2 และ α,1-4 ได้ด้วย (Galvez-Marisca and Lopez-Munguia, 1991) การแตกกิ่ง (branching) ของพันธะกลูโคสนี้ จะลดสมบัติการละลายน้ำ และทำให้เดกซ์แทรนมีลักษณะเหนียว ประกอบกับน้ำหนักโมเลกุลของเดกซ์แทรนสูงถึง 10^6-10^7 ดอลตัน ยิ่งทำให้เกิดลักษณะเหนียวหนืด และจับเกาะกับพื้นผิวต่างๆ เช่น แก้ว หรือ โลหะ ได้ดี

เดกซ์แทรนที่ผลิตจากแบคทีเรียในน้ำอ้อยเหล่านี้ เมื่อจับเกาะกับพื้นผิวท่อส่งน้ำอ้อยในโรงงานและสะสมมากขึ้น จะทำให้เกิดการอุดตันในท่อส่งน้ำอ้อย ถัง เครื่องกรอง แผ่นกรอง และอื่นๆ ทำให้อัตราการกรองลดต่ำลง การเกิดผลึกของน้ำตาลทรายช้าลงหรือไม่สมบูรณ์ (Imrie and Tilbury, 1972) นอกจากนี้ ความหนืดของเดกซ์แทรนยังทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนมาในน้ำอ้อย ถูกยึด (trap) ไว้ และเจริญโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่ง

อาหาร แล้วปลดปล่อยกรดอินทรีย์จากขบวนการเมตาบอลิซึมออกมา ทำให้ความเป็นกรดของน้ำอ้อยเพิ่มขึ้น ยังผลให้น้ำอ้อยบูดเปรี้ยว มีกลิ่น อีกทั้งยังทำให้ประสิทธิภาพการผลิตและคุณภาพของน้ำตาลที่ผลิตได้ลดต่ำลง (สันติ์ ฉายตระกูล, 2525)

จากการประมาณการโดยทั่วไป พบว่าการสูญเสียในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายที่มีสาเหตุมาจากเดกซ์แทรนนั้น สูงถึง 9.2 % ของปริมาณการผลิตทั้งหมด (Tilbury,1985 อ้างถึงใน เอก แสงวิเชียร, 2531) ซึ่งเมื่อคิดจากปริมาณการส่งออกน้ำตาลในปี 2537/2538 พบว่ามีการส่งออกน้ำตาลทรายประมาณ 2.6 ล้านเมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 16,845 ล้านบาท (ฝ่ายนโยบายและเศรษฐกิจน้ำตาล, 2538) ในอัตราข้างต้นจะประมาณได้ว่า เดกซ์แทรนจะก่อให้เกิดการสูญเสียรายได้ถึง 1,550 ล้านบาท ซึ่งนับว่าเป็นผลเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศอย่างมาก

การแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล อาจทำได้หลายวิธี เช่น การนำอ้อยที่ตัดได้ เข้ากระบวนการผลิตทันทีเพื่อป้องกันการติดเชื้อ การเก็บอ้อยในที่อุณหภูมิต่ำ ควบคุมความเป็นกรดด่างของน้ำอ้อย การฆ่าเชื้อโรคโดยการทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อน หรือการเติมสารกำจัดเชื้อแบคทีเรีย (bacteriocide) ลงไป การควบคุมปริมาณเดกซ์แทรนในกระบวนการผลิตโดยใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การฉายรังสีอุลตราไวโอเลต การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic wave) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม พบว่าเทคนิคทางเคมีกายภาพในการกำจัดเดกซ์แทรนไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากค่าใช้จ่ายในการควบคุมสูง น้ำตาลที่ได้มีคุณภาพต่ำลง และอาจมีสารพิษตกค้าง ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ดังนั้น จึงได้มีการพยายามหาวิธีอื่น สำหรับการกำจัดเดกซ์แทรน วิธีหนึ่งที่ได้ผล และมีความจำเพาะสูง คือ การใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ซึ่งมีความจำเพาะในการย่อยเดกซ์แทรนให้สลายตัว ซึ่งจะยังผลให้ลดความเหนียวหนืด ที่มีสาเหตุจากเดกซ์แทรนลง (Lee and Fox, 1985)

เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (α-1,6-D-glucan-6-glucanohydrolase ; E.C.3.2.1.11)เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะ α-1,6 ภายในสายเดกซ์แทรน ทำให้โมเลกุลของเดกซ์แทรนมีขนาดเล็กลง และลดความเหนียวหนืดลง (Galvez-Mariscal and Lopez-Munguia, 1991) เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสสามารถพบได้ในหลายแหล่ง เช่น ในพืชชั้นสูง เนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จุลชีพหลายชนิด ทั้งในแบคทีเรีย เช่น *Streptococcus sorbrinus* (Barret et al., 1987) *Micrococcus* sp. สายพันธุ์ Z-10 (ศรินี สุวรรณสิงห์, 2533) ยีสต์ เช่น *Lipomyces starkeyi* (Webb and Spencer-Martins, 1983) และในรา เช่น *Aspergillus luchuensis* Inui (Joshi and Tamhane, 1975) *Penicillium* sp. (Brown et al.,1987) *Chaetomium* sp. (Hattori et al., 1981) แต่พบว่าเชื้อราเป็นแหล่งสำคัญที่สุดของการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในเชิงพาณิชย์ (Lee and Fox, 1985) เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากจุลชีพเท่าที่มีการรายงานนั้น เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยต้องอาศัยสารชักนำ (inducible enzyme) ซึ่งก็คือเดกซ์แทรน แล้วปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) (Koenig and Day, 1989)

Fukumoto และคณะ (1971) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อรา *Penicillium luteum* ATCC 9644 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย เดกซ์แทรน 1%, $NaNO_3$ 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 0.2%, $MgSO_4\ 7H_2O$ 0.05% และ $FeSO_4\ 7H_2O$ 0.01% ปรับค่าความเป็นกรดด่าง 6.0 บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ 13.0 หน่วยต่อมล.

Joshi และ Tamhane (1975) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดยรา *Aspergillus luchuensis* Inui โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้ง 2% ปรับความเป็นกรดด่าง 5.5 พบว่าเมื่อบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (28-30 °ซ) จะสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด 335 หน่วยต่อมล. ในชั่วโมงที่ 120 ของการเลี้ยงเชื้อ

Shukla และคณะ (1989) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากราหลายชนิด เช่น *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp. พบว่า *P. aculeatum* NSI4 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 230 หน่วยต่อมล. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรของ Fukumoto ที่มีเดกซ์แทรน (น้ำหนักโมเลกุล $4x10^6$) 1.5% ความเป็นกรดด่าง 5.5-6.0 ที่อุณหภูมิ 30-35 °ซ อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96-120 ชั่วโมง

Galvez-Mariscal และ Lopez-Munguia (1991) ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส พบว่า รา *Penicillium purpurogenum* และ *Paecilomyces lilacinus* ให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์สูงสุด และเมื่อทำการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *P. lilacinus* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้เป็น 2 เท่าและเอนไซม์ที่ได้มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 60 °ซ สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาลได้

ในทางปฏิบัติแล้ว มีการนำเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส ไปใช้กับอุตสาหกรรมน้ำตาลทรายในหลายประเทศ เช่น ในปี 1989 ประเทศเม็กซิโก มีการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสปริมาณ 4 ตัน ในโรงงานน้ำตาลประมาณ 40 % ของโรงงานทั่วประเทศ โดยทั่วไปแล้ว จะใช้เอนไซม์ในช่วงระหว่าง 10-120 ppm โดยขึ้นอยู่กับช่วงเวลาในการทำปฏิกิริยา และความรุนแรงของการปนเปื้อน พบว่าในกรณีที่มีการปนเปื้อนสูง อาจต้องใช้เอนไซม์ถึง 15,000 ppm ซึ่งคิดเป็นมูลค่า 0.11 - 1.32 ดอลลาร์ ต่อน้ำตาลอ้อย 1 ตัน หรือ 1.00 - 13.00 ดอลลาร์ต่อน้ำตาลทราย 1 ตัน แต่ค่าใช้จ่ายเหล่านี้ ยังน้อยกว่ามูลค่าการสูญเสีย เนื่องจากเดกซ์แทรนหลายเท่าตัว (Galvez-Marisca and Lopez-Munguia, 1991)

Jolly และ Prakash (1987 อ้างถึงใน เอก แสงวิเชียร, 2531) ในประเทศอินเดีย ได้ทดลองกำจัดเดกซ์แทรนออกจากน้ำอ้อยโดยใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส (Novo 25L) 100 ppm ที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 15 นาที พบว่า สามารถขจัดเดกซ์แทรนลงได้ 48 - 52 %

Arova และ คณะ (1991) ทดลองใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่ได้จากรา *Penicillium funiculosum* หรือ *P.lilacium* ในการขจัดเดกซ์แทรน โดยใช้อุณหภูมิ 40 °ซ ความเป็นกรดด่าง 5.4 เป็นเวลา 20 นาที สามารถย่อยเดกซ์แทรนให้กลายเป็น isomaltose และ isomaltotriose ได้ถึง 68% โดยไม่มีผลต่อการตกผลึกของน้ำตาล

นอกจากความสำคัญของเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสที่กล่าวไปแล้ว ยังพบว่ามีการใช้เอนไซม์ชนิดนี้ ในการลดการเกิด plaque บนเคลือบฟัน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Streptococcus* spp. ซึ่งเป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในช่องปากของคน และมีความสามารถในการสร้างเดกซ์แทรนซูเครสได้ดี และใช้น้ำตาลซูโครสที่เรารับประทานเข้าไป สร้างเป็นเดกซ์แทรนได้ เดกซ์แทรนที่สร้างออกมาจะมีลักษณะเหนียว ช่วยให้เชื้อจับเกาะกับผิวฟัน โดยรวมตัวกับเศษอาหารและโปรตีนในน้ำลาย เกิดเป็น plaque ขึ้น แบคทีเรียอื่นๆในช่องปากอาจถูกยึดไว้โดยเดกซ์แทรน และเกิดการเจริญของเชื้อ ซึ่งจะมีการปลดปล่อยกรดอินทรีย์จากการเมตาบอไลท์ออกมาด้วย สารเคลือบฟัน (enamel) และเนื้อฟัน จะถูกกรดเหล่านี้ทำลาย และเป็นสาเหตุของการเกิดฟันผุ ได้มีการนำเอาเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสผสมลงในยาสีฟัน เพื่อช่วยกำจัดเดกซ์แทรน แก้ปัญหาการเกิดฟันผุได้ดี แต่ยังคงมีปัญหาในแง่ของความเสถียรต่อการเก็บ การทำงานของเอนไซม์ในภาวะที่เป็นกรดในช่องปาก และยังมีราคาแพงด้วย (ณรินี สุวรรณสิงห์, 2533)

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย เอก แสงวิเชียร (2531) ได้รายงานถึงการคัดเลือกเชื้อรา *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 จากตัวอย่างดินแหล่งต่างๆในประเทศไทย ที่สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหาร Fukumoto สูตรปรับปรุงภายใต้ภาวะการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิห้อง (30-35 °ซ) เป็นเวลา 6 วัน โดยสามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ 42.0 หน่วยต่อมล.

สุภาพร ชาติวรพงศา (2536) ศึกษาการใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสำหรับผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนส โดย *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 พบว่า การใช้ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย สามารถใช้เลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ดี โดยใช้สูตรอาหาร

ดัดแปลง ประกอบด้วย ไฮโดรไลเสทของชานอ้อย 0.1 % (น้ำหนักต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาณกลูโคส) เป็นแหล่งคาร์บอน, เดกซ์แทรน 1% เป็นสารชักนำการสร้างเอนไซม์, $NaNO_3$ 0.2% เป็นแหล่งไนโตรเจน และ สารสกัดจากยีสต์ 0.2% ความเป็นกรดด่าง 6.0 สามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ระหว่าง 35-42 หน่วยต่อมล. ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนการศึกษาเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสจากเชื้อแบคทีเรีย โดย ณฐินี สุวรรณสิงห์ (2533) คัดเลือกแบคทีเรียทนเค็ม จากตัวอย่างดินเลนและน้ำทะเลจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย พบว่า *Micrococcus* sp. สายพันธุ์ Z-10 มีความสามารถผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Yamaguchi ที่มีเดกซ์แทรน 0.5 %, NaCl 0.5% ความเป็นกรดด่าง 9.0 ที่อุณหภูมิ 30-35 °ซ สามารถให้ผลผลิตของเอนไซม์เป็น 13.0 หน่วยต่อมล.

แม้ว่าการใช้เอนไซม์เดกซ์แทรนเนสกับอุตสาหกรรมน้ำตาลจะให้ผลดี แต่ในเชิงพาณิชย์นั้น การลดต้นทุน เป็นสิ่งที่มีความสำคัญมาก จึงได้มีการศึกษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในเชิงการค้า เช่น การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีประสิทธิภาพการผลิตสูงขึ้น เพื่อให้ราคาของเอนไซม์ลดต่ำลง ตลอดจนการนำวิธีการต่างๆ สำหรับทำการปรับปรุงเชื้อจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพการผลิตเดกซ์แทรนเนสเพิ่มสูงขึ้น หนึ่งในวิธีการนี้คือ การปรับปรุงสายพันธุ์ราที่สร้างเอนไซม์นี้ ให้สามารถสร้างเอนไซม์ในปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

การปรับปรุงสายพันธุ์ (strain improvement) ในเชื้อจุลินทรีย์ และคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น และอาจแบ่งได้เป็นหลายวิธี (Baltz, 1986) ได้แก่

1. การกลายพันธุ์ (mutation) เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และปลอดภัยที่สุด ใช้ความรู้ทางพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการปรับปรุงน้อย ใช้เทคนิคที่ง่าย และมีราคาถูก แต่มักให้ผลแบบสุ่ม ต้องมีการคัดเลือกเป็นจำนวนมาก

2. Genetic recombination เป็นวิธีที่ต้องอาศัยความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรม สรีรวิทยา รวมทั้งคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ที่ศึกษา ตัวอย่างเช่น การผสมข้ามสายพันธุ์ด้วยการหลอมรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นต้น

3. Gene cloning เป็นวิธีการปรับปรุงระดับพันธุกรรม ต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับพันธุกรรมของเชื้ออย่างลึกซึ้ง เป็นวิธีที่ค่อนข้างยุ่งยาก เทคนิคมีราคาแพง ตัวอย่างเช่น การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering)

<u>การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์</u>

การกลายพันธุ์ คือ การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) แต่โอกาสเกิดในลักษณะนี้จะมีน้อยมาก คือจะเกิดในอัตรา 1 ในล้านเซลล์ ดังนั้น จึงได้มีการใช้สารกลายพันธุ์ (mutagen) เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง และเพิ่มความถี่ของการกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์ด้วยสารกลายพันธุ์ชนิดเดียว มักพบว่าประสิทธิภาพในการคัดเลือกครั้งสุดท้ายจะลดลง ถ้าต้องการให้ประสิทธิภาพการคัดเลือกได้ผลดี อาจทำโดยใช้สารกลายพันธุ์มากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป

สารกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. พวกรังสี (radiation mutagen) รังสีที่ใช้ในการกลายพันธุ์ มักเป็นรังสีที่ช่วงคลื่นสั้น แบ่งเป็น

1.1 Ionizing radiation

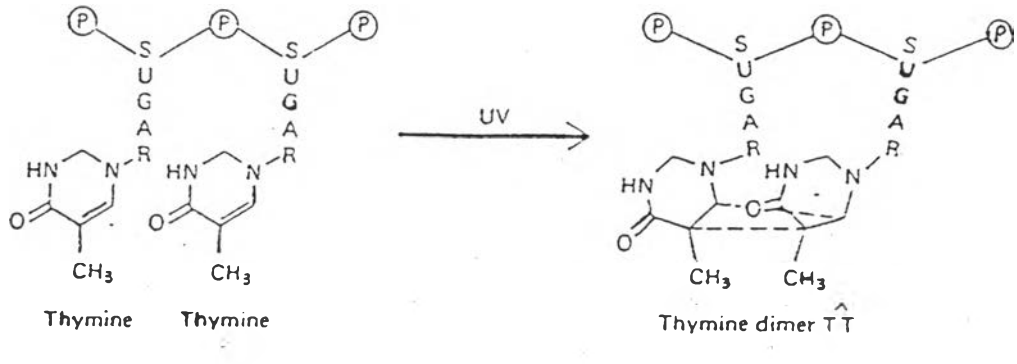
รังสีกลุ่มนี้ จะมีคุณสมบัติในการทะลุทะลวงสูง ทำให้เกิด free radical (โมเลกุลที่มีอะตอมเป็น unpair electron) รังสีเหล่านี้ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีแอลฟา รังสีเบต้า นิวตรอน รังสีกลุ่มนี้จะเป็นสาเหตุทำให้ดีเอนเอสายเดี่ยวและสายคู่แตกออกที่ตำแหน่ง phosphodiester backbone คือบริเวณที่จับกันระหว่างน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟต ซึ่งทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอนเอสายใดสายหนึ่งหรือทั้งสองสาย (Fantini, 1975) เมื่อส่วนที่หักกลับมาต่อกัน อาจต่อกันในลักษณะสลับข้าง สลับตำแหน่ง หรืออาจเกิด

การขาดหายไป ทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ GC —> AT transition, inversion , translocation หรือ deletion ได้ (Hopwood, 1970)

1.2 Non-ionizing radiaion

รังสีกลุ่มนี้มีอันตรายน้อยกว่ารังสีในกลุ่มแรก เนื่องจากมีพลังงานต่ำกว่า รังสีกลุ่มนี้ ได้แก่ แสงขาว (visible light) รังสีอินฟาเรด คลื่นไมโครเวฟ และแสงอุลตราไวโอเลต เป็นต้น

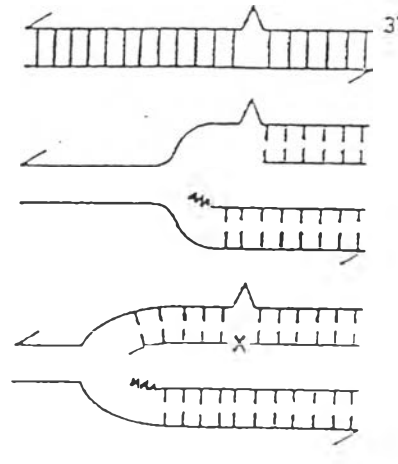
แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet light) เป็นแสงชนิดไม่แตกตัว และเป็น physical mutagen ที่นิยมใช้กันมากในการเริ่มงานปรับปรุงสายพันธุ์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม การดูดซับแสงอุลตราไวโอเลตได้ดีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยเบสในสายดีเอนเอ โดยเฉพาะเบสในกลุ่มไพริมิดีน (pyrimidine) มีผลทำให้เกิด พันธะระหว่างโมเลกุลของเบสไทมีน 2 โมเลกุล ที่อยู่ติดกันในสาย polynucleotide เดียวกัน เกิดเป็น thymine-dimer (รูปที่ 1) thymine-cytosine dimer และ cytosine dimer ในอัตรา 1.0:0.7:0.2 (อรพิน ภูมิภมร, 2527)



รูปที่ 1 การเกิด thymine dimer จากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต

(Goodenough, 1984)

การเกิดไดเมอร์ชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยทำให้บริเวณนั้นไม่เป็น double helix เนื่องจากเบสไทมีน จะไม่สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับเบสอะดีนีนในสาย polynucleotide ตรงข้ามได้ พบว่า บริเวณไดเมอร์นี้ จะเป็นบริเวณ inactive site ถ้าเกิดการ transcription เมื่อมาถึงบริเวณนี้การจำลองตัวของดีเอนเอจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ อีกกรณีหนึ่ง คือ อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการซ่อมแซม ซึ่งเป็นกระบวนการตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิต การซ่อมแซม thymine dimer ที่นบว่าเป็นสาเหตุทำให้เกิดการกลายพันธุ์คือ กระบวนการ SOS repair (รูปที่ 2) เป็นการซ่อมแซมซึ่งเกิดขึ้นหลังจากมีการแยกสายดีเอนเอออกในขณะจำลองตัวเอง เมื่อมีการอ่านรหัสมาถึงบริเวณนี้ เอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอร์เรสจะนำเบสมาเติมในส่วนที่ขาดไปแบบสุ่ม และใช้ดีเอนเอสายที่ซ่อมแซมแล้วเป็นแม่แบบต่อไป ดังนั้นการซ่อมแซมใหม่นี้ คู่เบสก็จะมีการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เหมือนเดิม (อรพิน ภูมิภมร, 2527)



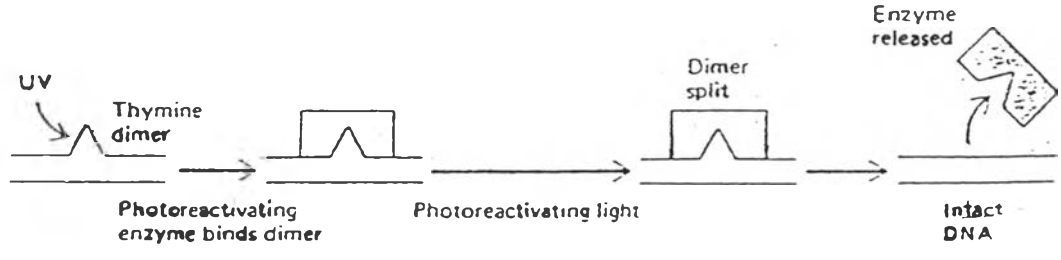
รูปที่ 2 กระบวนการ SOS repair ที่มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์

(Goodenough, 1984)

V = thymine dimer

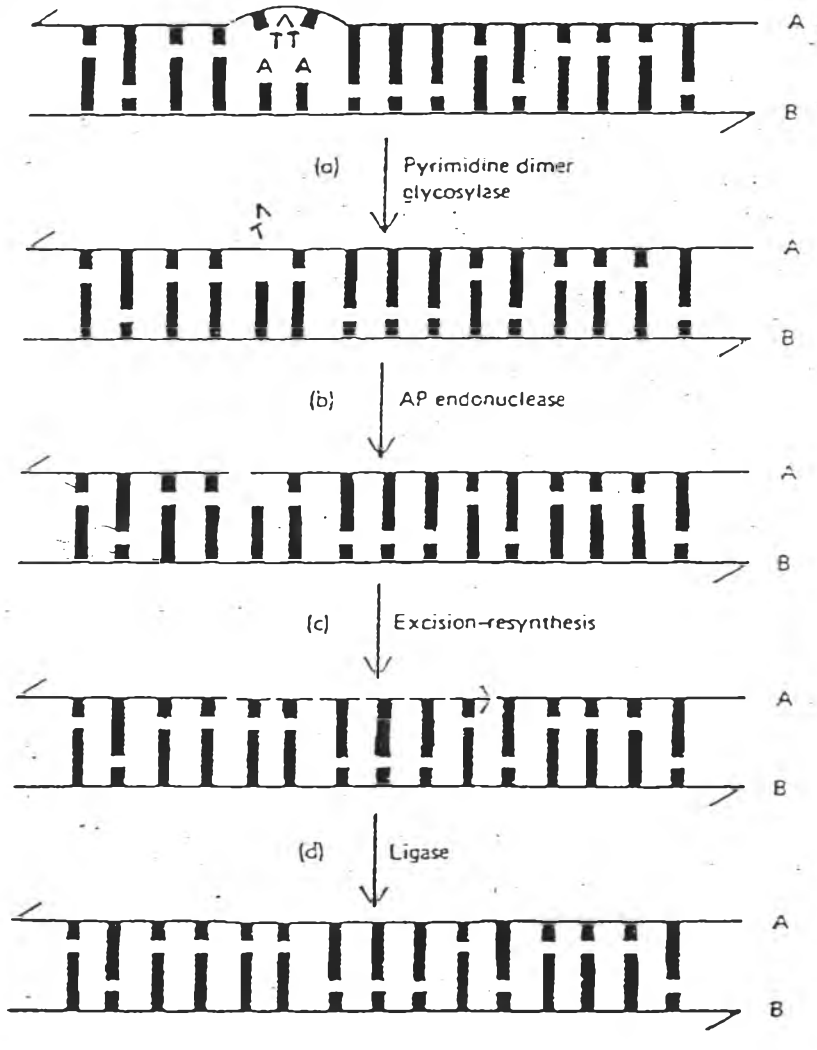
X = mutant DNA sequence

ปรากฏการณ์ที่ทำให้การเกิดไดเมอร์กลับคืนสู่สภาพปกติได้ โดย visible light (ช่วงความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร) เช่น แสงแดด แสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ เรียกว่า Photoreactivation (รูปที่ 3) ต้องอาศัยเอนไซม์ซึ่งทำงานโดยมีแสงเป็นตัวกระตุ้น ไปตัดไดเมอร์ให้ขาดออกจากกัน กลายเป็นโมโนเมอร์ของเบสไพริมิดีน ไดเมอร์มากกว่า 80 % ที่เกิดจากแสงอุลตราไวโอเลตจะสามารถเกิด Photoreactivation ได้ ระบบการซ่อมแซมนี้จะไม่มีการผิดพลาด ถ้าเกิดปรากฏการณ์ดังกล่าว จะไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ได้เลย ดังนั้นในการทดลองเพื่อกลายพันธุ์จุลชีพ ต้องหยายามไม่ให้สปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต ถูกแสงที่มีความยาวคลื่นในช่วง visible light ทันที โดยอาจทำการทดลองภายใต้หลอดไฟสีเหลือง และบ่มเลี้ยงในที่มืด (Hopwood,1970 และ โชตนา ประมวลวัลลิกุล, 2534)



รูปที่ 3 ปรากฏการณ์ Photoreactivation ซ่อมแซมการเกิดไดเมอร์ที่เกิดจากการฉายแสงอุลตราไวโอเลต (Goodenough, 1984)

การซ่อมแซมซึ่งยังผลให้เกิดกลายพันธุ์ลดลงอีกวิธีหนึ่งคือการซ่อมแซมแบบ Excision (รูปที่ 4) โดย thymine dimer จะถูกตัดออกจากดีเอนเอโดยเอนไซม์ Endonuclease เกิดเป็นช่องว่างก่อนหน้าตำแหน่งที่เกิดไดเมอร์ และมีการเติมเบสให้เต็มด้วยดีเอนเอโพลิเมอร์เรส โดยใช้ดีเอนเอสายสมบูรณ์เป็นแม่แบบ ดังนั้นจึงได้สายดีเอนเอที่เป็นปกติและการกลายพันธุ์จะลดจำนวนลง ดังนั้น เชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลตมีโอกาสเกิดการย้อนกลับ (reverse) เป็นสายพันธุ์เดิม หรือมีประสิทธิภาพในการผลิตสารที่ต้องการต่ำลงได้ เมื่อผ่านการเลี้ยงเป็นเวลานานๆ



รูปที่ 4 การซ่อมแซมแบบ Excision ในจุลชีพที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต (Goodenough, 1984)

ประสิทธิภาพการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต ขึ้นอยู่กับความเข้มแสง ระยะเวลาที่ได้รับแสง ระยะห่างระหว่างแหล่งแสงกับจุลชีพ ชนิดและจำนวนของจุลชีพ รวมทั้งสภาพการเจริญของจุลชีพ เป็นต้น แสงอุลตราไวโอเลตที่นิยมใช้ มักมีความยาวคลื่นประมาณ 254 นาโนเมตร ระยะเวลาการฉายแสงตั้งแต่ 30 วินาทีถึง 20 นาที ขึ้นกับชนิดของจุลชีพ โดยมีระยะห่างระหว่างแหล่งแสงกับจุลชีพ 20 เซนติเมตรขึ้นไป พบว่าจุลชีพที่เกิดการกลายพันธุ์ได้มาก อยู่ในช่วงที่มีเปอร์เซนต์รอดของสปอร์ 0.01-5 % (Miller, 1972; Fantini,1975) เปอร์เซนต์รอดที่ได้จะต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเวลาที่ใช้ในการฉายแสง นอกจากนั้น ความร้อนที่เกิดจากการฉายแสง จะมีส่วนทำให้จุลชีพอ่อนแอ และค่าเปอร์เซนต์รอดที่ได้น้อยกว่าค่าที่ควรเป็นจริง ในระหว่างการฉายแสงควรมีการกวนตลอดเวลา เพื่อให้แสงผ่านสปอร์อย่างทั่วถึง การควบคุมแสงจะทำโดย เปิดปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใส่สปอร์อยู่ จะไม่ใช้วิธีเปิดปิดหลอดแสงอุลตราไวโอเลต (Fantini, 1975)

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต มักนิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ครั้งแรกกับจุลชีพ เมื่อคัดเลือกได้จุลชีพสายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงขึ้น และผ่านการถ่ายเชื้อเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดการย้อนกลับได้ ดังนั้น จึงควรนำเชื้อที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอุลตราไวโอเลต มาชักนำให้กลายพันธุ์ซ้ำอีก โดยสลับกับสารชักนำตัวอื่นๆ เช่น NTG, EMS เป็นต้น (Calam, 1970 ; Sikyta, 1975)

2. สารเคมี (Chemical mutagen) แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามลักษณะการทำงาน คือ

2.1 กลุ่ม Alkylating agents

เป็นสารเคมีกลุ่มที่ทำให้เบสบนสายดีเอนเอ 1 ตัว หรือมากกว่านั้น มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมี สารกลุ่มนี้จะมีผลต่อเบสในกลุ่มพิวรีน โดยเฉพาะ กวานีน สารดังกล่าว ได้แก่ nitrous acid, EMS (ethylmethane -sulfonate), MMS (methylmethanesulfonate) และ NTG เป็นต้น

2.2 กลุ่ม Base analogs

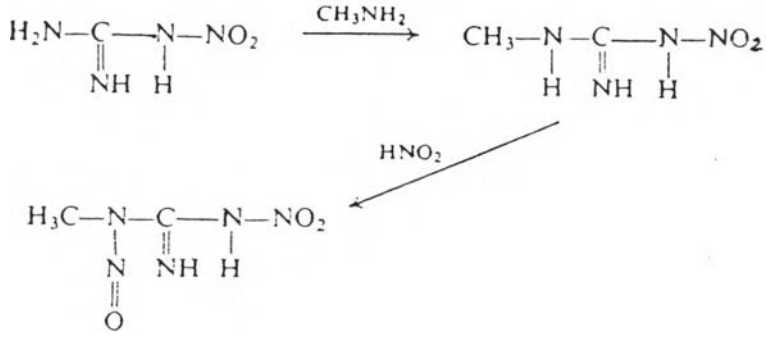
เป็นสารกลุ่มที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับเบสในธรรมชาติ ต่างกันที่การจัดเรียงตัวของไฮโดรเจน เมื่อมีสารเหล่านี้อยู่ในขณะที่มีการจำลองดีเอนเอ จะทำให้เกิดการจำลองตัวผิด โดยนำสารเหล่านี้เข้าไปแทนที่เบส ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสายดีเอนเอ สารเหล่านี้ได้แก่ 5-Bu (5-bromouracil), 2-AP (2-aminopurine) เป็นต้น

2.3 กลุ่ม Frameshift mutagen

สารเคมีในกลุ่มนี้ จะทำให้เบสบนสายดีเอนเอ เพิ่มขึ้นหรือหายไป 1-2 เบส ในระหว่างการจำลองตัว หรือซ่อมแซมดีเอนเอ สารดังกล่าวได้แก่ acridine IRC compounds

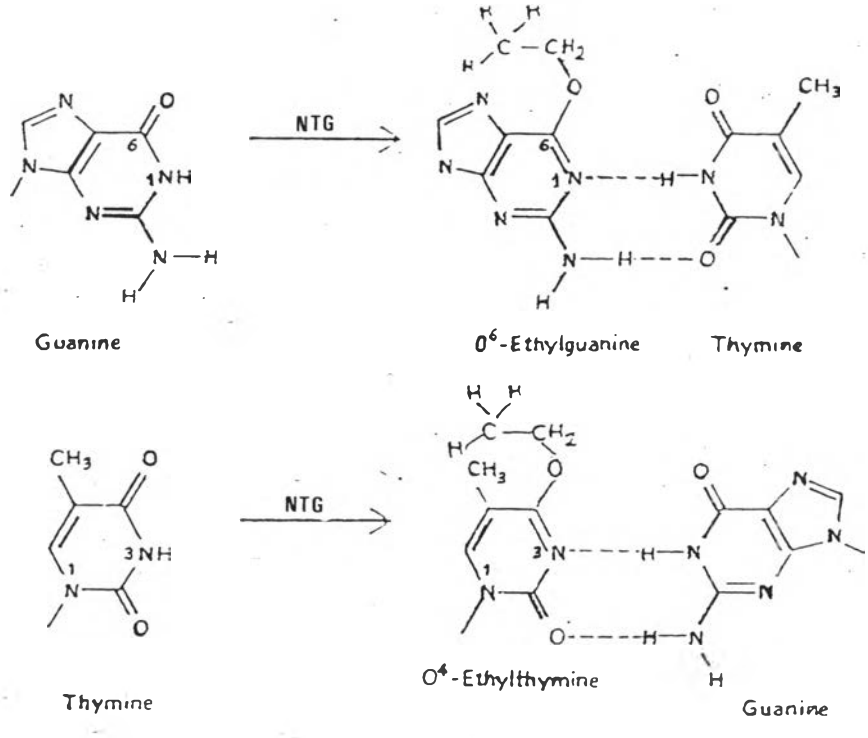
กลุ่มของสารเคมีที่มีผลต่อดีเอนเอและนิยมนำมาใช้ในการกลายพันธุ์ ทั้งในแบคทีเรียและรา คือ NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine) เป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ นิยมใช้เป็นสารกลายพันธุ์ในขั้นที่สอง (secondary mutation) (Miller, 1972) มีการใช้ NTG กลายพันธุ์ในจุลชีพหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย (Cutting and Horn, 1990) ยีสต์ *Saccharomyces* (Mori, 1972) รา *Aspergillus niger* (Gunde-Cimerman et al., 1986)และ *Penicillium sp.* (Lachke et al., 1986) เป็นต้น โดยสารเคมี NTG จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ transition, transversion, deleion หรือ frameshift mutation (Fantini, 1975)

NTG เป็นสารประกอบทางเคมี ที่สังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยา nitrosation ของ methylnitroguanidine มีสูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ และโครงสร้างดังรูปที่ 5 NTG มีน้ำหนักโมเลกุล 147.10 มีลักษณะเป็นผลึกสีเหลือง ละลายน้ำได้สูงสุด 4 มก.ต่อมล. จุดหลอมเหลว 118 °ซ สามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่าง 6.0-9.0 แต่มีความเสถียรในภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด



รูปที่ 5 การสังเคราะห์และโครงสร้างของสาร NTG

การทำงานของ NTG ต้องมีการแตกตัวจึงจะสามารถเป็นสารชักนำการกลายพันธุ์ได้ สารเคมี NTG สามารถแตกตัวเป็น nitrous acid ในสภาวะที่เป็นกรด และแตกตัวเป็น diazomethane (CH_2N_2) ในสภาวะที่เป็นด่าง ทำปฏิกิริยาโดยชักนำให้เกิดการเติมหมู่อัลคิล 1 หมู่ให้กับเบส แล้วชักนำให้คู่เบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้ามาอยู่แทนที่คู่เบสปกติในระหว่างการจำลองตัวเอง ทำให้เบสบนสายดีเอนเอเกิดการเปลี่ยนแปลงไป การเติมหมู่อัลคิลจะเกิดที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจนของเบสแต่ละชนิด เช่น ตำแหน่ง O^6 ของเบสกวานีน และตำแหน่ง O^4 ของเบสไทมีน ดังรูปที่ 6 (Goodenough, 1984) การเคลื่อนย้ายของหมู่อัลคิล มีผลโดยตรงต่อการจับคู่ผิด และมีผลทางอ้อมต่อการซ่อมแซมดีเอนเอผิดไป 90% ของการกลายพันธุ์ด้วย NTG มักเกิด GC —> AT transition การชักนำโดยสาร NTG ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่างขณะทำปฏิกิริยา เชื่อว่าสาร NTG จะเข้าไปจับกับดีเอนเอที่กำลังจำลองตัวในช่วง replication fork ซึ่งทำให้สาร NTG มีประสิทธิภาพมากที่สุดกับเซลที่กำลังมีการแบ่งตัว (Miller, 1972 ; Carlton and Brown, 1981 ; โชตนา ประมวลวัลลิกุล, 2534)



รูปที่ 6 การเติมหมู่อัลคิลที่ตำแหน่ง O^6 ของเบสกวานีน และที่ตำแหน่ง O^4 ของเบสไทมีน โดยสาร NTG

จากการศึกษาพบว่า สาร NTG เป็นที่นิยมใช้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เนื่องจากให้ความถี่ของการกลายพันธุ์สูง ในขณะที่มีการตายน้อย พบว่า มีสปอร์ที่กลายพันธุ์แล้วเป็นจำนวนมากที่ช่วงความเข้มข้นของ NTG ซึ่งให้เปอร์เซนต์รอดอยู่ระหว่าง 0-50 % (Miller,1972; Fantini, 1975) ปัจจัยสำคัญของการใช้ NTG เป็นสารชักนำคือ ความเข้มข้นของ NTG ความเข้มข้นยิ่งมาก เปอร์เซนต์รอดของสปอร์ยิ่งต่ำลง

การปรับปรุงสายพันธุ์ราในกลุ่ม *Penicillium sp.* มีการใช้แสงอุลตราไวโอเลตและสาร NTG เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น Joglekar และ Karanth (1984) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Penicillium funiculosum* โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลตเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า โคโลนีหมายเลข 49 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม สามารถใช้ยูเรียและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้

Hoffman และ Wood (1985) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *P. funiculosum* IMI 87160iii โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต พบว่า เชื้อกลายพันธุ์ C22c สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา saccharification ในฟาง และมีประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

Brown และคณะ (1987) ได้ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา *P. pinophilum* เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเบต้า-ไกลโคซิเดส โดยใช้สายพันธุ์ที่ผ่านการฉายแสงอุลตราไวโอเลต มากลายพันธุ์ซ้ำด้วยสาร NTG ความเข้มข้น 0.1 มก.ต่อมล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 60 นาที พบว่าสายพันธุ์ใหม่ที่ได้ สามารถผลิตเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากสายพันธุ์เดิมอย่างเห็นได้ชัด

โชตนา ประมวลวัลลิกุล (2534) ได้ใช้แสงอุลตราไวโอเลต และสาร NTG ปรับปรุงสายพันธุ์รา *P. chrysogenum* เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนนิซิลิน จี พบว่า สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเพนนิซิลิน จี เพิ่มขึ้นจากสายพันธุ์เดิม 3.84 เท่า

ในการวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะทำการปรับปรุงเชื้อราสายพันธุ์ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอุลตราไวโอเลต และสารเคมี NTG คัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิต เอนไซม์เดกซ์แทรนเนส เพิ่มมากขึ้น โดยมีความเสถียรทางพันธุกรรมเพื่อพัฒนาไปใช้ในการผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสในระดับขยายส่วนต่อไป อย่างไรก็ดีการกลายพันธุ์ด้วยสารชักนำทั้ง 2 ชนิด มีอันตรายและข้อควรระวังมาก (ภาคผนวก ง.) เนื่องจากสารกลายพันธุ์มักเป็นสารที่ก่อมะเร็งด้วย จึงต้องทำการทดลองด้วยความระมัดระวัง