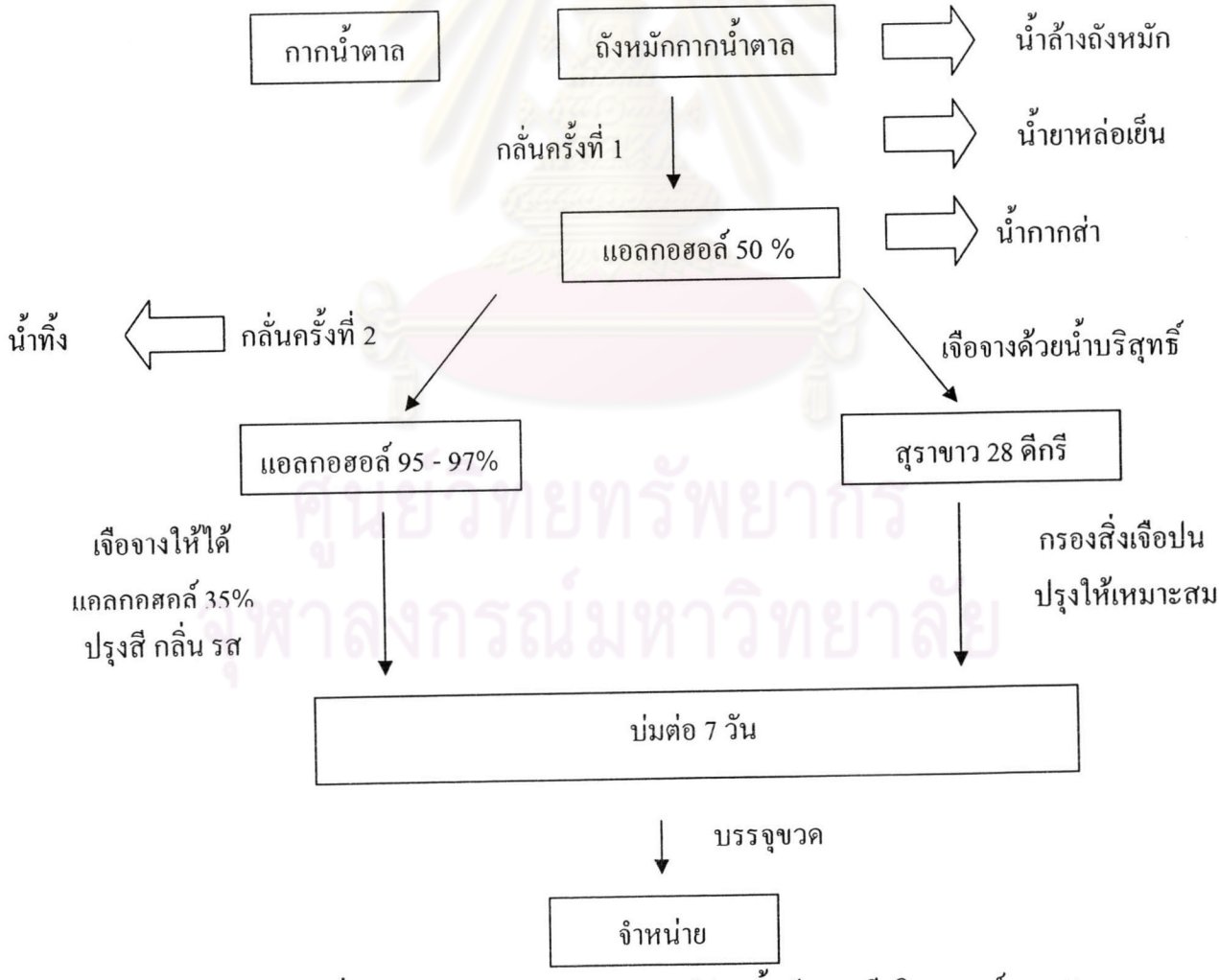
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. น้ำกากส่า

คุณสมบัติโดยทั่วไป

น้ำกากส่าเป็นของเหลวที่เหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ หรือสุราซึ่งมีกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ กากน้ำตาลนี้เป็นผลผลิตเหลือจากการผลิตของโรงงานน้ำตาล ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่สามารถตกผลึกต่อไปได้อีก เมื่อกากน้ำตาลถูกหมักจนได้เอทิลแอลกอฮอล์ออกมาแล้วจะถูกนำไปกลั่นเพื่อแยกแอลกอฮอล์ออกมา ซึ่งจะทำให้ได้น้ำกากส่าออกมาเป็นของเสียด้วย ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยจะมีปริมาณน้ำกากส่าเกิดขึ้น 10 - 15 ลิตรต่อการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ 1 ลิตร (Kumar และคณะ, 1998)



รูปที่ 1 กรรมวิธีการผลิตสุราและจุดปล่อยน้ำเสีย (มาลี วิศวาจารย์, 2530)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

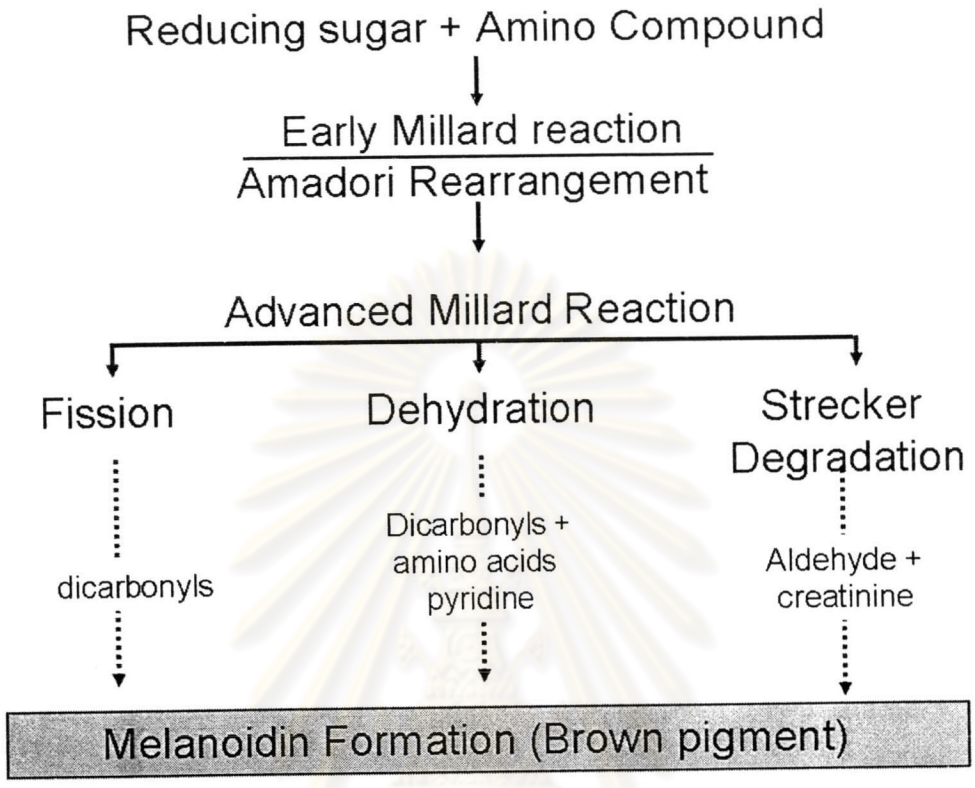
ตารางที่ 1 สมบัติทางเคมีของน้ำกากส่าจากโรงบำบัดน้ำเสียโรงงานแสงโสม ก่อนและหลังการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ จ. นครปฐม (Sirianantapiboon, Phothilangka และ Ohmomo, 2004)

คุณสมบัติทางเคมี	U-MWW	An-MWW	% Removal
pH	4.8 ± 0.3	8.2 ± 0.7	-
BOD_5(mg/l)	30,000 ± 124	3,000 ± 178	90.0 ± 3.42
COD(mg/l)	100,000 ± 1648	54,000 ± 774	46.0 ± 4.71
TKN as N (mg/l)	1,500 ± 39.7	1,250 ± 225	20.7 ± 1.07
Phosphorous as P(mg/l)	150 ± 1.86	70 ± 0.69	47.0 ± 3.55
Total solid (mg/l)	110,000 ± 981	45,000 ± 658	59.1 ± 3.28
Potassium (mg/l)	6,000 ± 33.1	6,000 ±72.7	-
Reducing sugar (%)	1.4 ± 0.4	0.4 ± 0.06	82.4 ± 2.85
Color intensity(A_{475})	84.4 ± 19.4	78.2 ± 21.1	7.3 ± 0.26

U-MWW หมายถึง น้ำกากส่าที่ไม่ผ่านการบำบัด An – MWW หมายถึง น้ำกากส่าที่ผ่านการบำบัดด้วยกระบวนการแบบไม่ใช้อากาศ % Removal หมายถึง เปอร์เซ็นต์การลดสมบัติทางเคมีที่ผ่านกระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าโรงบำบัดน้ำเสียของโรงงานสุราแสงโสม ซึ่งใช้กระบวนการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศน้ำสามารถลดค่าบีโอดี ซีโอดี และปริมาณสารต่าง ๆ ในน้ำกากส่าได้เป็นอย่างดี แต่ลดความเข้มของสีของน้ำเสีย (A_{475}) ได้เพียง 7.3 % เท่านั้น

สีน้ำตาลเข้มในน้ำกากส่าเกิดจากการควบแน่นของน้ำตาลและกรดอะมิโนโดยกระบวนการมิลลาร์ด (Millard reaction) เรียกว่า เมลานอยดิน (Melanoidin) (Migo และคณะ, 1993) ดังรูปที่ 2 ซึ่งถ้าปล่อยลงสู่แหล่งน้ำก็จะทำให้เกิดการบดบังแสงอาทิตย์ที่ส่องผ่านลงสู่แหล่งน้ำทำให้พืชและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น ๆ ไม่สามารถเกิดกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงได้



รูปที่ 2 ปฏิกิริยา Millard reaction

แหล่งที่มา: http://www.landfood.ubc.ca

การบำบัดน้ำกากส่า

จากคุณสมบัติทางเคมีของน้ำกากส่าดังตารางที่ 1 มีคุณสมบัติไม่ผ่านค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งตามประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ก่อให้เกิดมลภาวะต่อระบบนิเวศแหล่งน้ำ อาทิ ปริมาณของออกซิเจนในน้ำลดลงเนื่องจากมีสารประกอบอินทรีย์มีปริมาณสูง (ค่า BOD หรือ COD สูง) สีของน้ำทิ้งเข้ม หรือมีความขุ่นมาก จะขัดขวางการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืชน้ำและแพลงก์ตอน ปริมาณของสารแขวนลอยรวมถึงสารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ ทำให้สภาพของแหล่งน้ำปนเปื้อนและอาจเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต และไม่สามารถนำมาใช้อุปโภคบริโภคได้ จึงจำเป็นต้องมีการบำบัดเสียก่อนจะปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งการบำบัดน้ำเสียสามารถแบ่งได้ดังต่อไปนี้ (ปราณี พันธุมสินชัย, 2539)

1. การบำบัดทางกายภาพ ได้แก่ การแยกสารที่เป็นของแข็งออกจากน้ำเสียโดยวิธีทางกายภาพ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงธรรมชาติของสารที่ถูกกำจัดออก เช่น การกรอง การตกตะกอน การแยกด้วยแรงหมุนเหวี่ยง (centrifugation)

2. การบำบัดทางเคมี ได้แก่การกำจัดสารโดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี สารใหม่ที่ได้จะมีความเป็นพิษน้อยลง หรือเปลี่ยนรูปเป็นสารอื่นที่สามารถกำจัดได้ง่ายขึ้น เช่น การใช้ polyferric hydroxysulfate ในการลดสีของน้ำกากส่าชนิดต่าง ๆ (Migo และคณะ, 1993) โดยสามารถลดสีของน้ำกากส่าสดได้ถึง 32% และลดสีของน้ำกากส่าที่ผ่านระบบ biodigester และ lagoon effiuent ได้ถึง 87% และ 94% ตามลำดับ

3. การบำบัดทางกายภาพและเคมี ได้แก่ การใช้คุณสมบัติทางกายภาพและปฏิกิริยาทางเคมีรวมกัน เช่น การดูดด้วยถ่าน การแลกเปลี่ยนประจุ

4. การบำบัดทางชีวภาพ โดยใช้จุลินทรีย์ต่าง ๆ มาย่อยสลายสารอินทรีย์ และแร่ธาตุบางอย่างออกจากน้ำเสีย สำหรับการบำบัดน้ำกากส่าโดยวิธีทางชีวภาพนั้น มีผู้สนใจศึกษาวิจัยดังต่อไปนี้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสีของน้ำกากส่าโดยเชื้อจุลินทรีย์

การกำจัดสีของน้ำกากส่าโดยแบคทีเรีย เช่นงานวิจัยของ Sirianuntapiboon Phothilangka และ Ohmomo (2004) ได้คัดเลือก acetogenic bacteria สายพันธุ์ BP103 ซึ่งสามารถลดสีของน้ำกากส่าได้ 76.4% ภายในเวลา 5 วัน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ประกอบด้วย 3% glucose 0.5% yeast extract 0.1% KH_2PO_4 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ และมีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.0

การกำจัดสีของน้ำกากส่าโดยยีสต์ เช่น งานวิจัยของพงษ์เทพ บวรยรรยง (2545)ในการคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดน้ำกากส่า โดยใช้น้ำกากส่าเข้มข้น 10% ในการทดลองและได้ยีสต์สายพันธุ์ YM50 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการลดสีสูงสุด YM50 สามารถลดสีของน้ำกากส่าที่ปรับสภาวะที่เหมาะสมและที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ได้ 32.50% ในวันที่ 5 และ 23.16% ในวันที่ 1 สำหรับน้ำกากส่าที่ปรับสภาวะที่เหมาะสมแต่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

Sirianuntapiboon Zohsalam และ Ohmomo (2003) ได้ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์205 สายพันธุ์จากผลไม้ไทย พบว่า สายพันธุ์ WR-43-6 สามารถลดสีของน้ำกากส่าสดได้สูงที่สุดคือ 68.91% อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน โดยมีกลูโคส 2% โซเดียมไนเตรท 0.1% และ KH_2PO_4 0.1% และเมื่อทำการลดสีต่อเนื่อง โดยการเปลี่ยนเชื้อทุก ๆ 7 วันเป็นเวลา 4 ครั้ง พบว่ายังมีความสามารถในการลดสีคงที่ 75%

การกำจัดสีของน้ำกากส่าโดยรา มีผู้สนใจเป็นจำนวนมาก ได้แก่ สันทัด ศิริอนันต์ไพบูลย์ (2528) ศึกษาวิจัยในเรื่องการคัดเลือกราเพื่อใช้ในการฟอกสีของน้ำกากส่าโดยทำการคัดเลือกเชื้อจากดินและน้ำในประเทศไทย โดยเฉพาะโรงงานสุรา พบว่า มี 9 สายพันธุ์ที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้มากกว่า 50% โดยสายพันธุ์ D90 สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้ดีที่สุดถึง 93% เมื่อปรับ

ภาวะที่เหมาะสมด้วยการเติมกลูโคส 2.5% และ yeast extract 0.2% pH 6.0 และมีเชื้อเริ่มต้นไม่ต่ำกว่า 0.15% ภายในเวลา 10 วัน

Miranda และคณะ (1996) สนใจ *Aspergillus niger* ที่สามารถกำจัดสีของน้ำกากส่าที่ผ่านการบำบัดแบบ anaerobic – aerobic แล้ว โดย *A. niger* สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้ 69% และลดค่า COD 75% ภายในเวลา 3-4 วันในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส 10 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรท 1.8 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และมีความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5 .0

Benito Miranda และ Santos (1997) ศึกษาการลดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานสุรา โดยใช้ *Trametes versicolor* และในอาหารที่ประกอบด้วย 10 g/l sucrose 1.8 g/l NH_4NO_3 1 g/l KH_2PO_4 0.5 g/l $MgSO_4.7H_2O$ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 พบว่าสามารถกำจัดสีได้สูงถึง 82% ลดค่า COD ได้ 77% และลดปริมาณแอมโมเนียมไอออนได้ 36 %

Kumar และคณะ (1998) สนใจรา 4 ชนิด ได้แก่ *Phanerochate chrysosporium Mycelia sterilia Coriolus versicolor* และ *Geotrichum candidum* พบว่ามีเพียง *P. chrysosporium* และ *C. versicolor* ที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าที่เจือจางอยู่ 12.5% ในอาหารที่มี 3-5% กลูโคส ความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 5 อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส สามารถลดสีได้ 53.5% และ 71.5% ตามลำดับ

Dahiya Singh และ Nigam (2001) พบว่า *P. chrysosporium* JAG-40 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบริเวณโรงงานน้ำตาล สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้สูงถึง 80% ภายในเวลา 6 วัน ภายใต้สภาวะการเติมอากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ประกอบด้วย 5% glucose 0.003% $MnSO_4.4H_2O$ 0.1% $NaNO_3$ 0.1% KH_2PO_4 0.5 % $MgSO_4.7H_2O$ 0.03% Betaine และน้ำประปา

Raghukumar และคณะ (2004) ศึกษาการลดสีของน้ำกากส่าโดยใช้ราไวท์รอท *Flavodon flavas* ที่ตรึงด้วย polyurethane foam ในสามารถลดสีของน้ำกากส่าเข้มข้น 10% ได้ 60% และ 73% โดยใช้เวลา 5 และ 7 วันตามลำดับ

จากงานวิจัยดังที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่ารามักจะถูกนำใช้ในการลดสีของน้ำกากส่า มากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะราไวต์รอท ซึ่งมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสารที่ย่อยสลายได้ยาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. มิวเทชัน (Mutation)

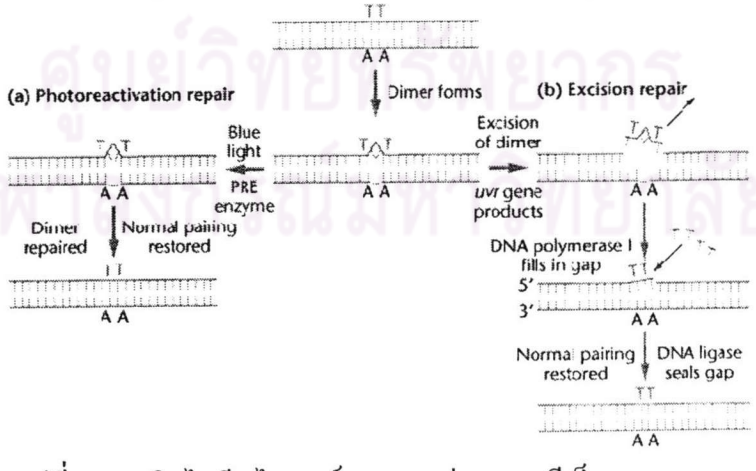
หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม ทำให้โครงสร้างของสารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป และสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นถัดไป

2.1 ชนิดของมิวเทชัน

การเกิดมิวเทชันสามารถแบ่งได้ตามลักษณะของการเกิดมิวเทชันได้เป็น 2 ชนิด คือ 1. มิวเทชันที่เกิดขึ้นเอง (Spontaneous mutation) เป็นผลมาจากรังสี สารเคมี หรืออุณหภูมิที่มีอยู่ตามธรรมชาติ สามารถกระตุ้นให้สารพันธุกรรมมีการเปลี่ยนแปลงไปจนเกิด มิวเทชันขึ้นได้ แต่มีอัตราการเกิดมิวเทชันที่ต่ำมาก เช่น *E. coli* มีอัตราการเกิดมิวเทชัน 2×10^{-6} ต่อยีน ในแมลงหวี่ มีอัตราการเกิดมิวเทชัน 3×10^{-5} เป็นต้น

2. การชักนำให้เกิดมิวเทชัน (Induced mutation) เกิดจากมิวทาเจนชักนำให้สารพันธุกรรมเกิดมิวเทชันในอัตราที่สูงมากขึ้น มิวทาเจนเหล่านั้นได้แก่ รังสี และสารเคมี มีกลไกในการชักนำให้เกิดมิวเทชันแตกต่างกันไป ดังต่อไปนี้

2.1.รังสี แบ่งเป็น 2 ประเภทได้แก่ รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน เช่นรังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา นิวตรอน รังสีเหล่านี้มีพลังงานสูง มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่าง ๆ ได้ ส่งผลให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม และโครมาติด เกิดมิวเทชันขึ้น และรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต เป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำ สามารถทะลุผ่านเนื้อเยื่อบาง ๆ ได้ และก่อให้เกิดมิวเทชันโดยดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตสามารถดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตสูงสุดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำให้เกิดไพริมิดีนไดเมอร์ขึ้น ส่งผลให้มีการยับยั้งกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอและเกิดความผิดพลาดเกิดขึ้นขณะที่มีการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอ



รูปที่ 3 การเกิดไทมีนไดเมอร์ และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ

รังสีอัลตราไวโอเลตและการซ่อมแซมตัวเอง

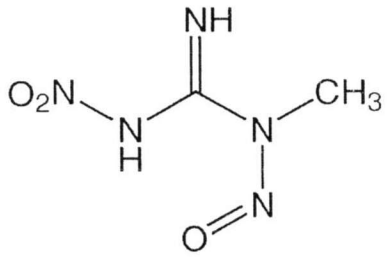
รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet: UV) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามขนาดของความยาวคลื่น คือ UV-A (320 nm-visible) UV-B (290-320 nm) และ UV-C (180-290 nm) โดย UV-B ซึ่งเป็นช่วงคลื่นที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดมิวเทชัน เนื่องจากมีพลังงานมากพอที่จะชักนำให้เกิดมิวเทชันและไม่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตาย เมื่อดีเอ็นเอได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต จะมีการดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเลตทำให้เกิดพันธะเคมีที่ผิดปกติระหว่างเบสไพริมิดีนที่อยู่ติดกัน ส่งผลให้เกิดเป็นไพริมิดีนไดเมอร์ (pyrimidine dimer) ซึ่งส่วนใหญ่พบว่ามักจะเกิดเป็นไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) มากกว่าไซโตซีน เมื่อเกิดไทมีนไดเมอร์ขึ้น จะเกิดการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอ โดยมี 2 กลไกที่เกี่ยวข้อง คือ

1. Photoreactivation เป็นกระบวนการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอเมื่อเกิดไทมีนไดเมอร์ โดยแสงจะไปกระตุ้นเอนไซม์ DNA photolyase ให้เกิดการทำงานโดยเข้าไปทำลายพันธะของไทมีนไดเมอร์ ทำให้เบสไทมีนสามารถเข้าคู่กับเบสอะดีนีนในสายตรงข้ามได้ตามปกติ ดังนั้นเมื่อเราต้องการชักนำจุลินทรีย์ให้เกิดมิวเทชันจึงจำเป็นต้องเก็บจุลินทรีย์ที่ผ่านรังสีอัลตราไวโอเลตไม่ให้ได้รับแสง เพื่อป้องกันกระบวนการ Photoreactivation

2. Excision Repair กลการซ่อมแซมดีเอ็นเอชนิดนี้ไม่จำเป็นต้องใช้แสงเป็นตัวกระตุ้น โดยจะประกอบด้วย 4 ขั้นตอน สรุปสั้น ๆ ว่า cut-patch-cut-seal โดยขั้นตอนแรกเอนไซม์ endonuclease จะจับกับไทมีนไดเมอร์และตัดพันธะระหว่างน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟส ในบริเวณก่อนที่จะถึงไดเมอร์ จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase I จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากปลายที่ถูกตัด 3'-OH โดยใช้อีกสายเป็นแม่พิมพ์ จากนั้นก็จะมีการเชื่อมกันของปลาย 3'-OH และ 5'-P โดยเอนไซม์ ligase ได้ดีเอ็นเอสายเดิม

2.2 สารเคมี ที่ก่อให้เกิดมิวเทชัน หรือ มิวทาเจน (mutagen) มีมากมายหลายชนิดและมีผลเกิดมิวเทชันแตกต่างกันออกไป บางชนิดนอกจากเป็นมิวทาเจนแล้วยังเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย (carcinogen) ด้วย

มิวทาเจนทางเคมี สามารถแบ่งได้เป็น 4 จำพวก ได้แก่ 1. สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่าง ๆ ในดีเอ็นเอ (base analogs) 2. สารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเบส เช่น nitrous acid 3. Intercalating agent เช่น ethidium bromide และ 4. Alkylating agent จะทำหน้าที่เติมหมู่อัลคิล เช่น เมทิล หรือเอทิลให้กับเบสบางชนิดในดีเอ็นเอ ทำให้มีโครงสร้างเปลี่ยนไป และทำให้เกิดการผิดพลาดในการจับคู่กัน ส่งผลให้เกิดเกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสแบบทรานซิชันได้ระหว่างที่มีการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ เช่น ethylmethanesulphonate (EMS) *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG)



รูปที่ 4 โครงสร้างของ *N* – methyl – *N'*- nitro –*N* – nitrosoguanidine: MNNG

กลไกการเกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG

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) หรือเกิดเติมหมู่เมทิลหรือเอทิลที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 4 (O_4) ของเบสไทมีน ทำให้ไทมีนที่มีหมู่เมทิล (O_4-methylthymine) นี้ จับคู่กับเบสกัวนีนได้ แทนที่จะจับกับเบสอะดีนีนได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นเมื่อเกิดกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ จึงทำให้มีการเปลี่ยน G-C เป็น T-A หรือ T-A เป็น G-C ซึ่งจัดว่าเป็นเกิดการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบสแบบทรานซิชัน

(ที่มา: http://web.mala.bc.ca/mhernand/BIOL336/Cp3OHmut.htm)

Survival curve

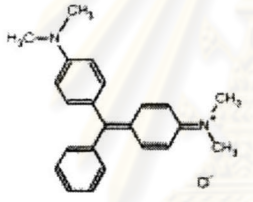
ในการศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเทชันในสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของมิวทาเจนและอัตราการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต (survival curve) ชนิดนั้น ๆ เพื่อหาปริมาณของมิวทาเจนที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดมิวเทชัน โดยทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างการได้รับมิวทาเจนและไม่ได้รับมิวทาเจน แล้วนับปริมาณสิ่งมีชีวิตที่สามารถมีชีวิตรอดภายหลังจากการได้รับมิวทาเจน จากนั้นเขียนกราฟ survival curve ซึ่งเมื่อปริมาณของมิวทาเจนเพิ่มขึ้น จำนวนของสิ่งมีชีวิตที่มีชีวิตรอดจะน้อยลง ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความไว (sensitive) ต่อมิวทาเจนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของมิวทาเจน และชนิดของสิ่งมีชีวิตและชนิดของส่วนที่นำมาชักนำให้เกิดมิวเทชัน เช่น ในการศึกษาการชักนำให้เกิดมิวเทชันในเห็ดฟาง *Volvariella volvacea* โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (Li และ Chang, 1991) โดยใช้เส้นใยและสปอร์มาทำการทำการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่า เส้นใยมีความไวต่อการได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตมากกว่าสปอร์ โดยที่การฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 60 วินาที มีอัตราการอยู่รอดของเส้นใย 10% และอัตราการอยู่รอดของสปอร์ 40% ในการชักนำให้เกิดมิวเทชันในจุลินทรีย์ส่วน

ใหญ่มักจะใช้มิวทาเจนที่ชักนำให้เกิดมิวเทชันที่ให้อัตราการอยู่รอดที่ต่ำกว่า 10% ซึ่งมักจะได้มิวแทนต์ที่ได้มีความแตกต่างจากสายพันธุ์เดิม (wild type) และมีความเสถียรภาพสูงในการถ่ายทอดลักษณะไปยังรุ่นถัดไปได้

การคัดเลือกมิวแทนต์ และ Resistance marker

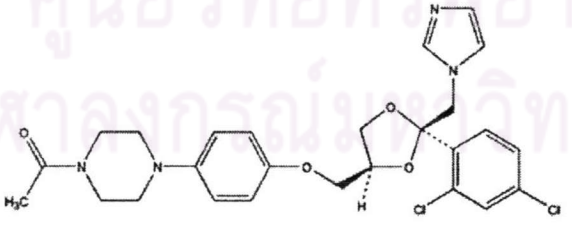
เมื่อเกิดการชักนำให้เกิดมิวเทชันขึ้น จำเป็นต้องคัดเลือกมิวแทนต์ที่เกิดขึ้น โดยวิธีต่าง ๆ เช่น Aim test การคัดเลือก auxotropic mutant ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมบ่งชี้มิวแทนต์ได้ นอกจากนี้ resistance marker ซึ่งสามารถทำการตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็วกว่า auxotrophic marker (Li and Chang, 1991) โดยคัดเลือกโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารยับยั้งการเจริญ เช่น คริสตัลไวโอเลต มาลาไชต์กรีน เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อไวด์ไทป์ที่ไม่สามารถเจริญได้

มาลาไชต์กรีน (Malachite green) จัดเป็น triphenylmethane dyes มีโครงสร้างดังรูปที่ 5 สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เข้าไปขัดขวางกระบวนการหายใจ และกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ สามารถใช้เป็นยาฆ่ารา แบคทีเรีย และใช้เป็นสีย้อมเซลล์



รูปที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของมาลาไชต์กรีน

คีโตโคนาโซล (ketoconazole) จัดเป็นสารต่อต้านราชนิดหนึ่ง (imidazole antifungal) ซึ่งประกอบด้วยวงแหวน 5 วงและมี ไนโตรเจน 2 อะตอม ดังรูปที่ 6 คีโตโคนาโซลจะทำหน้าที่ในการยับยั้งเอนไซม์ cytochrome P450 14a-deamethylase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้าง ergosterol



รูปที่ 6 โครงสร้างของคีโตโคนาโซล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การชักนำให้เกิดมิวเทชันในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์

การชักนำให้เกิดมิวเทชันในเชื้อจุลินทรีย์มีประโยชน์มากในการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคที่ยุ่งยากซับซ้อน และสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็ว ดังจะเห็นได้จากการศึกษาวิจัยในหลายประเทศเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตสารหลากหลายชนิด อาทิ

Iizuka และ Lin (1982) ศึกษาเกี่ยวกับการสร้างสารสีใน *Monascus kaoliang* โดยนำราชนิดนี้มาชักนำให้เกิดมิวเทชันหลายครั้งด้วยสาร MNNG สลับกับการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตจนกระทั่งได้มิวแทนต์ที่สามารถผลิตสารสีเหลืองและสีแดงเพิ่มขึ้นประมาณ100 เท่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์เดิม และมิวแทนต์ที่ได้มีสีแตกต่างกันไปตั้งแต่สีส้มจนแดงเข้ม

Kuhad Kumar และ Singh (1994) ได้ทำการชักนำ *Fusarium oxysporum* ให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ตามด้วยการชักนำด้วยสาร MNNG 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

Bapiraju และคณะ (2004) ศึกษาการเพิ่มการสร้างเอนไซม์ไลเพสโดยการชักนำให้เกิดมิวเทชันใน *Rhizopus* sp. โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตและสาร MNNG พบว่า มิวแทนต์ $BTUV_3$ ที่เกิดจากการชักนำด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตของสายพันธุ์ $BTNS_{12}$ สามารถสร้างเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น 110 % เมื่อเปรียบเทียบกับไวด์ไทป์ $BTNS_{12}$ และ เป็น 180 % เมื่อเปรียบเทียบกับไวด์ไทป์ $BTNS_{24}$ และมิวแทนต์ $BTNT_2$ สร้างเอนไซม์ไลเพส ได้สูงขึ้นถึง 232 % เมื่อเปรียบเทียบกับไวด์ไทป์ $BTNS_{24}$

Miura และคณะ (1997) ชักนำโปรโตพลาสของรา IZU-154 ให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ได้มิวแทนต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แมงกานีสเปอร์ออกซิเดส (MnP) ได้สูงขึ้นถึง 2 เท่า ในภาวะที่มีไนโตรเจนจำกัด

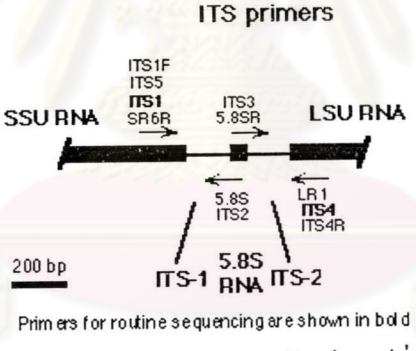
จะเห็นว่าการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสาร NTG นี้มีความสำคัญมากในการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ สามารถใช้ได้กับราหลายชนิด และไม่จำเพาะต่อกลุ่มของสารชนิดใดชนิดหนึ่ง และพบว่ายังไม่มีผู้ใดที่ทำการวิจัยโดยใช้การชักนำให้เกิดมิวเทชันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดสีของน้ำกากส่า ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์มุ่งเน้นการใช้การชักนำให้เกิดมิวเทชันโดยรังสีอัลตราไวโอเลต และสาร MNNG ในราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการลดสีของน้ำกากส่า

เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker)

ในการศึกษาความแตกต่างหรือแปรผันในสิ่งมีชีวิต นอกจากสังเกตความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา ซึ่งบางครั้งไม่สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่สนใจออกจากกันได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาความแตกต่างระหว่างไวด์ไทป์และมิวแทนต์ ซึ่งอาจจะไม่สามารถมองเห็นความแตกต่างด้วยตาเปล่าได้ แต่อย่างไรก็ดี การศึกษาความแตกต่างในระดับโมเลกุล หรือดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต อาจจะสามารถแยกความแตกต่างระหว่างไวด์ไทป์และมิวแทนต์ได้ เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมใช้ เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

RFLP เป็นเทคนิคหนึ่งในการศึกษาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยใช้ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) มีข้อดี คือสามารถวิเคราะห์จากดีเอ็นเอที่มาจากส่วนใดก็ได้ ทั้งในส่วนของยีนและไม่ใช่ยีนโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น

Internal Transcribed Spacer: ITS เป็นบริเวณดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง Ribosomal DNA ซึ่งไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน ดังรูปที่ 7 ITS นี้เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกเก็บรักษาไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง (conserved region) และมักใช้อย่างกว้างขวางในการจัดจำแนกในระดับสปีชีส์



รูปที่ 7 บริเวณของ ITS และชนิดของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย