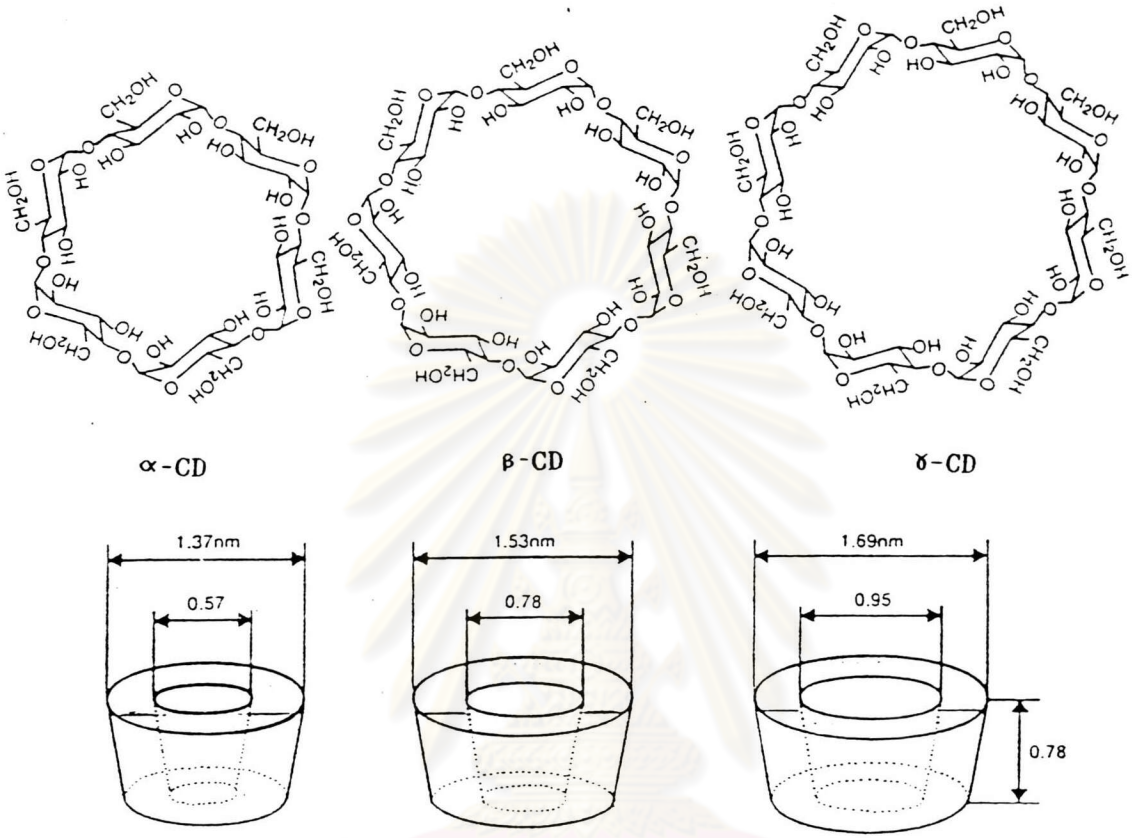
บทที่ 1

บทนำ

ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrins : CDs) เป็นสารประกอบที่รู้จักกันมานานกว่าร้อยปี โดยผู้ที่ค้นพบคนแรกคือ Villiers ในปีค.ศ.1891 (Schmid, 1988) CDs เป็น non reducing oligomer ของกลูโคส ที่ต่อด้วยพันธะ α- 1,4 glycosidic มีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวน CDs ที่สำคัญมี 3 ชนิดคือ α-CD β-CD และ γ-CD ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 6 7 และ 8 หน่วยตามลำดับ (รูปที่ 1) ตารางที่ 1 แสดงสมบัติของ CDs ที่ได้จากการศึกษาสมบัติทางเคมีและทางกายภาพ เมื่อพิจารณาโครงสร้างของ CDs จะพบว่าโพรงของ CDs มีสมบัติเป็น hydrophobic ล้อมรอบด้วยแถบที่มีสมบัติ hydrophilic (เนื่องจากหมู่ hydroxyl) ดังนั้น CDs จึงสามารถละลายน้ำได้และสามารถจับกับสารที่ไม่ละลายน้ำตัวอื่น เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ขึ้น ซึ่งทำให้คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของสารเหล่านั้นเปลี่ยนไป นอกจากนี้ CDs ยังมีค่าความเป็นพิษต่ำ จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้มีผู้นำ CDs มาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย เช่น อุตสาหกรรมยา อาหาร เครื่องสำอาง อุตสาหกรรมการเกษตร เคมีวิเคราะห์และการวินิจฉัยโรค (Hashimoto และคณะ, 1988; Schmid, 1989; Fromimgและคณะ, 1981) ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3 โดยจะใช้ CDs เป็นตัวช่วยปรับปรุงกลิ่นและรสของสารต่างๆ เป็น antioxidants ช่วยเพิ่มความเสถียรของสารประเภทสารระเหย (volatile compounds) ช่วยเปลี่ยนรูปของของเหลวให้เป็นรูปผงและช่วยในการละลายของสารประเภท hydrophobic เป็นต้น

ในจำนวน CDs ทั้ง 3 ชนิดที่เกิดในธรรมชาติ พบว่า CDs ที่มีความเสถียรมากที่สุดคือ β CD เพราะหมู่ hydroxyl ของ C_2 ของแต่ละ glucose unit สามารถที่จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ hydroxyl ของ C_3 ของ glucose unit ที่อยู่ติดกันได้ เกิดลักษณะที่



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1 โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-, β-, และ γ- ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สมบัติบางประการของไซโคลเดกซ์ทริน (Szejtli, 1988)

	α	β	γ
No. of glucose unit	6	7	8
Molecular weight	972	1135	1297
Solubility in water (g/100ml) at ambient temparature	14.5	1.85	23.2
Cavity diameter (A)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Crystal forms (from water)	hexagonal plate	monoclinic paralellogram	quadratic prisms
Crystal water wt. %	10.2	13.2-14.5	8.13-17.7
Diffusion const. 40°C	3,443	3,224	3,000
Hydrolysis by *A. oryzae* α-amylase	negligible	slow	rapid

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 การนำผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆใน ประเทศญี่ปุ่น ในช่วงปีค.ศ.1984-1987 (Hashimato, 1988)

ปี	อุตสาหกรรมเกษตร (ตัน)	อุตสาหกรรมยา (ตัน)	เครื่องสำอาง (ตัน)	อุตสาหกรรมทั่วไป (ตัน)	อื่นๆ (ตัน)	รวม (ตัน)
1984	16	33	2	15	10	76
1985	35	18	2	41	13	109
1986	20	31	11	50	28	145
1987	17	18	10	35	19	99

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

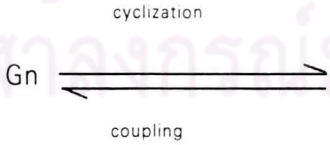
ตารางที่ 3 แสดงปริมาณการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในตลาดโลก (Schmid, 1989)

Application	Market (ton year^{-1})	
	1989	1995
Pharmaceutics	50	2000
Food	700	2500
Cosmetics	50	500
Agriculture	10	100
Chemical industry	30	300
Other purpose	10	200

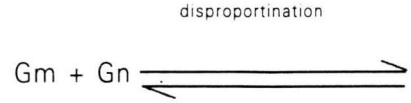
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรียกว่า secondary belt ของพันธะไฮโดรเจนทั้ง 7 พันธะ ซึ่งทำให้โมเลกุลของ β-CD เสถียรขึ้น ในขณะที่โมเลกุลของ α-CD มี glucose unit หนึ่งหน่วยอยู่ในตำแหน่งที่บิดงอ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนได้เพียง 4 พันธะจากทั้งหมดที่ควรจะเป็น 6 พันธะ ส่วนในกรณีของ γ-CD พบว่ามีขนาดของโพรงใหญ่ขึ้น ทำให้โมเลกุลของน้ำเข้าไปในโพรงมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความยืดหยุ่นมากขึ้น จากเหตุผลข้างต้นจะเห็นว่า β-CD มีความเสถียรมากที่สุด

จากประโยชน์ที่มีอย่างมากมายของ CDs ทำให้มีความต้องการในการใช้ CDs มาก แต่ CDs ยังผลิตได้น้อยและมีต้นทุนสูง การผลิต CDs ในปัจจุบันจะผลิตจากกระบวนการทางชีวภาพมากกว่าทางเคมีซึ่งมีความยุ่งยากมาก วิธีการทางชีวภาพที่ใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทริน คือการผลิตโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรส (cyclodextrin glycosyltransferase : CGTase ; E.C. 2.4.1.19) เป็นเอนไซม์เพียงตัวเดียวที่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็น CDs ได้ เอนไซม์ CGTase แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามชนิดของ CDs ที่เอนไซม์ผลิตได้เป็นส่วนใหญ่ (โดยปกติเอนไซม์ CGTase จะสามารถผลิต CDs ได้ทั้ง α-CD β-CD และ γ-CD) คือ α CGTase β CGTase และ γ CGTase จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ ทำให้แบ่งการทำงานของเอนไซม์ ออกได้เป็น 3 ส่วนคือ cyclization coupling และ disproportination (Bender, 1981) ดังแสดงในปฏิกิริยา ก. และ ข



(ก)



(ข)

Gm , Gn = α-1, 4-D-glucopyranosyl Chains

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

m, n, y = α-D-glucopyranosyl residues

cGx = cyclodextrin (x = 6, 7 หรือ 8)

โดยที่ปฏิกิริยา cyclization จะเป็นปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแป้งให้เป็น CDs ซึ่งจะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อสับเสรตเป็นโมเลกุลของกลูโคส 16-18 หน่วย แต่ถ้าหากว่าสับเสรตมีความยาวมากเกินไปจะเกิดปฏิกิริยา disproportination เพื่อตัดให้สับเสรตมีขนาดเล็กลงให้พอเหมาะกับการเกิดปฏิกิริยา cyclization และถ้าหากสับเสรตมีความยาวน้อยเกินไปก็จะเกิดปฏิกิริยา coupling เพื่อต่อสายกลูโคสให้ยาวขึ้น พอแก่การเกิดปฏิกิริยา cyclization และผลิตเป็น CDs ออกมา (ตารางที่ 4) การทำงานของเอนไซม์ CGTase ในการตัดสับเสรต (oligosaccharide) จะเหมือนกับการทำงานของ α-amylase คือจะตัดสับเสรตที่พันธะ α-1,4 glycosidic และทำให้เกิดเป็นปลาย non reducing ขึ้น (Macgregor และคณะ, 1993) ส่วนกลไกการเกิดปฏิกิริยา cyclization เอนไซม์ CGTase จะเข้าทำปฏิกิริยาทางด้านปลาย non reducing โดยจะเข้าจับกับกลูโคส 8-10 units จากนั้นจะตัดสับเสรตออกเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ขึ้น แล้วจะสร้างพันธะ α-1,4 glycosidic ขึ้นที่ปลายทั้ง 2 ข้างเกิดเป็นวงแหวน CDs ขึ้นมา

จากการศึกษาโครงสร้างตติยภูมิและลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ CGTase พบว่าทางปลายด้านอะมิโนของเอนไซม์ มีความคล้ายคลึง (homology) กับเอนไซม์ α-amylase มาก และปลายด้านหมู่คาร์บอกซิลก็จะเป็นส่วนที่พบเฉพาะในเอนไซม์ CGTase (Hofman และคณะ, 1989; Kimura และคณะ, 1989; Svensson และคณะ, 1989; Villette และคณะ, 1992) จากผลดังกล่าวทำให้เกิดข้อสมมุติฐานว่าปลายด้านอะมิโนของเอนไซม์ CGTase เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง (ตัดพันธะ α-1,4 glycosidic) และปลายคาร์บอกซิลเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการจับกับแป้ง (raw starch binding site) และการทำให้เกิดปฏิกิริยา cyclization ซึ่งเหมือนกับในเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้ตัวอื่นๆ ที่จะมีส่วนปลายอะมิโนที่ทำหน้าที่ในการตัดแป้งเช่นเดียวกัน (Eichel-Streiber และคณะ, 1992;

ตารางที่ 4 สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase

Reaction	Action
cyclization	starch $\longrightarrow$ cyclodextrins
coupling	cyclodextrin + glucose $\longrightarrow$ oligosaccharide terminated at the reducing end by the added glucose
disproportionation	$(\text{oligosaccharide})_m + (\text{oligosaccharide})_n \longrightarrow (\text{oligosaccharide})_{m+n}$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Itkov และคณะ, 1990)

เอนไซม์ CGTase เป็น inducible เอนไซม์โดยมีแป้งเป็นตัวชักนำ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Bacillus* (Bender, 1986; Kometani และคณะ, 1993) แบคทีเรียแต่ละชนิดที่ผลิตเอนไซม์จะผลิต CDs ทั้ง 3 ชนิดคือ α-CD β-CD และ γ-CD ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน (Horikoshi, 1984; Szejtli, 1988) ดังนั้นจึงสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกเป็น 3 กลุ่ม ตามชนิดของ CDs ที่ผลิตออกมาเป็นส่วนใหญ่ คือกลุ่ม α-CGTase กลุ่ม β-CGTase และกลุ่ม γ-CGTase ดังแสดงในตารางที่ 5 นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆจะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพแตกต่างกันเช่น Alkalophilic *Bacillus* sp. No.38-2 จะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีช่วง pH ที่เหมาะสม (optimum pH) กว้างคือที่ pH 4.6 7.0 และ 8.5 ส่วน *B. macerans* และ *B. megaterium* ผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่ pH 5.0-5.7 เอนไซม์ CGTase ส่วนมากจะทนอุณหภูมิได้สูงสุดประมาณ 50-60°ซ แต่เอนไซม์ที่ผลิตมาจาก *B. stearothermophilus* จะสามารถทนได้ถึง 70°ซ (Bender, 1986; Szejtli, 1988) คุณสมบัติของ CGTase ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆได้สรุปแสดงไว้ในตารางที่ 6

ในปัจจุบัน ทั้งๆที่ CDs มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ในทางด้านอุตสาหกรรมต่างๆดังกล่าวแล้วข้างต้น แต่ยังพบว่าการใช้ CDs ยังอยู่ในวงจำกัด เนื่องมาจากปัญหาที่ว่า CDs มีราคาแพง จึงได้มีผู้สนใจศึกษาวิธีการต่างๆเพื่อที่จะทำให้ผลผลิตของ CDs ได้มากขึ้น วิธีการหนึ่งก็คือ วิธีพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ในช่วงระยะที่ผ่านมาไม่กี่ปีมานี้ ได้มีการตื่นตัวในการโคลนยีน CGTase อย่างกว้างขวาง ซึ่งจะเห็นได้ชัดจากตารางที่ 7 ที่ได้รวมรวบข้อมูลเกี่ยวกับการโคลนยีน CGTase ในแบคทีเรียชนิดต่างๆเพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตโดยการอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม Paloheimo และคณะ ได้ทำการโคลนยีน CGTase จาก *B. circulans* ATCC 21783 แล้วใส่เข้าไปใน *B. subtilis* โดยครั้งแรกได้ใช้พลาสมิด pUB110 ปรากฏว่าการแสดงออกของยีน CGTase เพื่อผลิตเอนไซม์สามารถผลิตได้มากกว่าเดิมเพียง 1.2 เท่า แต่เมื่อตัดต่อเอาส่วน promoter

ตารางที่ 5 การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียตามชนิดของ CGTase

	แบคทีเรีย
กลุ่ม α CGTase	*Klebsiella oxytoca* M5a1
	Bacillus macerans
	Bacillus stearothermophilus
กลุ่ม β CGTase	*Bacillus circulans*
	Bacillus megaterium
	Bacillus ohbensis
	Micrococus sp.
	Alkalophilic *Bacillus* 38-2
	Alkalophilic *Bacillus* 17-1
	Alkalophilic *Bacillus* 1011
	Alkalophilic *Bacillus* 1-1
กลุ่ม γ CGTase	*Bacillus subtilis* No. 313
	Alkalophilic *Bacillus* 290-3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (Szejtli, 1988)

	Optimum pH	Optimum temp. °C	Mol. weight	Isoel. point	Stable pH	Stable temp. °C
B. macerans IFO 3490	5.0-5.7	55	65000	4.6	8.0-10.0	60
B. macerans IMA 1243	6.0	60	14500		5.5-9.5	50
B. macerans ATCC 8514	6.2		139300			
B. macerans CHINOIN	5.9	60	72000	4.45-4.65	5.0-8.0	60
B. megaterium	5.0-5.7	55	66000	6.07-6.80	7.0-10.0	55
B. strearothermophilus	5.0-5.5				5.5-8.8	70
B. circulans	6.0-6.5				7.5-9.0	60
Klebsiella pneumoniae	5.2				5.0-7.5	50
Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 38-2	4.5-9.0	45-50	85-88000	5.4	6.0-10.0	65
Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 17-1	5.0-9.0				6.5-10.0	
B. ohbensis	5.5					

ตารางที่ 7 Molecular cloning ของยีน CGTase

แบคทีเรีย	ชนิดของ CGTase	เซลล์เจ้าเรือน	ชื่อ plasmid ที่สร้างได้	ขนาด DNA insert (kb)	ORF * (kb)	เอกสารอ้างอิง
Klebsiella pneumoniae M5a1	α	*E.. coli*	pCM100	3.0	1.9	Binder และคณะ, 1986
Bacillus macerans	α	*B. brevis*	pHSB02 pHSB03	5.6	2.7	Takano และคณะ, 1992
Bacillus circulans Strain No.38-2	β	*E. coli*	pBC2	3.4	2.1	Nitchke และคณะ, 1990
Alkalophilic *Bacillus* sp. Strain No.38-2	β	*E. coli*	pCS8	5.3	3.0	Kaneko และคณะ, 1988
Alkalophilic *Bacillus* sp. Strain 1011	β	*E. coli*	pTUE217	5.3	2.5	Kimura และคณะ, 1989

ตารางที่ 7 (ต่อ)

แบคทีเรีย	ชนิดของ CGTase	เซลล์เจ้าเรือน	ชื่อ plasmid ที่สร้างได้	ขนาด DNA insert (kb)	ORF * (kb)	เอกสารอ้างอิง
Bacillus ohbensis	β	*B. subtilis*	pUP110Ce-CGT pUP110Ce-CGT deg Q	4.8	2.1	Sin และคณะ, 1992
Alkalophilic *Bacillus* sp. No.17-1	β	*E. coli*	pUCP1	5.5	2.9	Kanekoและคณะ, 1989
Bacillus circulans var. alkalophilus ATCC 21783	β	*B. subtilis*	pALK153 pALK156 pALK159	5.3	3.0	Paloheimo และคณะ, 1992
Bacillus subtilis No.313	γ	*E. coli*	pMT2	2.8	-	Kato และคณะ, 1989

ORF * = Open reading frame

ของ α-amylase มาใส่ในด้านหน้าของยีน ปรากฏว่าการผลิตเอนไซม์ CGTase เพิ่มเป็น 14 เท่าเมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า และเพิ่มเป็น 33 เท่าเมื่อเลี้ยงในถังหมัก (Paloheimo และคณะ, 1992) Kimura และคณะได้โคลนยีน CGTase จาก Alkalophilic *Bacillus* sp. strain 1011 มาใส่ในพลาสมิดของ *E. coli* พบว่าได้แอคติวิตีต่ำมาก จึงได้ทำการใส่ promotor เข้าไปในด้านหน้าของยีน โดยใช้ promotor 3 ชนิดคือ *lac* promotor *trp* promotor และ P_L promotor พบว่า *trp* promotor จะมีผลทำให้เกิดแอคติวิตีดีที่สุด โดยให้ถึง 5.5 เท่าของของเดิม (Kimura และคณะ, 1990) Georgia และคณะ ทำการทดลองโดยมีจุดประสงค์ที่จะเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเมื่ออยู่ในเซลล์เจ้าเรือนต่างๆ พบว่าเมื่ออยู่ใน *E. coli* จะให้แอคติวิตีมากกว่าของเดิมที่ผลิตโดย Alkalophilic *Bacillus* sp. no.38-2 ถึง 1.6 เท่า แต่เมื่อโคลนใส่ในเซลล์เจ้าเรือนที่เป็น *Bacillus* คือ *B. subtilis* กลับพบว่าได้แอคติวิตีต่ำกว่าเดิมมาก (Georgia และคณะ, 1991) Toshiya และคณะ ทำการโคลนยีน CGTase จาก *B. maceran* แล้วใส่ใน *B. subtilis* ผลปรากฏว่าได้แอคติวิตีต่ำกว่าเดิมมาก จึงได้เปลี่ยนเซลล์เจ้าเรือนเป็น *B. bravis* พบว่า CGTase ที่ผลิตมาจาก *B. bravis* จะสามารถผลิตได้มากกว่าใน *B. maceran* 2 เท่า และจะมากกว่าที่ผลิตมาจาก *B. subtilis* ถึง 200 เท่า (Toshiya และคณะ, 1991)

ในปีค.ศ. 1987 Pongsawasdi และ Yagisawa ทำการตรวจสอบสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิต เอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียที่แยกจากดินในแถบเอเชียอาคเนย์ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ *Bacillus* sp. A11 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง และเป็น β-CGTase ต่อมาวัลยาได้ศึกษาการเจริญและสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ CGTase พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ *Bacillus* sp. A11 คือที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 40°ซ และจากการทำเอสดีเอสโพลีอะคริลลาไมท์เจลอิเลคโทรโฟรีซีส พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตัน (วัลยา, 2534) และสุรศักดิ์ได้ทำการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ใส่ในเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM101 โดยใช้พลาสมิด pUC18 และ pSE411 ตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ว่า pCSBC5 และ pCSBC8 มีซิ้นดีเอ็นเอ

insert ขนาด 5.2 kb และ CDs ที่ผลิตได้จาก *E. coli* ที่มี pCSBC8 ได้ γ-CD ในอัตราส่วนที่มากที่สุด ตามด้วย β-CD และ α-CD ตามลำดับ

จากรายงานเกี่ยวกับยีน CGTase ในแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆพบว่ายีน CGTase นั้นมีขนาดประมาณ 2.0 ถึง 3.0 kb ดังแสดงในตารางที่ 7 แต่ชิ้นดีเอ็นเอที่สุรศักดิ์โคลนได้มีขนาด 5.2 kb ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ายีนมาก การที่ชิ้นดีเอ็นเอ insert มีขนาดใหญ่จะมีผลต่อการแสดงออกของยีน งานวิจัยนี้จึงมีจุดม่งหมายที่จะศึกษาแผนที่เรสทริกชัน และหาตำแหน่งของยีนไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรสที่อยู่ในพลาสมิด pCSBC5 เพื่อที่จะทำให้ดีเอ็นเอ insert มีขนาดเล็กลง และใช้เป็นแนวทางในการศึกษายีนไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอร์เรสจาก *Bacillus* sp. A11 ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย