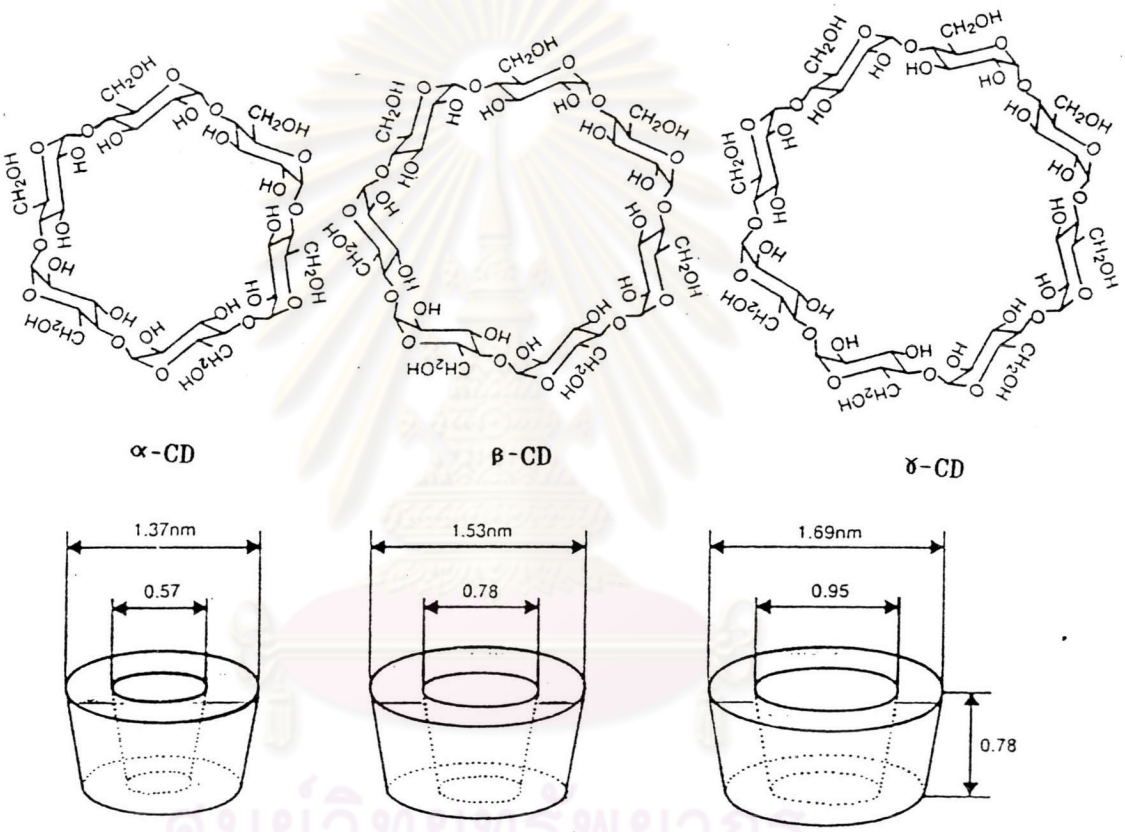
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

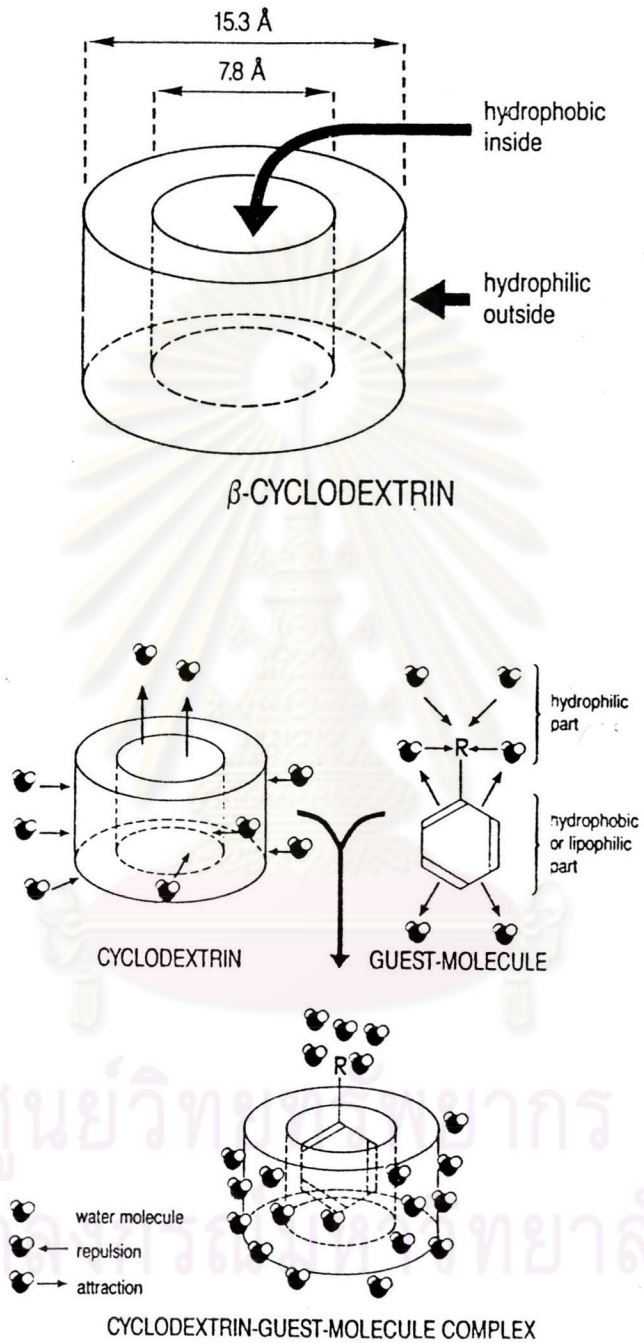
บทนำ

ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrin, CD) เป็นสารประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนปิด ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสอย่างน้อย 6 หน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic (French, 1957) สารไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดในธรรมชาติมี 3 ชนิด ได้แก่ α-,β- และ γ-CDs ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 6,7 และ 8 หน่วย ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 1.1 โดยทั่วไปแล้วจะไม่พบไซโคลเดกซ์ทรินที่มีจำนวนหน่วยย่อยของกลูโคสในโมเลกุลต่ำกว่า 6 หน่วย แต่จะพบที่มีจำนวนหน่วยย่อยของกลูโคสมากกว่า 8 หน่วย ซึ่งมักเป็นพวกไซโคลเดกซ์ทรินสาขา (branched cyclodextrin) โดยจะมีหน่วยย่อยของกลูโคสไปเชื่อมต่อกับโมเลกุลของไซโคลเดกซ์ทรินด้วยพันธะ α-1,6 glycosidic (Bender, 1986) เนื่องจากโมเลกุลของไซโคลเดกซ์ทรินมีลักษณะเป็นวงแหวนและมีโพรงตรงกลาง โดยที่กลูโคสในโมเลกุลจะหันหมู่ O-H ออกด้านนอกโมเลกุล และหันหมู่ C-H และ C-O-C เข้าด้านในของโมเลกุล ทำให้ไซโคลเดกซ์ทรินละลายน้ำได้ โดยที่ความสามารถในการละลายน้ำต่างกันแล้วแต่ชนิดของไซโคลเดกซ์ทริน (ตารางที่ 1.1) ในขณะที่โพรงด้านในของโมเลกุลมีลักษณะไฮโดรโฟบิค ทำให้สามารถจับกับสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์บางชนิดที่เหมาะสมกับขนาดของโพรงของไซโคลเดกซ์ทรินได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน ไฮโดรโฟบิค แรงแวนเดอร์วาลล์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (inclusion complex) (รูปที่ 1.2)ซึ่งการจับนี้จะมีผลทำให้สมบัติทางเคมีหรือกายภาพของสารที่ถูกจับเปลี่ยนไป สมบัติอื่นที่สำคัญได้แก่การที่โมเลกุลของไซโคลเดกซ์ทรินถูกสลายได้ยากกว่าโอลิโกแซคคาไรด์สายตรงทั่วไป โดยอาจถูกย่อยสลายด้วยกรดแก่ รังสีแกมมาและอะไมเลสบางชนิดเท่านั้น (Bender, 1986) นอกจากนั้นไซโคลเดกซ์ทรินยังมีความเป็นพิษต่ำมากด้วย (Saenger, 1980) จากสมบัติดังกล่าวทำให้มีการนำไซโคลเดกซ์ทรินไป



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1.1 โครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทริน 3 ชนิดและโพรงว่างภายในโมเลกุล (Szejtli, 1988)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1.2 แสดงการเกิด inclusion complex ของไซโคลเดกซ์ทริน กับโมเลกุลที่เป็น guest (Janssen, 1992)

	α-CD	β-CD	ϒ-CD
No.of glucose units	6	7	8
Molecular weight	972	1135	1297
Solubility in water (g/100 ml at room temperature)	14.5	1.85	23.2
$[\alpha]D^{25}$(optical rotation)	150+0.5	162.5+0.5	177.4+0.5
Cavity dimeter (A^O)	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Diameter of outer periphery (A^O)	14.6+0.4	15.4+0.4	17.5+0.4
Height of torus (A^O)	7.9+0.1	7.9+0.1	7.9+0.1
Volume of cavity $(A^O)^3$	174	262	472

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.1 เปรียบเทียบสมบัติของไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง 3 ชนิด (Szejtli, 1988)

ประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการรักษา สารที่มี สี กลิ่น รส ลดการระเหย เพิ่มความเสถียร และเพิ่มการละลายของสาร มีผู้นำไปใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการเกษตร อาหาร เครื่องสำอาง ยา เป็นต้น (Szejtli, 1981; Fromming, 1981; Schmid, 1989) ดังแสดงในตารางที่ 1.2

นอกจากการนำไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง 3 ชนิดมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านแล้ว ปัจจุบันยังได้มีการพัฒนาโดยนำอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทริน เช่น methylated CD,hydroxypropyl CD และmaltosyl CD มาใช้ประโยชน์ โดยอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินเหล่านี้สามารถละลายในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดด้วย (Hashimoto, 1988) ผลิตภัณฑ์สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ได้มาจากการนำโมเลกุลไซโคลเดกซ์ทรินมาเชื่อมต่อกัน ได้แก่ การสร้าง CD polymer ซึ่งมี 2 ประเภท ได้แก่ พอลิเมอร์ของไซโคลเดกซ์ทรินชนิดเดียว (homopolymer) และ CD - copolymer ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของไซโคลเดกซ์ทรินกับสารชนิดอื่น โดยพอลิเมอร์ของไซโคลเดกซ์ทรินนี้ นอกจากใช้สร้าง inclusion complex กับสารบางชนิด เช่น caffein (Shien และ Hedges, 1990) เพื่อประโยชน์ในการลดปริมาณสารแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อแยกเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase)ให้บริสุทธิ์โดยหลักการของแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีได้ (Villette และ คณะ, 1991)

ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสับสเตรทแป้ง โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, E.C. 2.4.1.19) จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ CGTase ที่พบส่วนใหญ่เป็น extracellular enzyme และสร้างได้จากแบคทีเรียหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เช่น *B.macerans* (Depinto และ Campbell, 1968; Lane และ Pirt, 1973), *B.circulans* (Okada และ Kitahata, 1973; Pongsawasdi และ Yagisawa 1987), *B.megaterium* (Kitahata และ Okada, 1974), alkalophilic *Bacillus* sp. (Nakamura และ Horikoshi, 1976), *B.stearothermophilus*

Function	Guests & End product
Food	
1.Emulsification	Oils & fat, margarine, cake, whipping cream
2.Stabilization	Flavors, spices,colors & pigment, mustard paste, cake & cookies, dried vegetable,pickel evegetables
3.Masking of taste & odor	Juices, soy milk, bone powder, boiled rice
4.Improvement of quality	Hard candy, cheese, soy sauce, canned citrus fruits & juices
5.Reduce volatility	Ethanol, food preservatives
6.Others	Breath mints
Cosmetics & Toiletries	
1.Emulsification	Oil & fats, face creams & lotions, tooth pastes
2.Stabilization	Flavors & fragrances, bath refresher crystals
Agrochemicals	
1.Stabilization	Pyronitrin, pyrethroids, fungicide,insecticide
2.Reduce volatility	Organic phosphates (DDVP), insecticide
3.Reduce toxicity	2-amino 4-methyl-phosphynobutyric acid, fungicide
Pharmaceuticals	
1.Improve solubility	Prostaglandins, steroids, cardiac glycosides,non-steroidal anti-inflammatory agents, barbiturates
2.Chemical stabilization	
A) Hydrolysis	Prostacyclin, cardiac glycosides, aspirin,procaine
B) Oxidation	Aldehydes, epinephrine, phenothiazines
C) Photolysis	Phenothiazines, ubiquinones, vitamins
D) Dehydration	Prostaglandin E_1, ONO-802
3.Improve bioavailability	Aspirin, barbiturates, phenytoin, digoxine
4.Powdering	ONO-802, benzaldehyde, vitamin K_1,K_2,nitroglycerin
5.Reduce volatility	Iodine, naphthalene, methylcinnamate
6.Reduce irritation	Nonsteroidal antiinflammatory agents
7.Reduce taste, smell	Prostaglandins, alkylparabens
8.Reduce hemolysis	Phenolthiazines, antibiotics, benzylalcohol

<u>รูปที่ 1.2</u> แสดงการเกิด inclusion complex ของไซโคลเดกซ์ทริน กับโมเลกุลที่เป็น guest (Janssen, 1992)

(Shiosaka และ Fumiya, 1973) นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียในสายพันธุ์อื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ เช่น *Klebsiella pneumoniae* (Bender, 1977), *Micrococcus* sp. (Yagi, 1980), *Thermoanaerobacter* sp. ATCC 53627 (Starnes, 1990) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันจะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินต่างชนิดในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ CGTase จาก *B.macerans* (Depinto และ Campbell, 1968) และ *B.megaterium* (Kitahata และ Okada, 1974) จะผลิต α-CD และ β-CD เป็นผลิตภัณฑ์หลัก (ตารางที่ 1.3) โดยผลิตในอัตราส่วนของ α:β:ϒ-CD เป็น 2.7:1:1 และ 1:2.4:1 ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันยังมีสมบัติบางประการที่แตกต่างกัน เช่น น้ำหนักโมเลกุล pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ความเสถียรต่อ pH และ อุณหภูมิ เป็นต้น

เอนไซม์ CGTase สามารถเร่งปฏิกิริยาการเกิดไซโคลเดกซ์ทรินได้โดยมีกลไกการทำงานเป็น 3 แบบ ได้แก่ cyclization, coupling และ disproportionation (Bender, 1986) โดยปฏิกิริยาทั้ง 3 สามารถแสดงได้ดังนี้

$$G_n \underset{\text{coupling}}{\overset{\text{cyclization}}{\rightleftharpoons}} G_{(n-x)} + cG_x$$

$$G_n + G_m \xrightarrow{\text{disproportionation}} G_{(n-x)} + G_{(m+x)}$$

เมื่อ G_n และ G_m คือ 1,4- α -D-glucopyranosyl chains

n และ m คือ D-glucopyranosyl residues

x คือ ส่วนของ 1,4- α -D-glucopyranosyl chain

cG_x คือ cyclodextrins

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Organism	Predominant product	optimum pH (activity)	Mol. weight	pI	Reference
B.macerans IFO 3490	α-CD	5.0-5.7	65,000	4.6	Kitahata *et al.* (1974)
B.megaterium	β-CD	5.0-5.7	ND	4.6	Kitahata & Okada (1974)
B.stearothermophilus	α-CD	6.0	68,000	4.5	Kitahata & Okada (1982)
Alkalophilic *Bacillus* 38-2[a]	β-CD	1) 4.6 2) 7.0 3) 9.5	88,000	5.3	Nakamura & Horikoshi (1976)
Alkalophilic *Bacillus* 17-1	β-CD	6.0	74,140	ND	Yamamoto *et al.* (1972)
Micrococcus sp.	β-CD	5.8	88,000	4.2	Yagi *et al.* (1980)
Klebsiella pneumoniae M 5 a1	α-CD	6.0-7.2	68,000	4.8	Bender (1982)
B.fermus/lentus 290-3	ϑ-CD	6.8	55,000	4.1	Englbrecht (1990)

a : แบคทีเรียผลิต CGTase ที่มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา 3 ค่าอยู่ในช่วงกรด กลางและเบส

ND: ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 1.3 สมบัติบางประการของเอนไซม์ CGTase ที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกัน

cyclization เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์วงแหวนปิดของไซโคลเดกซ์ทริน จากสายโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์ปลายเปิด โดยปลายด้านหนึ่งของสาย D-glucopyranosyl จะถูกไฮโดรไลซ์ แล้วปลายอีกด้านหนึ่งของสาย D-glucopyranosyl ซึ่งเป็นปลายด้าน non-reducing จะถูกขดเข้ามาทำปฏิกิริยากับปลายด้านที่ถูกไฮโดรไลซ์นั้นได้เป็นโมเลกุลของไซโคลเดกซ์ทริน ปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ดีเมื่อมีสับสเตรทเป็นสายโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์ที่มีจำนวนหน่วยย่อยของกลูโคสในสายต่อกัน 16-80 หน่วย (Szejtli, 1988) สำหรับ coupling เป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของ cyclization เป็นการสลายไซโคลเดกซ์ทรินเพื่อนำไปต่อกับสายโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์ เกิดเป็นสายโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์ปลายเปิดที่มีความยาวขึ้น เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา coupling ได้ดีเมื่อสับสเตรทเป็นโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์สายสั้นหรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และเมื่อสับสเตรทเป็นแป้ง เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา disproportionation ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย้ายหมู่ glycosyl ระหว่างโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์ โดยปฏิกิริยา disproportionationนี้จะไม่มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินเมื่อสายโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์ที่ได้มีขนาดไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นสับสเตรทของปฏิกิริยา cyclization (Lloyed และ Nelson, 1984) และเมื่อปฏิกิริยา disproportionation ดำเนินไปจนได้สายโอลิโกหรือพอลิแซคคาไรด์ที่มีขนาดเหมาะสมก็จะเกิดปฏิกิริยา cyclization ดำเนินต่อไป (Bender, 1986)

จากการที่ไซโคลเดกซ์ทริน เป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมหลายประเภท ทำให้ไซโคลเดกซ์ทรินมีแนวโน้มเป็นที่ต้องการมากขึ้น (ตารางที่ 1.4) อย่างไรก็ตามราคาของไซโคลเดกซ์ทรินโดยทั่วไปยังค่อนข้างสูง เนื่องจากต้นทุนในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินมีมูลค่าสูง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยมีการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ในถังหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูง ตลอดจนการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ CGTase เช่น Kaneko และคณะ (1988) สามารถนำยีนของ CGTase จาก Alkalophilic *Bacillus* no.38-2 เข้า *E.coli* โดยใช้ pBR 322

Application	Market (ton per year)	
	1989	Expect for 1995
Pharmaceutics	50	2000
Food	700	2500
Cosmetics	50	500
Agriculture	10	100
Chemical industry (separation, biotransformation, catalysis)	30	300
Other purpose (e.g. diagnosis)	10	200

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.4 ปริมาณการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในตลาดโลก (Schmid, 1989)

เป็นพาหะ นอกจากนั้นได้มีผู้พยายามคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงเพื่อเพิ่มความเสถียรในการทำงานของเอนไซม์ เช่น สายพันธุ์ *Thermoanaerobacter* sp. (Starnes,1990)

เนื่องจากในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินแต่ละครั้งจะต้องสูญเสียเอนไซม์ CGTase เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินมีราคาสูง ดังนั้นการนำเทคโนโลยีการตรึงรูปเอนไซม์มาใช้พัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจะช่วยลดปริมาณการสูญเสียเอนไซม์ระหว่างการผลิตได้ โดยเอนไซม์ตรึงจะมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์อิสระในแง่การนำมาใช้งาน กล่าวคือเอนไซม์ตรึงสามารถนำกลับคืนมาใช้ได้อีก เพราะสามารถแยกเอนไซม์ออกจากผลิตภัณฑ์ได้สะดวก รวมทั้งสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องได้ด้วย วิธีการตรึงเอนไซม์แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การตรึงเอนไซม์กับตัวค้ำที่ไม่ละลายน้ำ (Carrier binding) ด้วยแรงดูดซับแบบกายภาพ (physical adsorption), พันธะโคเวเลนต์ (covalent binding) หรือแรงระหว่างประจุ (ionic binding)

2. การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมไขว้ (Cross-linking) เป็นการตรึงเอนไซม์กับสารประเภท bi- หรือ multi-functional reagent โดยไม่ใช้ตัวค้ำ วิธีนี้เป็นการสร้างพันธะโคเวเลนต์เป็นร่างแหภายใน และระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ ด้วยสารที่มีกลุ่มฟังก์ชันที่เหมือนกันหรือต่างกันตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไป เช่น กลูทารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde)

3. การกักขัง (Entrapment) วิธีนี้เอนไซม์จะถูกห่อหุ้มไว้ในตัวกลางประเภทพอลิเมอร์หรือเมมเบรน โดยที่ไม่มีพันธะเกิดขึ้นระหว่างเอนไซม์กับสารห่อหุ้ม

ถึงแม้ว่าการตรึงเอนไซม์จะทำได้หลายวิธี แต่เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีโครงสร้างและสมบัติแตกต่างกัน รวมทั้งความแตกต่างของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเลือกวิธีตรึงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด โดยการที่จะเลือกใช้วิธีใดนั้นจะต้องพิจารณาเพื่อให้ได้วิธีที่ให้ประสิทธิภาพการใช้งานได้ดี สามารถรักษาความเสถียรของเอนไซม์ไว้ได้ รวมทั้งควรเป็นวิธีที่สะดวก และต้นทุนในการผลิตต่ำด้วย ซึ่งข้อเปรียบเทียบวิธีการตรึงเอนไซม์แต่ละวิธีแสดง

ดังตารางที่ 1.5

การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีเชื่อมไขว้นั้น ต้องใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์ระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งต้องใช้สภาวะการตรึงที่ค่อนข้างรุนแรงสำหรับเอนไซม์ มักมีผลกระทบต่อโครงรูปสามมิติของเอนไซม์และแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย แต่อย่างไรก็ตาม การตรึงด้วยวิธีนี้จะได้เอนไซม์ตรึงที่มีความเสถียรสูงและไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ (regeneration) เนื่องจากมีพันธะที่แข็งแรงเชื่อมระหว่างเอนไซม์โมเลกุล แต่การตรึงด้วยวิธีนี้นั้นยังนำไปใช้งานได้ไม่มากนัก เนื่องจากเอนไซม์ถูกตรึงโดยปราศจากตัวค้ำ ทำให้เอนไซม์ตรึงที่ได้มีคุณสมบัติไม่คงทนต่อแรงกระทบ สำหรับการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการกักขังไว้ในตัวกลางนั้นเอนไซม์จะไม่สูญเสียแอคติวิตี เนื่องจากไม่มีพันธะใดๆเกิดขึ้นระหว่างเอนไซม์ แต่เอนไซม์ตรึงที่ได้จะมีขอบเขตจำกัดในการใช้งาน โดยจะใช้ไม่ได้ในกรณีที่สับสเตรทของเอนไซม์มีขนาดของโมเลกุลใหญ่ เช่น สับสเตรทแป้งของเอนไซม์ CGTase ในกรณีนี้เนื่องจากสับสเตรทไม่สามารถผ่านตัวกลางเข้าไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ ดังนั้นวิธีที่คาดว่าจะเหมาะสมสำหรับการตรึงเอนไซม์ CGTase น่าจะเป็นการตรึงด้วยวิธียึดติดกับตัวค้ำ เนื่องจากสามารถเลือกใช้ตัวค้ำและวิธีการตรึงได้หลายประเภท ตัวค้ำที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ อาจจัดแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทตามสมบัติทางเคมี คือ สารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 1.6 สารอินทรีย์โดยทั่วไปจะมีกลุ่มฟังก์ชันจำนวนมากที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลของเอนไซม์ได้โดยง่าย แต่อย่างไรก็ตามสารอินทรีย์มีข้อเสียเนื่องจากสมบัติทางกายภาพ เช่น ไม่มีความคงทนต่อแรงกระทบ ความร้อน สารเคมี และจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่ตรึงด้วยสารประเภทนี้เกิดการสูญเสียความเสถียรได้ง่าย ในขณะที่ตัวค้ำที่เป็นสารอนินทรีย์มีความเหมาะสมหลายประการในการใช้งานทางด้านอุตสาหกรรม ซึ่งได้แก่ มีความคงทนสูงต่อแรงกระทบ ทนต่อความร้อน สารเคมี ไม่ถูกสลายด้วยจุลินทรีย์ ง่ายต่อการรักษา มีอายุการใช้งานนาน แต่เนื่องจากผิวของสารอนินทรีย์ที่ใช้ตรึงเอนไซม์นั้นมีกลุ่มฟังก์ชันน้อย และทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ค่อนข้างช้า จึงมักต้องทำการกระตุ้นสารอนินทรีย์เหล่านั้น ให้เป็นอนุพันธ์ที่มีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามการเลือกตัวค้ำสำหรับการนำไปใช้งานนั้น นอกจากสมบัติทางเคมีในด้านกลุ่ม

	Physical adsorption	Ionic binding	Covalent binding	Cross-linking	Entrapping
Preparation	Simple	Simple	Difficult	Moderate	Difficult
Binding force	Weak	Moderate	Strong	Strong	Moderate
Enzyme activity	Moderate	High	High	Low	Low
Regeneration	Possible	Possible	Rare	Impossible	Impossible
Stability	Low	Moderate	High	High	High
Cost of immobilization	Low	Low	High	Moderate	Moderate
General applicability	Yes	Yes	No	No	Yes

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.5 เปรียบเทียบการตรึงเอนไซม์แต่ละวิธี (Kennedy, 1987)

Organic carriers	Inorganic carriers
Cellulose	Kaolinite
Agarose	Colloidal silica
Collodion	Glass particles
Starch	Controlled pore glass
Polyacrylamides	Alumina
Dextran	Controlled pore alumina
Nylon	Controlled pore titania
Collagen	Nickel oxide
Organic copolymers (maleic anhydride, ethylene)	Controlled pore zirconia
	Carbon
DEAE cellulose	Hydroxyapatite
	Iron oxide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1.6 การจัดประเภทของตัวค้ำโดยใช้สมบัติทางเคมี (Messing, 1975)

ฟังก์ชันและความเสถียรแล้วควรจะพิจารณาถึงสมบัติอื่นด้วย เช่น ควรมีรูปร่างและขนาดเหมาะสมสำหรับการใช้งาน มีพื้นที่ผิวมาก เพื่อใช้ในการจับยึด มีอายุการใช้งานนาน สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้และราคาไม่สูงเกินไปเป็นต้น

งานวิจัยเรื่องการตรึงเอนไซม์ CGTase มีผู้รายงานไว้ไม่มากนัก ในปี 1977 Nakamura และ Horikoshi ตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับบน vinylpyridine copolymer ด้วยพันธะไอออนิก โดยต้องเติมหมู่ succinyl ให้กับเอนไซม์ก่อน ผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพการตรึงรูปเท่ากับ 25 เปอร์เซนต์ เอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิและ pH ไม่ต่างจากเอนไซม์อิสระ ต่อมา Kato และ Horikoshi (1983) ได้ใช้ตัวค้ำสำหรับการตรึงเอนไซม์ เป็น DIAION HP-20 (porous-styrene-divinylbenzene) โดยเอนไซม์ตรึงที่ได้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและ pH คงเดิม แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนจาก 50° ซ เป็น 55° ซ และเอนไซม์ตรึงสามารถใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ในระบบต่อเนื่องได้นานถึง 2 สัปดาห์ โดยไม่สูญเสียแอคติวิตี ในปี 1989 Yang และ Su ได้ตรึงเอนไซม์บนไคโตแซนด้วยพันธะโคเวเลนต์ พบว่าเอนไซม์ตรึงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าเอนไซม์อิสระโดยเอนไซม์ตรึงสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ซ้ำกันได้ 4 ครั้ง Sakai และคณะ (1991) ได้ตรึงเอนไซม์บน FE-4611 (glycidyl methacrylate polymer)เพื่อใช้ผลิต glycosyl-CD โดยสามารถนำมาใช้งานได้นานติดต่อกัน 70 วัน นอกจากนั้นในปี 1993 Steighardt และ Kleine ได้ทดลองตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีดูดซับแบบกายภาพ พันธะไอออนิก และพันธะโคเวเลนต์บนตัวค้ำชนิดต่างๆและพบว่า Trisoperl (porous glass bead) เป็นตัวค้ำที่เหมาะสมสำหรับการตรึงด้วยวิธีโคเวเลนต์ โดยสามารถนำมาใช้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินซ้ำกันได้ถึง 20 ครั้ง

สำหรับเอนไซม์ CGTase ที่จะใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* A11 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987)ซึ่งทางกลุ่มผู้วิจัยที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดย วัลยา เตชชัยกุล (1990) ได้ทำการศึกษาแล้วพบว่าสามารถ

ผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูง ต่อมาทางกลุ่มผู้วิจัยได้ทำการศึกษาปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินให้ดีขึ้น โดย สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์ (2536) ได้โคลนยีนของ CGTase จาก *Bacillus* A11 เข้าสู่ *E.coli* นอกจากนั้นยังได้หาสภาวะการผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากในถังหมักขนาด 5 ลิตร รวมทั้งศึกษาการตรึงเอนไซม์บน DEAE-cellulose (อุไรวรรณ รัชธร, 2536) โครงงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาต่อเนื่องโดยทดลองศึกษาการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีตรึงและตัวค้ำชนิดอื่น ซึ่งข้อมูลที่ศึกษาได้อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนากระบวนการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีผลผลิตสำคัญจากภาคเกษตรกรรมเป็นจำนวนมาก ที่สามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินได้ เช่น ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง ดังนั้นการนำเอาวัตถุดิบทางเกษตรเหล่านี้มาแปรรูปให้เป็นผลิตผลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ จะเป็นหนทางหนึ่งในการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศได้

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาการตรึงเอนไซม์ CGTase โดยมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. ศึกษาการตรึงเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธีการยึดติดกับตัวค้ำ โดยคัดเลือกหาตัวค้ำและสภาวะที่เหมาะสมในการตรึง

2. ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติบางประการของเอนไซม์ก่อนและตรึงบนตัวค้ำที่เหมาะสม

3. ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตรวมทั้งอายุการใช้งานของ เอนไซม์ CGTase ที่ถูกตรึงบนตัวค้ำที่เหมาะสม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย