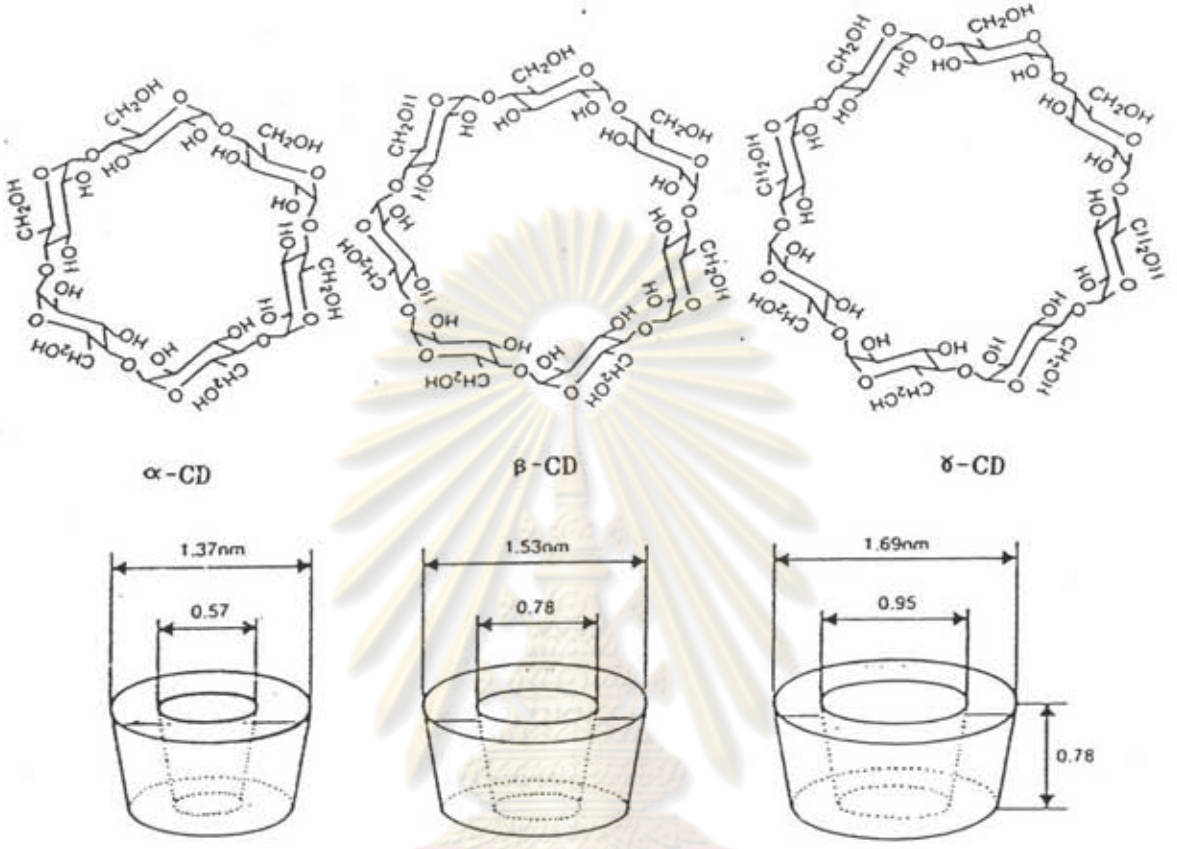
บทนำ

บทที่ 1

ไซโคลเดกซ์ทริน (Cyclodextrin : CD) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภท non-reducing oligosaccharides ที่ผลิตได้จากการหมักแป้งชนิดต่างๆ เช่น แป้งมัน แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งสาลี เป็นต้น กับเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด อย่างเช่น *Bacillus sp.* โดยผู้ค้นพบเป็นคนแรก คือ Villiers ในปี ค.ศ 1891 (Schmid,1988) CDs ที่พบในธรรมชาติมี 3 ชนิดคือ α-CD (Cyclohexa-amylose) β-CD (Cycloheptaamylose) และ γ-CD (Cyclooctaamylose) ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 6, 7 และ 8 หน่วย ตามลำดับ มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic เป็นรูปวงแหวนมีโพรงตรงกลาง (รูปที่ 1) จากการศึกษาโครงสร้างทางเคมี พบว่า บริเวณด้านนอกของวงแหวน CDs นั้นจะมีคุณสมบัติ hydrophilic เนื่องมาจากหมู่ ไฮดรอกซิล (-OH) ของกลูโคส ทำให้ CDs สามารถละลายน้ำ และสารละลายโพลาร์ได้ ส่วนด้านในที่เป็นโพรงจะมีคุณสมบัติ hydrophobic อันเนื่องมาจากหมู่ C-H และหมู่ C-O-C ของกลูโคสจะหันเข้าสู่ด้านใน โมเลกุลของสารประเภท hydrophobic ที่มีขนาดพอเหมาะกับโพรงของ CDs จึงสามารถจับกับ CDs ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน แรงวานเดอร์ วาลส์ (Van der Waals) และ hydrophobic interactions เกิดเป็น inclusion complexes (Bender,1984) และทำให้คุณสมบัติทางเคมี และ/หรือทางกายภาพของสารนั้นเปลี่ยนไป จึงมีการนำ CDs มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย เช่น ช่วยป้องกันการเสียสภาพของสารต่างๆ จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นกับแสง UV เพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบประเภทไฮโดรโฟบิกในสารละลายโพลาร์หรือน้ำ ช่วยให้สารระเหยประเภทต่างๆ มีความเสถียรมากขึ้นในรูปของแข็ง ช่วยเปลี่ยนรูปของของเหลวไปอยู่ในรูปผง (powderization) สามารถปรับปรุงกลิ่นและรสของอาหาร และเป็น antioxidants เป็นต้น จากคุณประโยชน์เหล่านี้ จึงมีผู้นำ CDs ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมยา อาหาร เครื่องสำอาง การขจัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมและบ้านเรือน (Hashimoto และคณะ, 1988 ; Schmid,1989) ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2

ในจำนวน CDs ทั้งสามชนิดที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ พบว่า β-CD มีความเสถียรมากที่สุด เนื่องจากหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตัวที่สองของกลูโคสแต่ละโมเลกุล สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตัวที่สามของกลูโคสที่อยู่ติดกันได้ เกิดเป็นลักษณะที่เรียก



รูปที่ 1 โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α- β- และ γ- ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การนำผลิตภัณฑ์ของไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่น ในช่วงปี ค.ศ. 1984-1987 (Hashimoto, 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

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในตลาดโลก (Schmid, 1989)

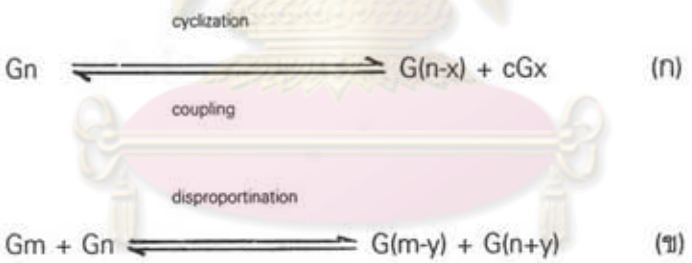
Application	Market (ton year^{-1})	
	1989	1995
Pharmaceutics	50	2000
Food	700	2500
Cosmetics	50	500
Agriculture	10	100
Chemical industry	30	300
Other purpose	10	200

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ว่า secondary belt ของพันธะไฮโดรเจนทั้งเจ็ดพันธะ ในขณะที่ α-CD จะมีโมเลกุลของกลูโคสหนึ่งหน่วยที่อยู่ในตำแหน่งบิดงอ (distorted position) ทำให้สามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างกลูโคสที่อยู่ติดกันได้เพียง 4 พันธะ จากทั้งหมดที่ควรจะเป็น 6 พันธะ ส่วนในกรณีของ γ-CD พบว่า ขนาดของโพรงที่ใหญ่ขึ้น โมเลกุลของน้ำเข้าไปภายในโพรงได้มากขึ้น ทำให้มีความยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น จากเหตุผลข้างต้นจะเห็นว่า β-CD มีความเสถียรมากที่สุด และยังเป็นเหตุผลที่ใช้อธิบายได้ว่า β-CD ละลายน้ำได้น้อยที่สุดในบรรดา CDs ทั้งสามชนิด (Szeijtti,1988)

การผลิต CD ในปัจจุบันจะผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพเป็นส่วนใหญ่ เป็นการผลิตโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glucanotransferase ; CGTase : α- 1,4 - glucan-4-glycosyl-transferase ; E.C. 2.4.1.19) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็น CDs CGTase แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามชนิดของ CDs ที่ผลิตได้เป็นส่วนใหญ่ (โดยปกติเอนไซม์ CGTase สามารถผลิต CDs ได้ทั้ง α-CD β-CD และ γ-CD) คือ α-CGTase β-CGTase และ γ-CGTase จากการศึกษาโครงสร้างและบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ของเอนไซม์ พบว่า CGTase สามารถทำงานได้ 3 แบบ คือ Cyclization Coupling และ Disproportionation (Bender, 1981) ดังแสดงในปฏิกิริยา ก. และ ข.



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

m,n,y = α-D-glucosylpyranosyl residues

cGx = cyclodextrin (x = 6, 7 หรือ 8)

โดยที่ปฏิกิริยา cyclization จะเป็นปฏิกิริยาที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ CDs และจะเกิดได้ดีที่สุด เมื่อสับสเตรตเป็น oligosaccharide ที่มีกลูโคส 16-18 หน่วย แต่ถ้าหากว่าสับสเตรตมีความยาวมากกว่า 100 หน่วยขึ้นไป จะเป็นสับสเตรตที่ไม่ดีสำหรับการเกิดปฏิกิริยา cyclization ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะรูปร่างของสับสเตรตที่มีความยาวมากขึ้นจะมีรูปร่างเป็นเกลียว (Bender,1985) ทำให้เปลี่ยนไปเกิดปฏิกิริยา disproportionation แทน เพื่อตัดสับสเตรตให้มีขนาดเล็กลงจนพอเหมาะ

กับการเกิดปฏิกิริยา cyclization ถ้าสับสเตรทมีความยาวน้อยกว่า 14 หน่วย ก็จะไม่เกิดปฏิกิริยา cyclization แต่เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา coupling เพื่อต่อสายกลูโคสให้ยาวขึ้น ให้เหมาะที่จะเกิดปฏิกิริยา cyclization และผลิตเป็น CDs ออกมา (Szejtli,1988) (ตารางที่ 3)

สำหรับกลไกในการเกิดปฏิกิริยา cyclization ของ α-CGTase นั้น ในปี ค.ศ. 1988 Bender ได้เสนอว่า ในการเข้าทำปฏิกิริยา เอนไซม์ CGTase จะเข้าจับกับสับสเตรททางด้านปลาย non-reducing แบบ exo-attack กับกลูโคส 8-10 หน่วย (หรืออาจมากกว่านี้) ซึ่งบริเวณที่กลูโคสแต่ละหน่วยที่ถูกเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาเรียกเป็นหนึ่ง subsite จากนั้นเอนไซม์จะตัดลูกโซ่ของสับสเตรทที่พันธะ α-1,4 glycoside ระหว่าง subsite ที่ 2 และ 3 (รูปที่ 2) ได้ maltohexaose ออกมาเป็นสารตัวกลาง (intermediate) โดยปลาย reducing จับกับ aspartyl group ของเอนไซม์ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ในขณะเดียวกันปลาย non-reducing ของ maltohexaose จะเข้ามาจับกับ subsite ที่ 2 แล้วสร้างพันธะ α-1,4 glycoside ขึ้นระหว่างกลูโคสตัวที่ 1 และ 6 (ซึ่งคือตัวที่ 3 และ 8 ตามรูปที่ 2) ของ maltohexaose เกิดเป็น α-CD ขึ้นมา เนื่องจาก active site ของเอนไซม์ไม่มีความจำเพาะอย่างสมบูรณ์ (absolute specificity) ต่อความยาวของลูกโซ่สับสเตรท ดังนั้นเอนไซม์ α-CGTase จึงสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็น β- และ γ-CD ได้เช่นกัน (Bender,1988 ; Schmid,1989)

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ CGTase พบว่า โดยเฉลี่ยแล้วยีนของเอนไซม์ CGTase จะมีนิวคลีโอไทด์อยู่ประมาณ 2,000-2,500 เบส มีกรดอะมิโนประมาณ 700 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70-75 กิโลดาลตัน ในด้านความคล้ายคลึง (homology) ระหว่างเอนไซม์ CGTase ด้วยกันเอง พบว่า β-CGTase จะมีความคล้ายคลึงกับ α-CGTase ที่ระดับ nucleotide sequence เท่ากับ 64% และที่ระดับ amino acid sequence เท่ากับ 63% ในขณะที่ γ-CGTase ไม่ได้มีความคล้ายคลึงอย่างเด่นชัดกับ β-CGTase และ α-CGTase (Horikoshi,1988) เมื่อเทียบกับเอนไซม์ α-amylase พบว่า ทางด้านปลายอะมิโนมีความคล้ายคลึงกันมาก ส่วนปลายด้านคาร์บอกซิลจะเป็นส่วนที่พบเฉพาะในเอนไซม์ CGTase หรือ α-amylase(Hofmann และคณะ,1989 ; Kimura และคณะ,1989 ; Villette และคณะ,1992) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้เกิดสมมุติฐานว่าปลายด้านอะมิโนของเอนไซม์ CGTase เป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง (ตัดพันธะ α-1,4 glycosidic) ซึ่งเหมือนกับเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งตัวอื่นๆ ที่จะมีส่วนปลายอะมิโนทำหน้าที่ในการตัดโมเลกุลของแป้งให้เล็กลง (Eichel-Streiber และคณะ,1992 ; Itkov และคณะ,1990) และปลายด้านคาร์บอกซิลน่าจะเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการจับยึดโมเลกุลของแป้ง (raw strach binding site) และทำให้เกิดปฏิกิริยา cyclization (Kimura และคณะ,1989)

ตารางที่ 3 สรุปความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลูกโซ่ของสับสเตรตกับการเร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นของเอนไซม์ CGTase (Szejtli, 1988)

Substrate chain lengths (residues)	Effects
1 (D-glucose)	–
2-4	-inhibit initial reaction of cyclization -substrate for coupling reaction
5-14	-good substrate for coupling reaction -poor substrate for disproportionation reaction
16-80	-good substrate for cyclization reaction
>100	-good substrate for disproportionation reaction

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์ α-CGTase จาก *Bacillus oxytoca* M5a1 (Bender, 1988)

เอนไซม์ CGTase เป็น inducible เอนไซม์ โดยมีแป้งเป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Bacillus* (Bender,1981 ; Schmid,1989) แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะผลิต CDs ได้ทั้งสามชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกัน เช่น *Bacillus macerans* , alkalophilic *Bacillus* sp. No. 38-2 (ATCC21783) และ *Bacillus megaterium* จะให้ α- , β- และ γ-CD ในอัตราส่วน 2.7:1.0:1.0 , 1.0:11.0:1.5 และ 1.0:2.4:1.0 ตามลำดับ (Horikoshi,1988 ;Szejtli,1988) จึงแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกเป็นสามกลุ่มตามชนิดของ CDs ที่แบคทีเรียผลิตออกมาเป็นส่วนใหญ่ คือ กลุ่ม α-CGTase เช่น *Bacillus macerans* เป็นต้น กลุ่ม β-CGTase ได้แก่ *Bacillus megaterium* , Alkalophilic *Bacillus* sp. No.38-2 และ กลุ่ม γ-CGTase ได้แก่ *Bacillus subtilis* No.313 เป็นต้น (ดังแสดงในตารางที่ 5) นอกจากนี้เอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ จะมีคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพแตกต่างกัน เช่น alkalophilic *Bacillus* sp. No.38-2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธ์หนึ่งที่ใช้ในอุตสาหกรรม สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีช่วงการทำงานในช่วง pH ที่กว้างมาก คือ ทำงานได้ดีที่ pH 4.6 , 7.0 และ 8.5 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus macerans* และ *Bacillus megaterium* จะผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0-5.7 (Horikoshi และคณะ,1981) คุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆได้สรุปแสดงไว้ในตารางที่ 6

ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิต CD ให้สูงขึ้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตและให้เพียงพอต่อความต้องการทางอุตสาหกรรมในด้านต่างๆ โดยเฉพาะ อุตสาหกรรมอาหารและยา มีวิธีหนึ่งที่มีศักยภาพสูงและนิยมทำกันมาก คือวิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) จะเห็นได้จากตารางที่ 7 ที่ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการโคลนยีน CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อทำการศึกษาและเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิต Binder (1986) และ Schmid (1989) ได้ทำการศึกษาร่วมกันถึงการนำเอา α-CGTase และ β-CGTase gene ที่ได้จาก *Klebsiella oxytoca* M5a1 และจาก alkalophilic *Bacillus* 1-1 มาต่อกับ strong promoter แล้วส่งเข้าสู่เซลของ *E. coli* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ เพื่อให้ทรานสฟอร์แมนท์ขับเอนไซม์ CGTase ออกนอกเซลล์แทนที่จะอยู่ที่ periplasmic space ผลปรากฏว่า ทรานสฟอร์แมนท์สามารถผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 20-25 เท่า จากเดิม ในขณะเดียวกัน ก็ได้นำเอา α-CGTase และβ-CGTase gene เข้าไปขยายใน *Bacillus subtilis* พบว่าปริมาณเอนไซม์ β-CGTase เพิ่มขึ้นถึง 300 เท่า เมื่อเทียบกับ alkalophilic *Bacillus* 1-1 ดังแสดงในตารางที่ 8 (Schmid,1989)

Yamamoto และคณะ ได้ค้นพบ alkalophilic *Bacillus* sp. Strain No.38-2 (ATCC21783) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ β-CGTase (Nakamura และ Horikoshi,1976) ต่อมาในปี 1988 Kaneko

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
	Aikalophilic *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	ขั้น 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	ขั้น 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

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก wild-type คือ *Kiebsiella oxytoca* (α-CGTase) และ alkalophilic *Bacillus* 1-1 (β-CGTase) กับรีคอมบิแนนท์โคลนที่ใช้ *E. coli* และ *B. subtilis* เป็นเซลล์เจ้าเรือน (Schmid, 1989)

Enzyme	Yield (mg protein/ l fermentation broth)		
	Wild-type *Klebsiella oxytoca*	Recombinant *E. coli*	Recombinant *B. subtilis*
α-CGTase	18-20	400-500	800-1000
β-CGTase	20-22	400-500	6000-7000

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

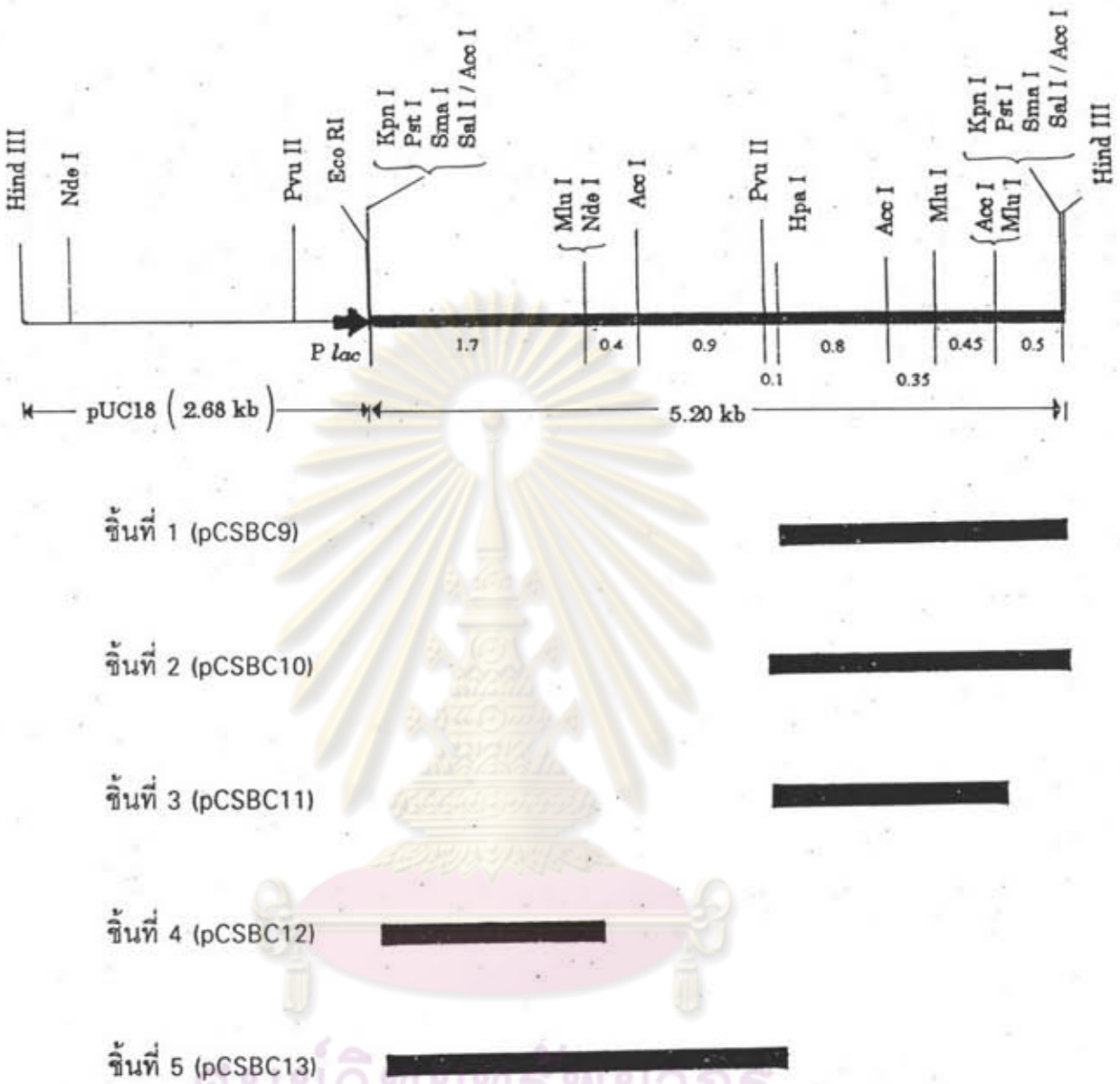
และคณะ ได้โคลนยีน β-CGTase จาก *Bacillus* Strain No.38-2 นี้ Georganta และคณะ ได้ศึกษาต่อโดยการนำยีนไปตัดต่อกับ expression vector ที่มี *tac* promoter ส่งเข้าใน *E. coli* พบว่ามีแอคติวิตี้ของ CGTase สูงมาก และเมื่อตัดต่อเข้ากับ shuttle vector ซึ่งสามารถทรานสฟอร์มเข้าได้ทั้งใน *E. coli* และ *B. subtilis* พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ β-CGTase ใน *B. subtilis* น้อยกว่าเทียบกับเมื่อใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าเรือน และน้อยกว่าใน alkalophilic *Bacillus* No. 38-2 ปี ค.ศ. 1992 Paloheimo และคณะ ได้ทำการโคลน CGTase gene จาก *Bacillus* Strain No.38-2 ใส่เข้าไปใน *Bacillus subtilis* โดยครั้งแรกได้ใช้พลาสมิด pUB110 ปรากฏว่าสามารถผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียง 1.2 เท่า จึงได้ทดลองตัดต่อส่วน promoter ของยีน α-amylase จาก *B. amyloliquefacians* มาใส่เข้ากับ CGTase gene พบว่า ปริมาณของเอนไซม์ CGTase เพิ่มขึ้นเป็น 14 เท่า เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า และเพิ่มเป็น 33 เท่า เมื่อเลี้ยงในถังหมัก

งานวิจัยเกี่ยวกับ CGTase ของกลุ่มผู้วิจัยที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้เริ่มขึ้นในปี ค.ศ.1987 Pongsawasdi และ Yagisawa ซึ่งได้ทำการตรวจสอบหาสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียที่แยกจากดินในแถบเอเชียอาคเนย์ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ *Bacillus* sp. A11 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงและให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β-CD โดยมี α-CD ปนเล็กน้อย ต่อมา วัลยา ได้ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* sp. A11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้ง 1-5 กรัม เปอร์เซนต์ พบว่า แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และ soluble starch เหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ CGTase ได้ดีกว่าแป้งข้าวเหนียว แป้งมันสำปะหลัง และแป้งข้าวสาลี pHและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ CGTase คือ 6.0 และ 40-50 °ซ ตามลำดับ และสามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ โดยการเติมแคลเซี่ยมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ จากการทำเอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์เจลอีเล็กโทรโฟริซิส พบว่า CGTase เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์สารไซโคลเดกซ์ทรินที่เป็นผลิตภัณฑ์โดยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography) และ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) พบว่าเป็นชนิด β-CD (วัลยา,1991) ต่อมาสุรศักดิ์ (1994) ได้ทำการโคลนยีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 โดยใช้พลาสมิด pUC18 และ pSE411 ใส่ในเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM101 ตั้งชื่อดีเอ็นเอลูกผสมว่า pCSBC5 และ pCSBC8 ชิ้นดีเอ็นเอ insert ขนาด 5.2 กิโลเบส และในปี 1995 สุพิศรา ได้ทำการศึกษาแผนที่เรสทริกชันของชิ้นดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 พบว่ามีแผนที่เรสทริกชัน เหมือนใน pCSBC8 แต่มีทิศทางตรงข้ามกัน ทั้งยังไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตี้ของ CGTase ในทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 ได้ พบแต่ dextrinizing activity ซึ่งเป็นแอคติวิตี้อย่างหนึ่งของ CGTase จึงได้ทำการหาช่วงดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ที่มี

dextrinizing activity โดยการตัดช่วงดีเอ็นเอ insert ใน pCSBC5 ออกมา 5 บริเวณ แล้วทำการโคลนใส่ดีเอ็นเอพาหะของ *E. coli* คือ pUC118 ได้ดีเอ็นเอลูกผสม 5 โคลน ด้วยกันคือ pCSBC9 10 11 12 และ 13 เมื่อนำทรานสฟอร์แมนท์ของดีเอ็นเอลูกผสมมาทดสอบหา dextrinizing activity เทียบกับทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5 พบว่า ทรานสฟอร์แมนท์ CSBC12 ที่มีช่วงดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ที่ตำแหน่ง *Eco*RI ถึง *Nde*I ขนาดประมาณ 1.7 กิโลเบส (ดังรูปที่ 3) มี dextrinizing activity ใกล้เคียงกับทรานสฟอร์แมนท์ CSBC5

งานวิจัยนี้เป็นงานที่ต่อเนื่องมาจากงานของสุพิศรา โดยได้แบ่งขอบเขตของการศึกษายีน CGTase ออกเป็น 2 ส่วน ในส่วนแรกจะเป็นการหาลำดับเบส (nucleotide sequence) ของยีน CGTase ที่อยู่ในพลาสมิด pCSBC8 โดยอาศัยข้อมูลจากงานวิจัยของสุพิศราที่ได้หาตำแหน่งของยีน CGTase ในพลาสมิด pCSBC5 แม้ว่าจะพบเพียงบางส่วนของยีนก็ตาม และจากรายงานเกี่ยวกับยีน CGTase ในแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆ ที่พบว่า ยีน CGTase มีขนาดประมาณ 2.0-3.0 กิโลเบส ดังแสดงในตารางที่ 7 ในการหาลำดับเบสนี้ จะทำให้ทราบถึงตำแหน่งของ promoter start codon , open reading frame , stop codon และ amino acid sequence เพื่อนำไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับยีน CGTase ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ ในส่วนที่สองนั้นจะเป็นการนำเอายีน α-CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นมาใช้เป็นดีเอ็นเอติดตาม ยีน CGTase ใน *Bacillus* sp. A11 เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ที่จะยืนยันว่า pCSBC5 หรือ pCSBC8 เป็น CGTase clone หรือไม่ นอกจากนั้นยังนำมาใช้เพื่อเป็นประโยชน์ในการ clone ยีน CGTase ที่สมบูรณ์จาก *Bacillus* sp. A11 อีกด้วย ทั้งนี้เพราะ β-CGTase จะมีความคล้ายคลึง(Homology) กับ α-CGTase ที่ระดับ nucleotide sequence 64% และที่ระดับ amino acid sequence 63% (Horikoshi,1988) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษายีน CGTase จาก *Bacillus* sp. A11 ต่อไปภายหน้า ไม่ว่าจะเป็นด้านการปรับปรุงผลผลิตด้วยเทคนิคพันธุวิศวกรรมหรือโปรตีนวิศวกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ชิ้นดีเอ็นเอ insert ของ pCSBC5 ที่นำมา subclone ชิ้นที่ 1 ถึงชิ้นที่ 5

(สุพิศรา ,2538)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย