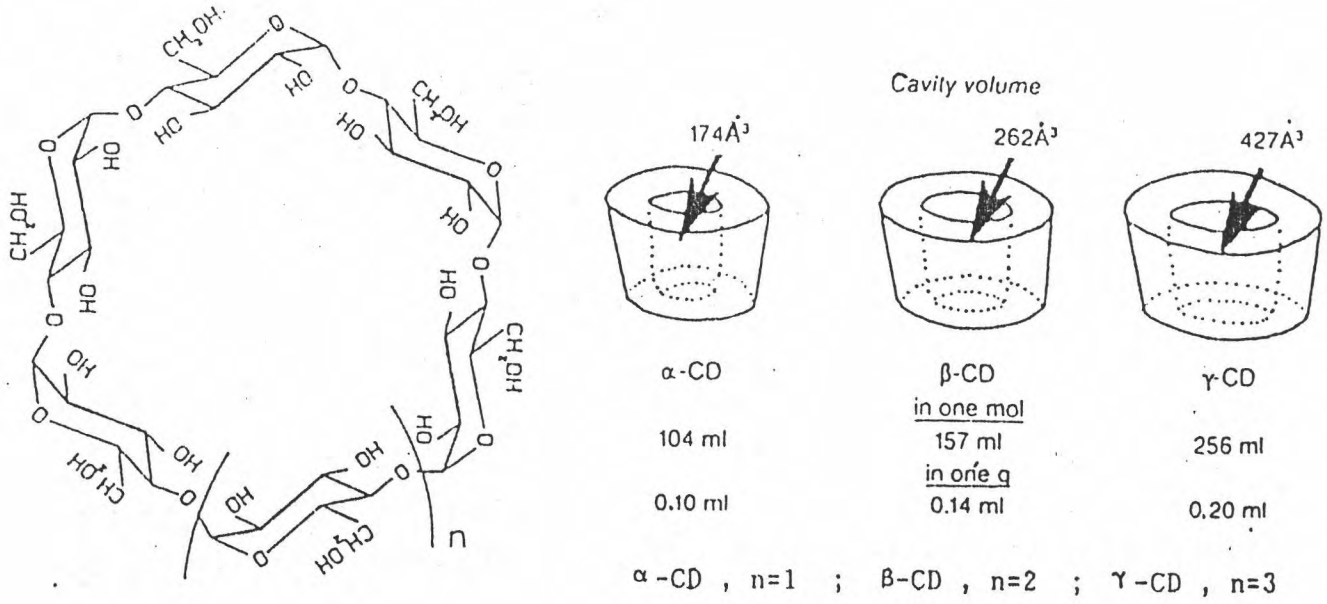
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrins, CDs) เป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ผลิตได้จากแป้งชนิดต่าง ๆ เช่น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเหนียว แป้งสาลี เป็นต้น Villiers เป็นผู้แยกสาร CD เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1891 (Starnes, 1990) Scharinger (1904) ได้รายงานว่าสาร CD ชนิด α - และ β - เป็นสารประกอบประเภท maltooligosaccharide มีโครงสร้างเป็นรูปวงแหวน (cyclic) และเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จาก Bacillus macerans ในขั้นแรกให้ชื่อสารที่ค้นพบว่า Scharinger dextrins ต่อมาจึงเรียกชื่อทางเคมีว่าไซโคลเดกซ์ทริน ในปี ค.ศ.1935 Freudenberg และ Jacobi รายงานการพบ CD ชนิด γ - เป็นครั้งแรก (Pulley A.O. และ French, 1961) จากการวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟฟีแบบกระดาษ (paper chromatography) และออโตเรดิโอกราฟฟี (Autoradiography) French และคณะ (1942, 1965) รายงานว่าสารไซโคลเดกซ์ทรินมีโครงสร้างเป็นวงแหวนปิด (closed ring structure) ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสอย่างน้อย 6 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 - glycosidic ปัจจุบันพบว่าสาร CD ที่เกิดในธรรมชาติมี 3 ชนิด คือ ไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-(cyclohexaamylose), β-(cycloheptaamylose) และ γ-(cyclooctaamylose) ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 6,7 และ 8 หน่วย ตามลำดับ (French และ Rundle, 1942 ; Frendenberg และ Cramer, 1948)

จากการศึกษาสมบัติทางเคมี - กายภาพ (physiochemical property) ของ CD โดยเทคนิคต่าง ๆ เช่น UV spectroscopy, NMR , X-ray crystallography, circular dichroism ฯลฯ พบว่าโมเลกุลของไซโคลเดกซ์ทรินเป็นผลึก (crystalline) มีลักษณะเป็นวงแหวน มีโพรงตรงกลางโมเลกุล (รูปที่ 1)

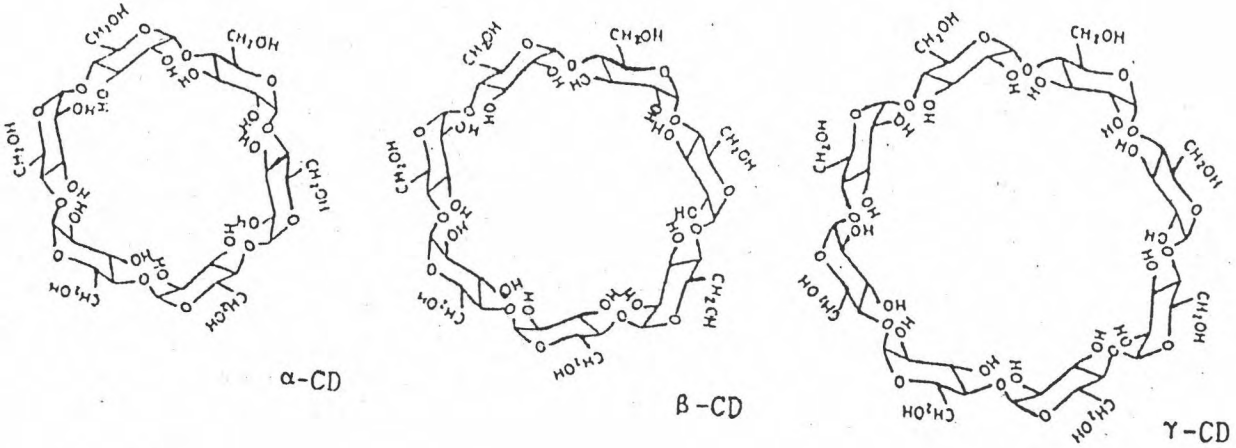


รูปที่ 1 โครงสร้างของสารไซโคลเดกซ์ทรินและโพรงว่างภายในโมเลกุล (Szejtli,1989)

พิจารณาจากโครงสร้างทางเคมี (รูปที่ 2) พบว่า จะหันหมู่ O-H ของกลูโคสซึ่งมีคุณสมบัติ hydrophilic เข้าหาสารละลายน้ำ ส่วนหมู่ C-H และหมู่ C-O-C ซึ่งมีคุณสมบัติ hydrophobic จะหันเข้าด้านในของโมเลกุล ดังนั้น CD จึงสามารถละลายได้ในน้ำหรือสารละลายโพลาร์ นอกจากนั้นด้วยเหตุที่ด้านในของโมเลกุลของ CD มีลักษณะไฮโดรโฟบิก โมเลกุลของสารประเภทไฮโดรโฟบิกซึ่งมีขนาดพอเหมาะกับโพรงว่างใน CD จะสามารถจับกับ CD ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน, แรงวาน เดอร์ วาลล์ (Van der Waals) และ Hydrophobic interactions เกิดเป็น inclusion complexes ได้ด้วยอัตราส่วน 1:1 (Komiyama และ Bender, 1984) และทำให้คุณสมบัติทางเคมีหรือทางกายภาพของสารที่ถูกจับเปลี่ยนไป จึงอาจนำไปใช้ในการรักษากลิ่น รส ลดความขม ลดการระเหย ลดการละลาย เพิ่มความเสถียร ตลอดจนใช้ขจัดสารที่ไม่ต้องการออกจากสารละลาย ฯลฯ ดังนั้นจึงสามารถนำ CD ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ หลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสากรรมยาและการขจัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสากรรม เป็นต้น (Szejtli, 1981; Fromming, 1981; Saenger, 1980) ตารางที่ 1 แสดงลักษณะและสมบัติต่าง ๆ ของสาร CD (Szejtli,1989)

ในจำนวน CD ทั้งสามชนิด β - CD เป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญและใช้มากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เนื่องจาก β - CD ละลายน้ำได้ดีกว่า α - และ γ - CD ในปัจจุบันได้มีความพยายามสร้างอนุพันธ์ของ α -, β - และ γ - CD เพื่อให้มีประโยชน์การใช้งานกว้างขวางยิ่งขึ้น

* การวิเคราะห์ CD ทำได้หลายวิธี เช่น โครมาโตกราฟฟีชนิดกระดาษ (paper chromatography) ใช้แยกชนิด CD ได้ แต่มีข้อเสียคือ ใช้เวลานาน 20-25 ชั่วโมงในการแยก (Takeo และคณะ,1970) โครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC) เป็นวิธีที่ใช้แยกชนิดของ CD ได้ดีและรวดเร็ว (Takeo และคณะ, 1970; Wolfrom และคณะ, 1964) High performance liquid chromatography (HPLC)ใช้แยกชนิดและหาปริมาณของสาร CD ได้ดี มีความไวสูง จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ CD ในปัจจุบัน (Zsadon และคณะ, 1979; Hokse, 1980)



<u>รูปที่ 2</u> โครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-,β- และ γ- ตามลำดับ (Starnes, 1990; Komiyama และ Bender, 1984)

ตารางที่ 1 ลักษณะและสมบัติต่าง ๆ ของไซโคลเดกซ์ทริน (Szejtli, 1989)

	ไซโคลเดกซ์ทริน		
	α	β	γ
จำนวนกลูโคส (หน่วย)	6	7	8
น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	973	1135	1197
ปริมาตรช่องว่าง (A°)	174	262	427
การละลายน้ำ (กรัม % ในน้ำ ที่ 25°ซ)	14.5	1.85	23.2

หรืออาจจะวิเคราะห์โดยให้ CD ทำปฏิกิริยาเคมีกับสารบางชนิด เช่น Phenolphtalein ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและราคาถูก แต่มีความไวและความจำเพาะสูงต่อ β - CD เท่านั้น (Vikmon, 1981)

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งเป็นไซโคลเดกซ์ทริน คือ เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทริน กลูคาโนทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glucanotransferase : CGTase, α-1,4-glucan -4- glucosyl - transferase ; E.C.2.4.1.19)

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์บาซิลลัส เช่น B. macerans (Depinto และ Campbell, 1968; Lane และ Pirt, 1973) B. circulans (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987; Okada และ Kitahata, 1973 ; Villette และคณะ, 1990) B. megaterium (Kitahata, Tsuyama และ Okada, 1974; Okada และ Tsuyama , 1974) B. sterothemophilus (Shiosaka และ Fumiya, 1973) Alkalophilic Bacillus sp. (Nakamura และ Horikoshi, 1976 ; Kanebo , Hamamoto และ Horikoshi, 1988) B. subtilis (Kato และ Horikoshi, 1986; Schmid, Huber และ Eberle, 1988) B. amyloliquefaciens (Yu, Aoki และ Misawa, 1988) Klebsiella pneumoniae (Bender, 1977) Klebsiella oxytoca (Binder, Huber และ Bock, 1986) แบคทีเรียเหล่านี้จะขับเอนไซม์ CGTase ออกนอกเซลล์ จึงนำมาศึกษาสมบัติของเอนไซม์ หรือเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ง่าย

จากการศึกษาโครงสร้างและบริเวณเร่งของโมเลกุล ทำให้ทราบว่ากลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase เป็น 3 แบบ คือ cyclization, coupling และ disproportionation (Bender, 1981) แสดงได้ด้วยปฏิกิริยา (1) และ (2)

$$glc_{(n)} \underset{\text{coupling}}{\overset{\text{cyclization}}{\rightleftharpoons}} glc_{(n-x)} + x \qquad (1)$$

x = 6, α - CD

x = 7, β - CD

x = 8, ϒ - CD

$$glc_{(m)} + glc_{(n)} \rightleftharpoons glc_{(m-x)} + glc_{(n+x)} \qquad (2)$$

(disproportionation)

$glc_{(m)}$, $glc_{(n)}$= 4-α-D-glucopyranosyl chains ;

m,n = α-D-glucopyranosyl residues ;

x = part(<glc_1) of a 4-α-D-glucopyranosyl chains

จากกลไกการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น สรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase (Okada,Sumio และ Kitahata, 1973)

cyclization	Starch ⟶ Cyclodextrin
coupling	Cyclodextrin + glucose ⟶ Oligosaccharide terminated at the reducing end by the added glucose
disproportionation	$(Oligosaccharide)_m + (Oligosaccharide)_n$ ⟶ various oligosaccharides

เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา cyclization ได้ดีเมื่อมีสับสเตรต (substrate) เป็นโมเลกุลลูกโซ่ของกลูโคส 16 - 80 หน่วย (residues) ถ้าโมเลกุลเป็นลูกโซ่น้อยกว่า 14 หน่วย เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา coupling ได้ดี แต่ถ้าสับสเตรตเป็นโพลีแซกคาไรด์ เช่น แป้ง หรือมีสับสเตรตมากเกินไปจะเกิดปฏิกิริยา disproportionation ก่อนปฏิกิริยา cyclization (Lloud และ Nelson , 1984)

เอนไซม์ CGTase เป็น inducible enzyme แบคทีเรียเหล่านี้จะผลิตเอนไซม์ CGTase เฉพาะเมื่อมีแป้งเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Bender, 1981) แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันจะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีต่างกัน เช่น ช่วง pH ของการทำงานของเอนไซม์ แบคทีเรียบางสายพันธุ์จะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีช่วง pH ของการทำงานกว้าง เช่น Bacillus No 38.2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้ในอุตสาหกรรม สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase 3 ชนิด

คือ acid CGTase, neutral CGTase และ alkaline CGTase ซึ่งทำงานได้ดีที่ pH 4.6, 7 และ 8.5 ตามลำดับ ส่วน B. maceran และ B. megaterium ผลิตเอนไซม์ที่มีการทำงานได้ในช่วง pH 5.0 - 5.7 เท่านั้น (Horikoshi และคณะ, 1981) เป็นต้น แบคทีเรียส่วนใหญ่ (มากกว่า 15 สายพันธุ์) จะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่ให้ผลิตภัณฑ์ α -CD (α-CGTase) และ β -CD (β-CGTase) ส่วน γ - CD (γ-CGTase) มีน้อย (Engbrecht และคณะ, 1990) มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ γ - CGTase เพียง 2 สายพันธุ์ คือ Bacillus subtilis No 313 (Kato และ Horikoshi, 1986) และ Alkalophilic Bacillus fermus/lentus 290-3 (Schmid, Huber และ Eberle, 1988) (ตารางที่ 3)

เอนไซม์ CGTase อาจเป็น multimeric enzyme แต่ส่วนใหญ่จะเป็นโพลีเพบไทด์สายเดี่ยว (Kitahata และ Okada, 1982; Nakamura และ Horikoshi, 1976; Villette และคณะ, 1990) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 50,000 - 88,000 ดาลตัน (Makela และคณะ, 1988) (ตารางที่ 4) และมีหลาย subsites (Bender, 1988; Villette และคณะ, 1990) ซึ่งทำหน้าที่ cyclization และ disproportionation

แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกันจะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่ให้อัตราส่วน α : β : γ - CD ต่างกัน เช่น บาซิลลัสบางสายพันธุ์อาจจำแนกได้ว่าเป็นประเภทกลุ่มที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ที่ให้ α -CD เป็นผลิตภัณฑ์ที่สำคัญ ได้แก่ B. macerans (DePinto และ Compbell, 1968; Kobayashi, Kainuma และ Suzuki, 1978) และ B. stearothermophillus (Sumio และ Okada, 1981) ซึ่งมีอัตราส่วน α : β : γ - CD เป็น 2.7 :1: 1 และ 1.7 :1: 0.3 สำหรับกลุ่มที่ผลิต β-CD ได้แก่ B. megaterium (Kitahata และ Okada, 1974) Alkalophilic Bacillus sp. No. 38-2 (Nakamura และ Horikoshi, 1976) B. circulans (Pongsawasdi และ Yakisawa, 1987) ซึ่งมีอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์เป็น 1 : 2.4: 1, 1 : 11.5: 1.5 และ 1 : 10.5 :0 ตามลำดับ นอกจากสายพันธุ์แบคทีเรียแล้ว

ตารางที่ 3 ผลิตภัณฑ์ CD ที่สำคัญและสมบัติบางประการของเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

	pH optimum	temperature optimum (°C)	cyclo-dextrin product	Reference
B.macerans IF 03490	5.2-5.7	55	Alpha	Okada และคณะ, 1975
B.stearothermophilus TC - 60	6.0	70	Alpha	Kitahata และ Okada 1982
B.amyloliquefaciens AL 35	6.0	60	Alpha	Ernest และคณะ, 1988
Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627	5	95	Beta	Starners และคณะ, 1990
Micrococcus sp. ATCC 31606	5.5-6.5 & 10.0	55-65	Beta	Yogi และคณะ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

	pH optimum	temperature optimum (°C)	cyclo-dextrin product	Reference
B.circulans ATTC 9995	7.0-9.0	55	Beta	Okada และ Kitahata, 1973
Alkalophilic Bacillus sp. ATCC 21783	4.5-5.0 & 7.5-8.0	50	Beta	Nakamura และ Horikoshi 1976
B.megaterium var T 5	5.2-6.2	55	Beta	Kitahata และ Okada 1974
Bacillus sp. IT 25	5.5	70	Beta	Starners, 1990
B.subtilis No 313	8.0	65	Gamma	Kato และ Horikoshi 1986
B.fermus/lentus No 290-3	6.0-8.0	50	Gamma	Kitahata และ Okada 1982

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ CGTase จากบาซิลลัสสายพันธุ์ต่าง ๆ หลังจากแยกเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์แล้ว (Kitahata และ Okada , 1982)

	B.stearo-thermophillus	B.Megaterium		B.circulans		B.macerans IFO 3490
		Fr.1[a]	Fr.2[b]	Fr.1	Fr.2	
Isoelectric point	4.45	6.07	6.80	5.80	6.60	4.60
Opt. pH	6.1	5.2-6.2		5.2-5.7		5.2-5.7
Opt. Temp.	70°C	55°C		55°C		55°C
pH stability	7.0-9.2	7.0-10.0		7.0-9.0		8.0-10.0
Heat stability	50°C	55°C		55°C		55°C
MW (native)	70,000[c]	66,000		-		65,000
MW (subunit)	68,000	75,000[d]		-		75,000[d]

a) Fraction 1

b) Fraction 2

c) the value determined by sedimentation velocity

d) the value determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

การผลิตสาร CD ยังขึ้นกับความเข้มข้นของแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่บ่ม การปรับสภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ให้เหมาะสมจะทำให้ได้ผลผลิตไซโคลเดกซ์ทรินสูงขึ้น (Starnes ,1990)

ได้มีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ในปริมาณที่สูง โดยอาศัยเหตุผลที่แบคทีเรียบางชนิดสามารถชักนำให้ผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เช่น Kaneko และคณะ นำยีนของ CGTase จาก Alkalophilic Bacillus sp. No.38-2 เข้า E. coli โดยใช้ pBR 322 เป็นพาหะ (Kaneko, Hamamoto และ Horikoshi, 1988) หรือมีผู้พยายามนำยีนของ CGTase จาก B. macerans เข้าสู่ B. subtilis ด้วยพลาสมิด pUB 110 (Takano และคณะ, 1986)

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีผลผลิตที่ใช้เป็นวัตถุดิบของแป้งที่สำคัญ เช่น ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวเหนียว มันสำปะหลัง การนำเอาผลผลิตเหล่านี้มาพัฒนาและเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจ (value added) เช่น นำแป้งชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ไปเปลี่ยนเป็นไซโคลเดกซ์ทรินจึงมีประโยชน์มากและมีศักยภาพสูง การวิจัยในต่างประเทศโดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นเกี่ยวกับการนำไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี ดังจะเห็นได้ว่า มีการจดทะเบียนลิขสิทธิ์เกี่ยวกับกระบวนการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินเพิ่มขึ้นอย่างมากมาย และมีการกระจายการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในอุตสาหกรรมหลายชนิด ดังตารางที่ 5

งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ปริมาณสูง หาสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้เหมาะสม ตลอดจนศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ CGTase เพื่อเป็นฐานข้อมูลสำหรับการนำไปผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจำนวนมากจากแป้งซึ่งจะเน้นการใช้แป้งที่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตรภายในประเทศไทยเป็นหลัก

ตารางที่ 5 การนำผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ ในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่ปี ค.ศ.1984-1987 (หน่วยเป็นตัน) (Hashimoto ,1990)

Year	Manufacturing process	Uses					
		Foods	Pharmaceuticals	Cosmetics	General industries	Others	Total
1984	3	16	33	2	15	7	76
1985	10	35	18	2	41	3	109
1986	20	20	31	11	50	8	145
1987	15	17	18	10	35	4	99
total	48	88	105	25	141	22	429

ขั้นตอนของงานวิจัยนี้คือ

1. ตรวจ และคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกจากดินในประเทศไทยที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ในปริมาณสูง

2. ศึกษาและปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ในปริมาณสูงโดยใช้แป้งชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรของไทย

3. ทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์บางส่วน (partial purification)

4. ศึกษาสมบัติทางด้านกายภาพและชีวเคมีของเอนไซม์ CGTase ที่แยกได้

017217