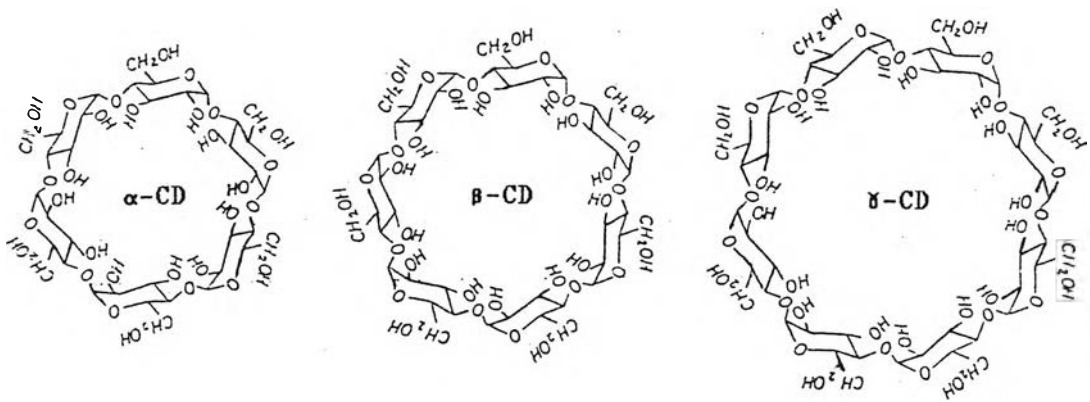


ต้นฉบับ หน้าขาดหาย



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

(Starnes, 1990)

ตารางที่ 1 แสดงสมบัติของ CDs ที่ได้จากการศึกษาสมบัติทางเคมี-กายภาพ (physicochemical property) โดยเทคนิคต่างๆ เช่น UV spectroscopy, NMR, X-ray crystallography, circular dichroism ฯลฯ โมเลกุลของ CDs มีลักษณะเป็นวงแหวนมีโพรงตรงกลางดังแสดงไว้ในรูปที่ 1 จากโครงสร้างทางเคมีพบว่า CDs จะหันหมู่ -OH ของกลูโคส ซึ่งมีคุณสมบัติ hydrophilic เข้าหาน้ำ ส่วนหมู่ C-H และ หมู่ C-O-C ซึ่งมีสมบัติ hydrophobic จะหันเข้าด้านในซึ่งเป็นโพรงของโมเลกุล ดังนั้น CDs จึงสามารถละลายได้ในน้ำหรือสารละลายโพลาาร์ และด้วยสมบัติของ CDs ซึ่งมีโพรงไฮโดรโฟบิก จึงทำให้โมเลกุลของสารประเภทไฮโดรโฟบิกที่มีขนาดพอเหมาะกับโพรงใน CDs สามารถจับกับ CDs ได้ด้วยพันธะไฮโดรเจน, แรงวานเดอร์วาลส์ (Van der Waals) และ Hydrophobic interactions เกิดเป็น inclusion complexes ได้ด้วยอัตราส่วน 1:1 (Komiya และ Bender, 1984) ทำให้คุณสมบัติทางเคมี และ/หรือ ทางกายภาพของสารนั้นเปลี่ยนไป จึงสามารถนำ CDs มาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมายเช่น ช่วยป้องกันการเสียสภาพของสารต่างๆโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation reaction) จากแสง UV, การเพิ่มความสามารถในการละลายของสารประกอบประเภทไฮโดรโฟบิกในสารละลายโพลาาร์หรือน้ำ, ช่วยทำให้สารระเหย (volatile compounds) ประเภทต่างๆมีความเสถียรมากขึ้นในรูปของแข็ง, สามารถเปลี่ยนปฏิกิริยาทางเคมีของสารประเภทต่างๆ, ช่วยเปลี่ยนรูปของของเหลวไปอยู่ในรูปผง (powders) และยังสามารถช่วยปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของอาหารประเภทต่างๆได้ด้วย ฯลฯ นอกจากนี้ยังสามารถสร้าง CDs ให้อยู่ในรูป stereospecific complexes เพื่อใช้ประโยชน์ในการแยก enantiomers ของสารชนิดต่างๆออกจากกันได้ CDs และอนุพันธ์ของ CDs มีความเป็นพิษ (toxicity) ต่ำ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำ CDs มาใช้งานทางด้านอาหารและยา จึงมีผู้นำ CDs ไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆหลายประเภทเช่น อุตสาหกรรมยา ,

ตารางที่ 1 สมบัติของไซโคลเดกซ์ทริน (Szejtli, 1988)

|   | $\alpha$            | $\beta$                          | $\gamma$            |
|---|---------------------|----------------------------------|---------------------|
| No. of glucose units                    | 6                   | 7                                | 8                   |
| Molecular weight                        | 972                 | 1135                             | 1297                |
| Solubility in water g/100ml             |                     |                                  |                     |
| at ambient temp.                        | 14.5                | 1.85                             | 23.2                |
| Cavity diameter $\text{\AA}$            | 4.7-5.3             | 6.0-6.5                          | 7.5-8.3             |
| Height of <u>torus</u> $\text{\AA}$     | 7.9+0.1             | 7.9+0.1                          | 7.9+0.1             |
| Dia. of periphery $\text{\AA}$          | 14.6+0.4            | 15.4+0.4                         | 17.5+0.4            |
| Vol. of cavity (approx.) $\text{\AA}^3$ | 174                 | 262                              | 472                 |
| Cavity vol. (approx.) ;                 |                     |                                  |                     |
| per mol CD.        mls                  | 104                 | 157                              | 256                 |
| per 1 g CD.        mls                  | 0.1                 | 0.14                             | 0.20                |
| Crystal forms (from water)              | hexagonol<br>plates | monoclinic<br>parallelo-<br>gram | quadratic<br>prisms |
| Crytallographic params.                 |                     |                                  |                     |
| $C_1-O_4-C_4$ angle $^\circ$            | 119.0               | 117.7                            | 112.6               |
| $\phi/\psi^\circ$                       | 116/-169            | 169/-172                         | 165/-169            |



ตารางที่ 1 (ต่อ)

|   | $\alpha$   | $\beta$   | $\gamma$  |
|---|------------|-----------|-----------|
| $O_4 \dots O_4$ , distance $\text{\AA}$ | 4.23       | 4.39      | 4.48      |
| $O_2 \dots O_3$ , distance $\text{\AA}$ | 3.00       | 2.86      | 2.81      |
| 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 <i>A. oryzae</i>          |            |           |           |
| $\alpha$ - amylase                      | negligible | slow      | rapid     |
| $V_{max}$ value $\text{min}^{-1}$       | 5.8        | 166       | 2,300     |
| Relative <u>permittivity</u> # ;        |            |           |           |
| 1.                                      | 47.5       | 52.2      | 70.0      |
| 2.                                      | -          | 29.5      | 39.5      |
| pK (by potentiometry) @ 25 °C           | 12,312     | 12,202    | 12,081    |
| Partial molar volumes in                |            |           |           |
| solubility                              | 611.4      | 703.8     | 801.2     |

- \* 1. On incorporating the toluidinyl group of 6-p-toluidynil-naphthalene-2-sulphonate at pH=5.3 and 25 °C
2. On incorporating the naphthalene group

อุตสาหกรรมอาหาร, อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง, การขจัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม และบ้านเรือน, อุตสาหกรรมยาฆ่าแมลง, เคมีวิเคราะห์ และการวินิจฉัยโรค (Saenger, 1980; Szejtli, 1981; Froming, 1981; Szejtli, 1988 และ Schmid, 1989) ดังแสดงในตารางที่ 2, 3 และ 4

ในจำนวน CDs ทั้งสามชนิดที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ พบว่า CD ที่มีความเสถียรมากที่สุด คือ  $\beta$ -CD เพราะหมู่ -OH ของ C<sub>2</sub> ของแต่ละ glucopyranose unit สามารถที่จะสร้างพันธะไฮโดรเจน กับหมู่ -OH ของ C<sub>5</sub> ของ glucopyranose unit ที่อยู่ติดกันได้ เกิดลักษณะที่เรียกว่า secondary belt ของพันธะไฮโดรเจน ทั้ง 7 พันธะ ซึ่งทำให้โมเลกุลของ  $\beta$ -CD เสถียรยิ่งขึ้น ในขณะที่โมเลกุลของ  $\alpha$ -CD มี glucopyranose unit หนึ่งหน่วยอยู่ในตำแหน่งที่บิดงอ (distorted position) จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนได้เพียง 4 พันธะ จากทั้งหมดที่ควรจะเป็น 6 พันธะ ส่วนในกรณีของ  $\gamma$ -CD พบว่ามีขนาดของโพรงใหญ่ขึ้นทำให้โมเลกุลของน้ำเข้าไปภายในโพรงมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความยืดหยุ่นมากขึ้น จากเหตุผลข้างต้นจะเห็นได้ว่า  $\beta$ -CD มีความเสถียรมากที่สุด และยังเป็นเหตุผลที่ใช้อธิบายได้ว่า  $\beta$ -CD ละลายน้ำได้น้อยที่สุดใน CDs ทั้งสามชนิด (Szejtli, 1988) การเตรียม inclusion complex จาก  $\beta$ -CD สามารถเตรียมได้ง่ายและมีความเสถียรมาก ดังนั้น  $\beta$ -CD จึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆมากที่สุด

ตารางที่ 2 การนำผลิตภัณฑ์ไซโคลเดร็กซ์ทรินไปใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ ในประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่ปี ค.ศ.1984-1987 (หน่วยเป็นตัน) (Hashimoto, 1988)

| Year  | Manufac<br>turing<br>process | Foods | Pharma<br>ceuti-<br>cals | Cosme<br>tics | General<br>indus-<br>tries | 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   |

ตารางที่ 3 Method and patent for cyclodextrin production. (Szejtli, 1988)

| Patent                 | Starch conc. | Prehydrolysis     | Complexing agent                          | Recovery of form CD   | Major product | Comments |
|------------------------|--------------|-------------------|---|---|---------------|----------|
| Armbruster et al, 1969 | potato, 30%  | amylase           | toluene                                   | remaining starch after<br>evap. toluene hydrolysed,<br>$\alpha$ -amylase      | $\beta$ -CD   |          |
| Armbruster et al, 1970 |              | amylase           |   | mixture contained<br>45% $\alpha$ -, 55% $\beta$ -CD, sepn,<br>by cyclohexane | $\alpha$ -CD  |          |
| Hitaka et al, 1971     | potato, 5%   |                   | anion excheanger<br>Diaion S-200          | CD absorbed on ion exch.<br>eluted by aq. NaOH or HCl                         |               |          |
| Armbruster et al, 1972 | potato, 30%  | $\alpha$ -amylase | 1-decanol, 1-butanol<br>other appropriate | $\alpha$ -CD- trichloroethylene<br>complex                                    | $\beta$ -CD   |          |



ตารางที่ 3 (ต่อ)

| Patent                        | Starch conc.                      | Prehydrolysis             | Complexing agent  | Recovery of form CD                               | Major product | Comments                                     |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------|---|---------------|--|
| Hayashibara et al, 1973       | 10% soluble<br>starch or<br>maize |                           | trichloroethylene | ppt. with bromobenzene                            | $\beta$ -CD   |  |
| Sato et al, 1974              | 5-30%                             | amylase or<br>oxalic acid | trichloroethylene |   | mixture       | yield improved<br>by pullulanase<br>addition |
| Holikoshi et al, 1974         | potato, 10%                       | in NaOH                   |                   | ppt. with $\text{CHCl}_3$                         | mixture       |  |
| Suzuki et al, 1975            |                                   |                           |                   | crystalization                                    | $\beta$ -CD   |  |
| Yoritomi and Yoshida,<br>1975 | potato, 5%                        |                           |                   | hydrolysis by amylase<br>sepn. by anion exchanger |               |  |

ตารางที่ 3 (ต่อ)

| Patent                | Strach conc. | Prehydrolysis     | Complexing agent   | Recovery of form CD           | Major product | Comments                        |
|-----------------------|--------------|-------------------|--------------------|-------------------------------|---------------|---------------------------------|
| Suzuki et al, 1977    | maize, 3%    |                   |                    | hydrolysis by<br>glucoamylase | $\beta$ -CD   | 70% yield on<br>add pullulanase |
| Kawano et al, 1977    | potato, 23%  | CGT               |                    | hydrolysis by<br>glucoamylase | $\beta$ -CD   |                                 |
| Kobayashi et al, 1977 | potato, 5%   |                   | Na lauryl sulphate | ppt. by acetone               | $\alpha$ -CD  |                                 |
| Holikoshi et al, 1978 | maize, 1%    |                   |                    | spray drying                  | mixture       |                                 |
| Holikoshi et al, 1979 | potato, 4%   | CGT               | glucoamylase       |                               |               |                                 |
| Vakaliu et al, 1979   | potato, 33%  | $\alpha$ -amylase | toluene            | as toluene complex            | $\beta$ -CD   |                                 |

ตารางที่ 3 (ต่อ)

| Patent                | Strach conc. | Prehydrolysis | Complexing agent                                       | Recovery of form CD  | Major product                       | Comments   |
|-----------------------|--------------|---------------|--|--|-------------------------------------|--|
| Kenkyushu et al, 1980 | potato, 4%   | CGT           |  | hydrolysis by<br>glucoamylase CD adsorbed<br>on ion exchanger column | $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -CD | chromatographic<br>sepn. at low<br>concentration |
| Toyo Jozo, 1980       | potato, 25%  |               | C <sub>1-8</sub> aliphatic<br>or C <sub>2-4</sub> =C=O |  | mixture                             |  |
| Kobayashi et al, 1980 | maize, 20%   |               |  | crystallisation<br>at 3-5 °C overnight                               | mixture                             |  |
| Tagi et al, 1980      |              |               | trichloroethylene                                      | as trichloroethylene<br>complex                                      | $\beta$ -CD                         | conversion with<br>Micrococcus<br>varians CGT    |

ตารางที่ 3 (ต่อ)

| Patent                         | Strach conc.     | Prehydrolysis           | Complexing agent | Recovery of form CD   | Major product | Comments                                   |
|--------------------------------|------------------|-------------------------|------------------|---|---------------|--|
| Japan maize, 1980              | 15% $\beta$ -CD+ |                         |                  | hydrolysis of $\beta$ + $\alpha$ -CD<br>by amylase, $\gamma$ -CD ppt.<br>by tetrachloroethane | $\alpha$ -CD  | $\beta$ -CD + glucose<br>treat with<br>CGT |
| Avebe, 1981                    | potato, 20%      | jet cooker<br>at 150 °C |                  | conversion performed<br>in membrane reactor<br>with continuous UF                             | $\beta$ -CD   |  |
| Horikoshi et al, 1982          | potato, 20%      | CGT                     |                  | UF, reverse osmosis   | mixture       |  |
| Min,Agr,For,Fish, 1982         | potato, 10%      |                         |                  | UF, reverse osmosis   | mixture       |  |
| Flashchel et al, 1982;<br>1984 |                  |                         | decanol          |   | $\alpha$ -CD  |  |

ตารางที่ 3 (ต่อ)

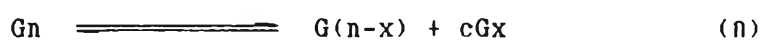
| Patent                     | Strach conc. | Prehydrolysis     | Complexing agent                                       | Recovery of form CD  | Major product                 | Comments                            |
|----------------------------|--------------|-------------------|--|--|-------------------------------|-------------------------------------|
| Seres et al, 1983          | maize, 33%   | $\alpha$ -amylase | MEK + anionic<br>surfactant<br>MEK + $\alpha$ -naphtol | ppt. by cyclohexane  | $\alpha$ -CD+<br>$\alpha$ -CD |                                     |
| Norin et al, 1983          |              |                   |  |  |                               | prep, Cl containing starch gel      |
| Japan maize, 1984          | potato, 25%  | CGT               |  | utilise two diff. CGT enzymes, <i>B. macerans</i> + <i>B. No. 38-2</i> |                               | better yield                        |
| Bender et al, 1984         | potato, 15%  |                   | bromobenzene   |  | $\alpha$ -CD                  | <i>Klebsiella pneumoniae</i> CGT    |
| Morin S, Shokuhin,<br>1984 |              |                   | alkaline earth<br>metal OH ppts,<br>acyclic dextrins   | filtrate treated by CO <sub>2</sub>                                    |                               | for sepn. of<br>CDs from<br>dextrin |

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณการใช้ CDs ในตลาดโลก (Schmid, 1989)

| Application   | Market (ton year <sup>-1</sup> ) |      |
|---|----------------------------------|------|
|   | Expected for                     |      |
|   | 1989                             | 1995 |
| Pharmaceuticals   | 50                               | 2000 |
| Food  | 700                              | 2500 |
| Cosmetics   | 50                               | 500  |
| Agriculture   | 10                               | 100  |
| Chemical industry (biotransformations,<br>separation and catalysis) | 30                               | 300  |
| Other purpose (e.g. diagnostics)                                    | 10                               | 200  |

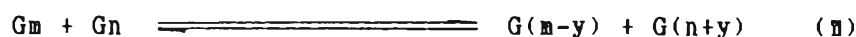
เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งเป็น CDs คือ เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินกลูคาโนทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glucanotransferase : CGTase,  $\alpha$ -1, 4-glucan-4-glycosyl-transferase ; E.C. 2.4.1.19) จากการศึกษาโครงสร้างและบริเวณเร่งของโมเลกุลเอนไซม์ ทำให้แบ่งกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase ออกเป็น 3 แบบ คือ cyclization, coupling และ disproportionation (Bender, 1981) โดยมีปฏิกิริยา cyclization เป็นปฏิกิริยาที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ CDs ดังแสดงในปฏิกิริยา (ก) และ (ข)

cyclization



coupling

disproportionation



$G_m, G_n = \alpha$ -1, 4-D-glucopyranosyl chains

$m, n, y = \alpha$ -D-glucopyranosyl residues

$cG_x =$  cyclodextrin ( $x = 6, 7$  or  $8$ )

จากกลไกการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 5

การศึกษาการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase จาก *Klebsiella pneumoniae* พบว่าเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา cyclization ได้ดีที่สุดเมื่อสับสเตรตเป็นโมเลกุลลูกโซ่ของกลูโคส 16-80 หน่วย โดยเอนไซม์ CGTase จะเข้าจับกับสับสเตรตทางด้านปลาย non-

ตารางที่ 5 สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์ CGTase (Okada และ Kitabata, 1975)

| Reaction           | Action   |
|--------------------|--|
| cyclization        | starch $\longrightarrow$ cyclodextrins   |
| coupling           | cyclodextrin + glucose $\longrightarrow$ oligosaccharide<br>terminated at the reducing end by the added<br>glucose |
| disproportionation | $(\text{oligosaccharide})_m + (\text{oligosaccharide})_n \longrightarrow$<br>various oligosaccharides              |



reducing แต่ถ้าสับสเตรตเป็นลูกโซ่ที่ยาวมากกว่า 100 หน่วยขึ้นไป จะเป็นสับสเตรตที่ไม่ดีสำหรับการเกิดปฏิกิริยา cyclization ทั้งนี้จะเป็นเพราะรูปร่างของสับสเตรตที่มีความยาวมากจนจะมีรูปร่างเป็นเกลียว (Bender, 1981 ; Bender, 1985) ในสภาวะเช่นนี้ จะเกิดปฏิกิริยา disproportionation แทน ซึ่งปฏิกิริยานี้คล้ายกับปฏิกิริยาในการย่อยแป้งของเอนไซม์  $\alpha$ -amylase นั้นเอง จากนั้นจึงเกิดปฏิกิริยา cyclization ต่อไป เมื่อสับสเตรตมีความยาวสั้นลง (Lloyd และ Nelson, 1984) ถ้าสับสเตรตมีความยาวน้อยกว่า 14 หน่วย จะไม่เกิดปฏิกิริยา cyclization แต่เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา coupling ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสายลูกโซ่ที่ยาวขึ้นก่อน เพื่อให้เหมาะที่จะเป็นสับสเตรตของปฏิกิริยา cyclization ต่อไป (Szejtli, 1988)

มีการศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของ disproportionation พบว่า maltose ไม่สามารถใช้เป็นสับสเตรตได้ maltopentaose เป็นโมเลกุลสายสั้นที่สุดที่ใช้เป็นสับสเตรตได้ พบว่าปฏิกิริยา disproportionation จะเกิดได้ดีเมื่อสับสเตรตมีความยาวมากกว่า 100 หน่วยขึ้นไป ส่วน malto-oligomer สายสั้นๆ เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ต่อปฏิกิริยา cyclization โดยความแรงของการเป็นตัวยับยั้งจะเพิ่มขึ้นจาก maltose, maltotriose และ maltotetraose ตามลำดับ และจะลดลงตามความยาวของลูกโซ่ที่เพิ่มขึ้น D-glucose ไม่มีผลต่อปฏิกิริยา cyclization แต่จะทำหน้าที่เป็นตัวรับ (acceptor) สำหรับปฏิกิริยา disproportionation (Szejtli, 1988)

#### สรุปการเร่งปฏิกิริยาของ CGTase กับสับสเตรตชนิดต่างๆในตารางที่ 6

ในปี ค.ศ.1988 Bender ได้เสนอแบบจำลอง (model) ของกลไกการเกิดปฏิกิริยา cyclization ของ  $\alpha$ -CGTase จาก *Klebsiella oxytoca* M5a1 (*Klebsiella pneumoniae* M5a1) โดยเสนอว่าบริเวณเร่งปฏิกิริยาสำหรับปฏิกิริยา cyclization จะประกอบไปด้วย 8-10 บริเวณ หรืออาจจะมีมากกว่านี้ โดยแต่ละบริเวณเรียกว่า subsite และในการเข้าทำปฏิกิริยาเอนไซม์ CGTase จะเข้าจับกับสับสเตรตทางด้านปลาย non-reducing แบบ exo-attack กับ กลูโคส 8-10 หน่วย (หรืออาจมากกว่านี้) แล้ว

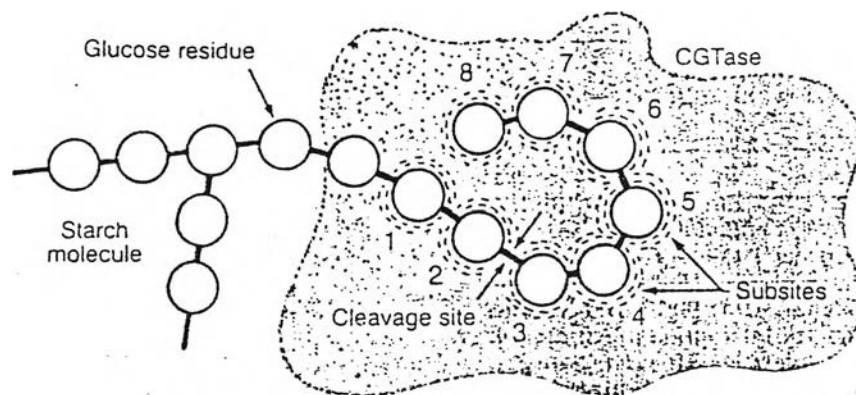
ตารางที่ 6 สรุปความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลูกโซ่ของสับสเตรตกับการเร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น  
ของเอนไซม์ CGTase (Szejtli, 1988)

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

เอนไซม์จะตัดลูกโซ่ของสับสเตรตระหว่างบริเวณ subsite ที่ 2 และ 3 (รูปที่ 2) ซึ่งจะ  
 ได้ maltohexaose ออกมาเป็นสารตัวกลาง (intermediate) โดยปลาย reducing จับ  
 กับ aspartyl group ของเอนไซม์ด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ในขณะที่อีกด้านที่  
 ปลาย non-reducing ของ maltohexaose จะเข้ามาจับกับบริเวณ subsite ที่ 2 แล้ว  
 สร้างพันธะ  $\alpha$ -1, 4-glycosidic พันธะระหว่างกลูโคสตัวที่ 1 และ 6 ของ maltohexaose  
 เกิดเป็น  $\alpha$ -CD ขึ้นมา เนื่องจาก active site ของเอนไซม์ไม่มีความจำเพาะอย่าง  
 สมบูรณ์ (absolute specificity) ต่อความยาวของลูกโซ่สับสเตรต ดังนั้นเอนไซม์  
 $\alpha$ -CGTase จึงสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็น  $\beta$ - และ  $\gamma$ -CD ได้เช่นกัน (Bender, 1988 ;  
 Schmid, 1989)

การศึกษาลำดับของกรดอะมิโนบริเวณ N-terminal ของเอนไซม์ CGTase เมื่อ  
 เทียบกับเอนไซม์  $\alpha$ -amylase พบว่ามีบริเวณที่คล้ายกัน 3 บริเวณ ซึ่ง Kimura และคณะได้  
 เสนอว่าน่าจะเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง ส่วนทางด้านปลาย C-terminal คาด  
 ว่าทำหน้าที่ในส่วนของปฏิกิริยา cyclization (Kimura และคณะ, 1989)

เอนไซม์ CGTase เป็น inducible enzyme โดยมีแป้งเป็นตัวชักนำ (inducer)  
 แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์บาซิลลัส (Bender,  
 1981; Schmid, 1989) แบคทีเรียในแต่ละสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase จะให้ผลิตภัณฑ์  
 CDs ทั้งสามชนิดในสัดส่วนที่แตกต่างกันเช่น *Bacillus macerans*, Alkalophilic  
*Bacillus* sp. No.38-2 (ATCC 21783) และ *Bacillus megaterium* จะให้  $\alpha$ -,  
 $\beta$ - และ  $\gamma$ -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) จึงแบ่งกลุ่มแบคทีเรียออกเป็น 3  
 กลุ่มตามชนิดของ CDs ที่แบคทีเรียผลิตออกมาเป็นส่วนใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่ม  $\alpha$ -CD ได้แก่  
*Klebsiella oxytoca* M5a1, *Bacillus macerans* และ *Bacillus stearo*  
*thermophilus*, กลุ่มที่ 2 กลุ่ม  $\beta$ -CD ได้แก่ *Bacillus circulans*, *Bacillus*  
*megaterium*, Alkalophilic *Bacillus* sp. No. 38-2 และ Alkalophilic



รูปที่ 2 แบบจำลองกลไกการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -CGTase จาก

*Bacillus oxzytoca* M5a1 (Bender, 1988)



*Bacillus* sp. No. 17-1 และกลุ่มที่ 3 กลุ่ม  $\alpha$ -CD ได้แก่ *Bacillus subtilis* No. 313 และ Alkalophilic *Bacillus* 290-3 (Schmid, 1989) นอกจากนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆจะผลิตเอนไซม์ CGTase ที่มีสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีต่างกันเช่น Alkalophilic *Bacillus* sp.No.38-2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้ในอุตสาหกรรมสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีช่วง pH ของการทำงานได้กว้างคือทำงานได้ดีที่ pH 4.6, 7.0 และ 8.5 ตามลำดับ ส่วน *B. macerans* และ *B. megaterium* ผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วง pH 5.0-5.7 (Horikoshi และคณะ, 1981) คุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ CGTase ที่สร้างจากสายพันธุ์ต่างๆได้สรุปแสดงไว้ในตารางที่ 7

ในปี ค.ศ.1987 Pongsawasdi และ Yagisawa ทำการตรวจสอบหาสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ CGTase จากแบคทีเรียที่แยกจากดินในแถบเอเชียอาคเนย์ทั้งหมด 14 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ *Bacillus* A<sub>11</sub> สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น  $\beta$ -CD และมี  $\alpha$ -CD เล็กน้อย (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987) ต่อมาวัลยา (พศ.2534) ได้ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของ *Bacillus* A<sub>11</sub> ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้ง 1-5 กรัมเปอร์เซ็นต์ วัลยาพบว่าแป้งข้าวเจ้า, แป้งข้าวโพด และ soluble starch เหนียวนาให้สร้างเอนไซม์ CGTase ได้ดีกว่า แป้งข้าวเหนียว, แป้งมันสำปะหลัง และ แป้งข้าวสาลี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ CGTase คือ 6.0 และ 40-50 °C ตามลำดับ และสามารถเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์โดยการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ จากการทำเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิลเลคโตรโฟรีซิสพบว่าเอนไซม์ CGTase เป็นเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 72,000 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์สารไซโคลเดกซ์ทรินที่เป็นผลิตภัณฑ์โดยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography) และ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) พบว่าเป็นชนิด  $\beta$ -CD (วัลยา, 2534)

ตารางที่ 7 แสดงคุณสมบัติของเอนไซม์ CGTase ที่สร้างจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ (Szejtli, 1988)

|                                  | Optimum pH | Optimum temp.<br>°C | Mol. weight | Isoel. point | Stable pH | Stable temp.<br>°C |
|----------------------------------|------------|---------------------|-------------|--------------|-----------|--------------------|
| <i>B. macerans</i> IFO 3490      | 5.0-5.7    | 55                  | 65000       | 4.6          | 8.0-10.0  | 60                 |
| <i>B. macerans</i> IMA 1243      | 6.0        | 60                  | 14500       |              | 5.5-9.5   | 50                 |
| <i>B. macerans</i> ATCC 8514     | 6.2        |                     | 139300      |              |           |                    |
| <i>B. macerans</i> CHINOIN       | 5.9        | 60                  | 72000       | 4.45-4.65    | 5.0-8.0   | 60                 |
| <i>B. megatherium</i>            | 5.0-5.7    | 55                  | 66000       | 6.07-6.80    | 7.0-10.0  | 55                 |
| <i>B. stearothermophilus</i>     | 5.0-5.5    |                     |             |              | 5.5-8.8   | 70                 |
| <i>B. criculans</i>              | 6.0-6.5    |                     |             |              | 7.5-9.0   | 60                 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>     | 5.2        |                     |             |              | 5.0-7.5   | 50                 |
| Alkalophilic bac. No. 38-2       | 4.5-9.0    | 45-50               | 85-88000    | 5.4          | 6.0-10.0  | 65                 |
| Alkalophilic bac. No. 17-1       | 5.0-9.0    |                     |             |              | 6.5-10.0  |                    |
| <i>B. ohbensis</i>               | 5.5        |                     |             |              |           |                    |
| <i>Micrococcus varians</i> M 849 | 6.0        | 50-60               |             |              |           |                    |

ในปัจจุบันทั้งๆที่ CDs มีศักยภาพสูงในการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมด้านต่างๆแต่ยังพบว่าตลาดการใช้ CDs ยังอยู่ในวงจำกัด เนื่องมาจากปัญหาสำคัญสองประการคือ ประการแรก CDs มีราคาแพง และประการที่สอง  $\alpha$ - และ  $\beta$ - CD ที่ผลิตได้ในปัจจุบันยังมีปริมาณต่ำมาก สำหรับปัญหาเรื่องราคาที่สูงนั้นสามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตให้สูงขึ้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิต ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีการหนึ่งซึ่งมีศักยภาพสูงและเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบันคือ การขยายยีน (gene cloning)

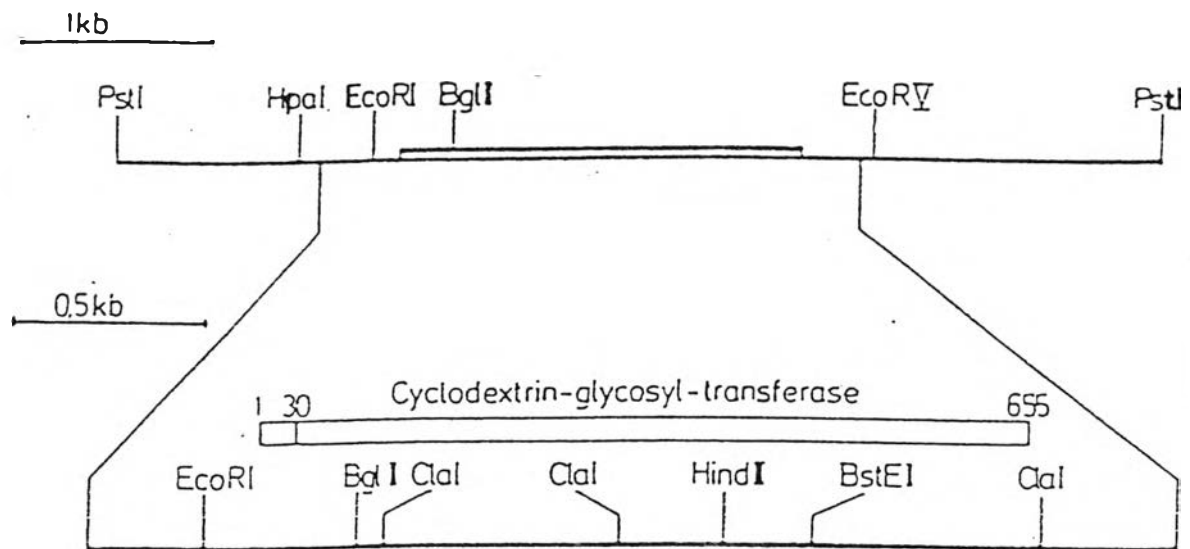
ในช่วงระยะเวลาไม่กี่ปีมานี้ได้มีการค้นคว้าในการโคลน CGTase gene ชนิดต่างๆกันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในประเทศญี่ปุ่นและเยอรมัน ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนจากตารางที่ 8 ที่ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase และการขยาย CGTase gene จากแบคทีเรียเหล่านี้ รูปที่ 3-10 แสดงถึง restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ถูกสร้างขึ้น

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต CGTase กลุ่มของ Binder และ Schmid ที่มหาวิทยาลัยมิวนิค ประเทศเยอรมัน ได้ศึกษาร่วมกันโดยนำ  $\alpha$ -CGTase และ  $\beta$ -CGTase gene ที่ได้จาก *K. oxytoca* M5a1 (formerly *K. pneumoniae* M5a1) และ Alkalophilic *Bacillus* 1-1 มาต่อกับ *tac* promoter ซึ่งเป็น strong promoter และนำส่งเข้าไปในเซลล์เจ้าเรือน *E. coli* ซึ่งถูกทำให้กลายเป็น *lac* เพื่อให้ทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้จับเอนไซม์ CGTase ออกนอกเซลล์แทนที่จะอยู่ที่ periplasmic space เหมือนใน *E. coli* ทั่วไป Binder และ Schmid พบว่าทรานสเฟอร์แมนท์ที่ได้ผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น 20-25 เท่า เมื่อเทียบกับ *K. oxytoca* M5a1 และ Alkalophilic *Bacillus* 1-1 ในขณะที่นักวิจัยของสถาบัน Biotechnica แห่งมหาวิทยาลัยมิวนิค ก็ได้นำเอา  $\alpha$ -CGTase และ  $\beta$ -CGTase gene ของกลุ่ม Binder และ Schmid เข้าไปขยายใน *Bacillus subtilis* พบว่าปริมาณเอนไซม์  $\beta$ -CGTase เพิ่มขึ้นถึง 300 เท่าเมื่อเทียบกับ Alkalophilic *Bacillus* 1-1 ดังแสดงในตารางที่ 9 (Schmid, 1989)

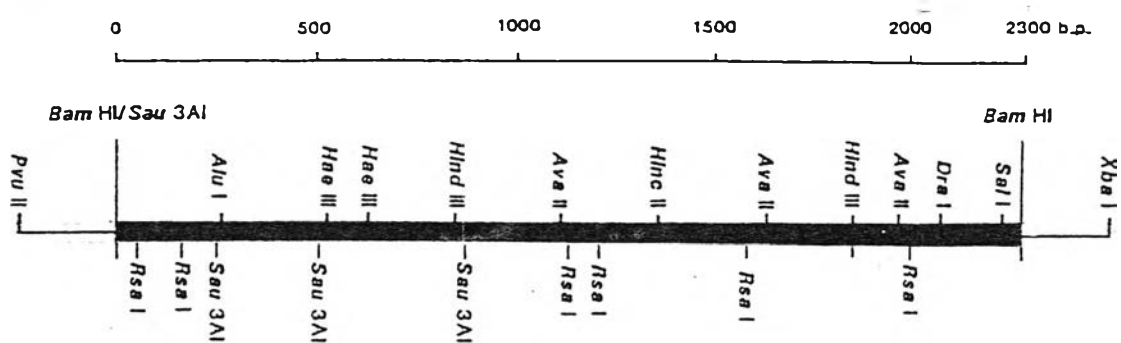
ตารางที่ 8 Molecular cloning of CGTase gene

| Organism                                | CGTase-type | Host cell                   | Constructed plasmid | ORF (bp) | Restriction map of constructed plasmid | Reference                |
|---|-------------|-----------------------------|---------------------|----------|--|--------------------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> M5a1       | $\alpha$    | <i>E. coli</i> strain RR28  | pCM100              | 1965     | รูปที่ 3                               | Binder และคณะ, 1986      |
| <i>Bacillus macerans</i>                | $\alpha$    | <i>B. subtilis</i>          | pDS10               | 2061     | รูปที่ 4                               | Takanou และคณะ, 1986     |
| Alkalophilic <i>Bacillus</i> 1-1        | $\beta$     | <i>E. coli</i> strain HB101 | pCM1110             | 2109     | รูปที่ 5                               | Schmid และคณะ, 1988      |
| Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.No.38-2 | $\beta$     | <i>E. coli</i> strain HB101 | pCS8                | 2136     | รูปที่ 6                               | Kaneko และคณะ, 1988      |
| <i>Bacillus</i> sp. # 1011              | $\beta$     | <i>E. coli</i> strain HB101 | pTUE202             | 2139     | รูปที่ 7                               | Kimura และคณะ, 1989      |
|   |             |                             | pTUE217             |          |  |                          |
| Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.No.17-1 | $\beta$     | <i>E. coli</i> strain HB101 | pTUB703             | -        | รูปที่ 8                               | Kaneko และคณะ, 1989      |
|   |             |                             | pTUB766             |          |  |                          |
| <i>B. circulans</i> No.8                | $\beta$     | <i>E. coli</i> strain HB101 | pBC22               | -        | รูปที่ 9                               | Nitschke และคณะ, 1990    |
| <i>B. subtilis</i> No.313               | $\beta$     | <i>E. coli</i> strain HB101 | pMT2                | -        | รูปที่ 10                              | Kato และ Horikoshi, 1986 |

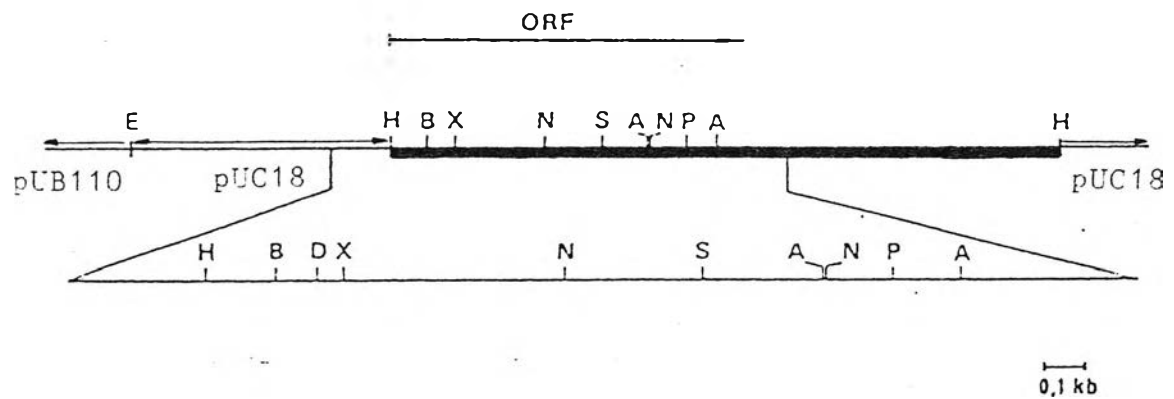




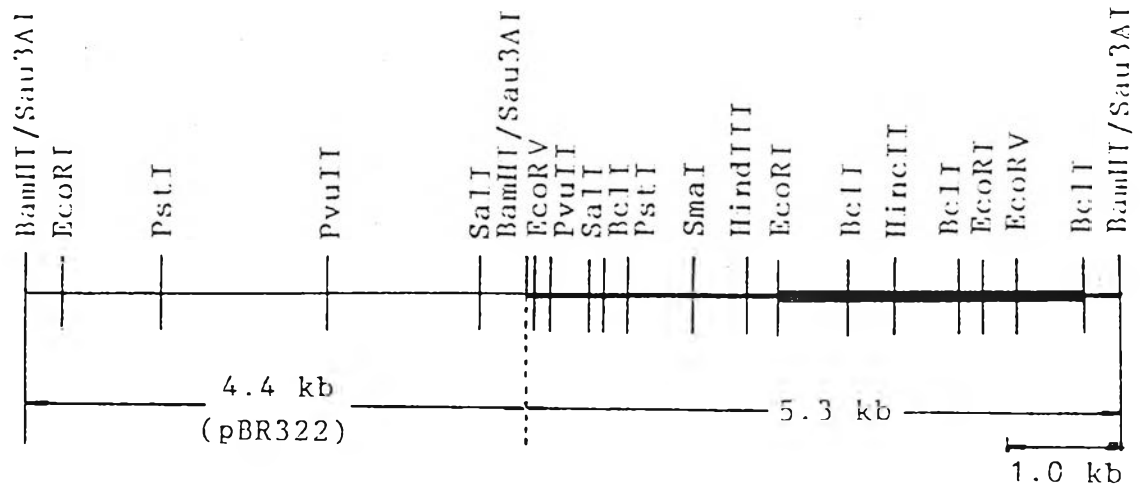
รูปที่ 3 Restriction map ของยีนดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Klebsiella pneumoniae* M5a1 ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCM100 ซึ่งแทรกในตำแหน่ง PstI ของดีเอ็นเอพาหะ pHE3 แท่งสีขาวแสดงถึงขอบเขตของ CGTase gene สร้างโดย Binde และคณะ (1986)



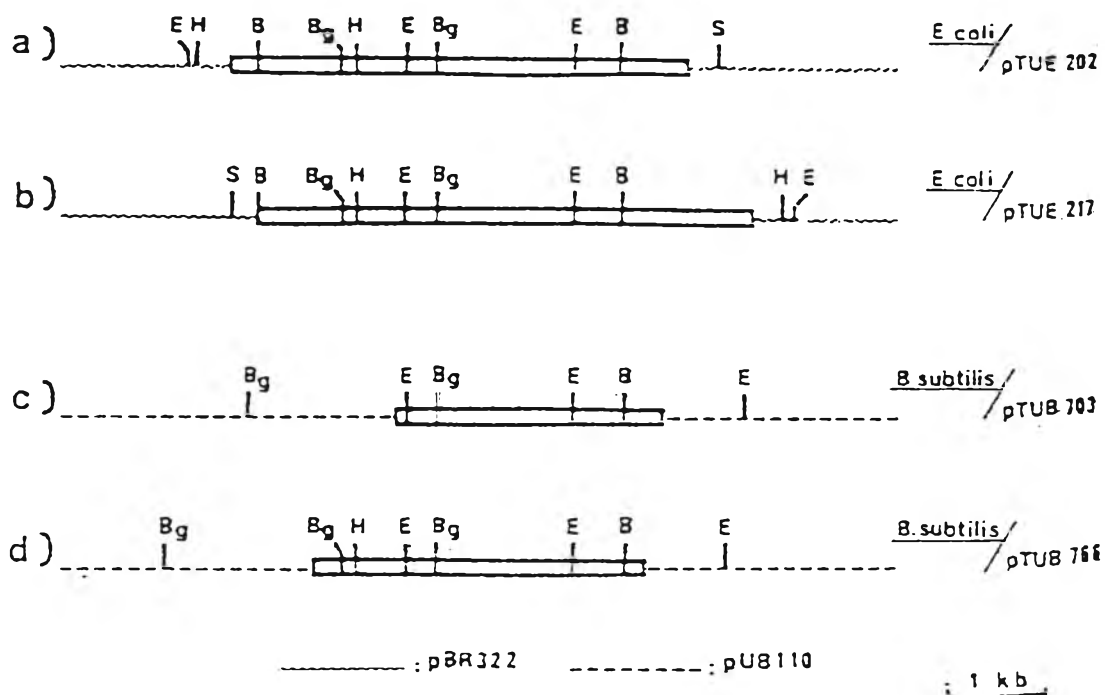
รูปที่ 4 Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pDS10 ซึ่งประกอบด้วยชิ้น  
 ดีเอ็นเอของโครโมโซม จาก *Bacillus macerans* ขนาด 2.3 kb (—)  
 ที่แทรกอยู่ในตำแหน่ง BamHI/Sau3AI ถึง BamHI ของดีเอ็นเอพาหะ pUB110  
 (—) สร้างโดย Takano และคณะ (1986)



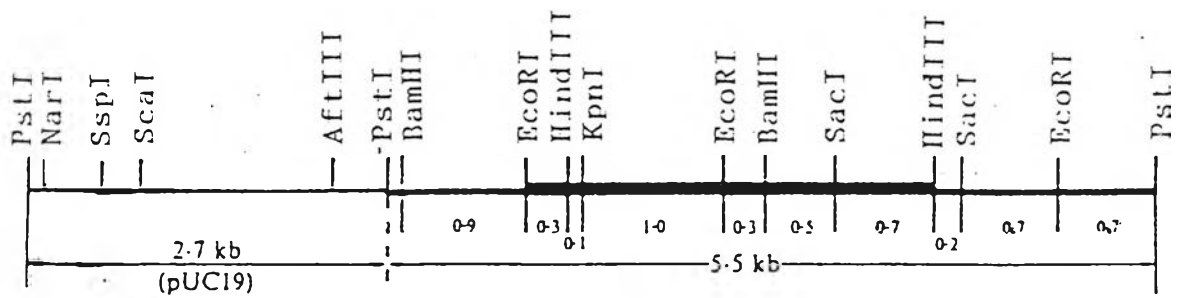
รูปที่ 5 Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCM1110 ซึ่งประกอบด้วยชิ้น ดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก Alkalophilic *Bacillus* 1-1 ขนาด 3.4 kb (.....) ที่แทรกในตำแหน่งของ HindIII ของดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ส่วนที่เหลือคือ ดีเอ็นเอพาหะ pUB110 ที่แทรกในตำแหน่งของ EcoRI ของ ดีเอ็นเอพาหะ pUC18 ; ตำแหน่งของ restriction site กำหนดดังนี้ A (AvaII), B (BglI), D (DdeI), E (EcoRI), H (HindIII), N (NciI), P (PstI), S (SauI), และ X (XhoI) ตามลำดับ (Schmid และคณะ, 1988)



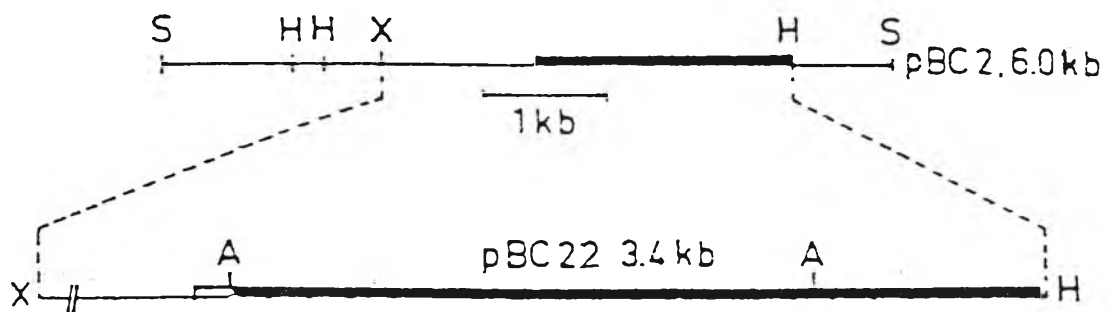
รูปที่ 6 Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pCS8 ซึ่งประกอบด้วยชิ้น  
 ดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก Alkalophilic *Bacillus* sp. strain No.  
 38-2 ขนาด 5.3 kb (——) และได้แสดงถึงบริเวณที่ถอดรหัสให้  
 เอนไซม์  $\beta$ -CGTase (——) สร้างโดย Kaneko และคณะ (1988)



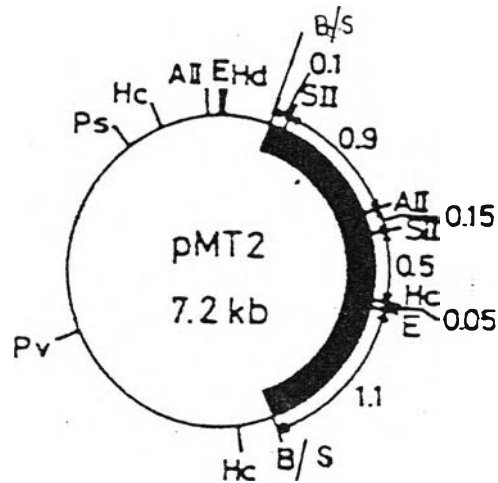
รูปที่ 7 เปรียบเทียบขนาด และ restriction sites ของดีเอ็นเอของโคโรโมโซม จาก *Bacillus* sp. strain No.38-2 (—) ที่แทรกในดีเอ็นเอพาหะ pBR322 (*E. coli* plasmid; ~~~~~) ซึ่งประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTUE202 (a) และ pTUE217 (b) และที่แทรกในดีเอ็นเอพาหะ pUB110 (*B. subtilis* plasmid; ----) ซึ่งประกอบด้วยรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pTUB703 (c) และ pTUB766 (d) ตำแหน่งของ restriction site กำหนดดังนี้ E (EcoRI), H (HindIII), B (BamHI), Bg (BglII) และ S (SalI) ตามลำดับ (Kimura และคณะ, 1987)



รูปที่ 8 Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pUCP1 ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก Alkalophilic *Bacillus* sp. strain No. 17-1 ขนาด 5.5 kb (————) และได้แสดงถึงบริเวณที่ถอดรหัสให้เอนไซม์  $\beta$ -CGTase (-----) สร้างโดย Kaneko และคณะ (1989)



รูปที่ 9 Restriction map ของชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *Bacillus circuians* strain No. 8 ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBC22 ซึ่งแทรกในตำแหน่ง SalI ของดีเอ็นเอพาหะ pTZ18R และได้แสดงถึงบริเวณที่ถอดรหัสให้ signal peptid (==) และ เอนไซม์  $\beta$ -CGTase (—) ; ตำแหน่งของ restriction site กำหนดดังนี้ A (AccI), H(HindIII), S (SalI) และ X (XbaI) ตามลำดับ (Nitschke และคณะ, 1990)



รูปที่ 10 Restriction map ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pMT2 ซึ่งประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของโครโมโซมจาก *B. subtilis* No.313 ขนาด 2.8 kb (—) ที่แทรกอยู่ในตำแหน่ง BamHI/Sau3AI ของดีเอ็นเอพาหะ pBR322 (——) ตำแหน่งของ restriction sites กำหนดดังนี้ AI(AatI), AII(AatII), B(BamHI), E(EcoRI), Hc(HincII), Hd(HindIII), Ps(PstI), Pv(PvuII), SII(SacII) และ B/S(BamHI/Sau3AI) ตามลำดับ (Kato และ Horikoshi, 1986)



ตารางที่ 9 เปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้จาก wild-type คือ *Klebsiella oxytoca* ( $\alpha$ -CGTase) และ Alkalophilic *Bacillus* 1-1 ( $\beta$ -CGTase) กับรีคอมบิแนนท์โคลนที่ใช้ *E. coli* และ *B. subtilis* เป็นเซลล์เจ้าเรือน (Schmid, 1989)

| Enzyme           | Yield (mg protein /l fermentation broth) |                               |                                   |
|------------------|--|-------------------------------|-----------------------------------|
|                  | Wild-type                                | Recombinant<br><u>E. coli</u> | Recombinant<br><u>B. subtilis</u> |
| $\alpha$ -CGTase | 18-20                                    | 400-500                       | 800-1000                          |
| $\beta$ -CGTase  | 20-22                                    | 400-500                       | 6000-7000                         |

*Bacillus* sp. strain No.38-2 (ATCC21783) ซึ่งค้นพบโดย Yamamoto และคณะ (Yamamoto และคณะ, 1972) เพราะแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -CGTase ที่เสถียรและสามารถทำงานได้ดีที่ alkaline pH (Nakamura และ Horikoshi, 1976) ในปีค.ศ.1987 Kaneko และคณะ ได้โคลนยีน  $\beta$ -CGTase จาก Alkalophilic *Bacillus* sp. strain No.38-2 ซึ่งต่อมาในปีค.ศ.1991 Georganta และคณะ ได้นำมาศึกษาต่อ โดยการนำยีนไปตัดต่อเข้ากับ *tac* promoter ใน expression vector สำหรับ *E. coli* และ shuttle vector ซึ่งสามารถใช้เป็นต้นแบบเพาะได้สำหรับทั้ง *E. coli* และ *B. subtilis* ในการทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ *B. subtilis* เป็นเซลล์เจ้าเรือนสำหรับ shuttle vector จะพบแอกติวิตีของเอนไซม์  $\beta$ -CGTase น้อยมากแต่ถ้าใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าเรือนสำหรับ expression vector ที่มี *tac* promoter จะได้แอกติวิตีของเอนไซม์  $\beta$ -CGTase สูงมาก นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงบริเวณที่อยู่ของเอนไซม์ว่าอยู่ส่วนไหนของเซลล์ด้วยผลแสดงในตารางที่ 10 ซึ่งสรุปได้ว่าใน Alkalophilic *Bacillus* sp. No.38-2 เอนไซม์ CGTase จะหลั่งออกมาอยู่นอกเซลล์ทั้งหมด ในขณะที่เซลล์เจ้าเรือน *E. coli* ที่ได้รับ expression plasmid จะหลั่งเอนไซม์ CGTase ออกมานอกเซลล์ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในปี ค.ศ.1992 Paloheimo และคณะ ก็ได้นำ CGTase gene จาก *Bacillus* สายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาต่ออีกครั้ง เพราะต้องการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในระบบอุตสาหกรรม โดยเลือกที่จะใช้ *B. subtilis* เป็นเซลล์เจ้าเรือนเพราะว่า *B. subtilis* สามารถสร้างโปรตีนในปริมาณมาก และสามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้ (Vasantha และ Thompson, 1986 ; Sibakov, 1986) Paloheimo และคณะ จึงได้นำ  $\beta$ -CGTase gene มาตัดต่อเข้ากับ promoter ของ  $\alpha$ -amylase จาก *B. amyloliquefacians* แล้วนำส่งเข้าไปใน *B. subtilis* พบว่าได้ปริมาณของเอนไซม์ CGTase เพิ่มขึ้น 14 และ 33 เท่าใน shake flask และในถังหมัก (fermentor) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ parental strain คือ Alkalophilic *Bacillus* sp. No.38-2

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณของเอนไซม์  $\beta$ -CGTase จาก Alkalophilic *Bacillus* sp. No.38-2 ในบริเวณต่างๆของเซลล์เจ้าเรือน (host cell) ชนิดต่างๆ (Georganta และคณะ, 1991)

| Strains   | CGTase activity(U/ml) |                 |                   |               |
|---|-----------------------|-----------------|-------------------|---------------|
|   | intra<br>cellular     | peri<br>plasmic | extra<br>cellular | total         |
| Alkalophilic<br><i>Bacillus</i> No.38-2               | 0<br>(0%)             | 0<br>(0%)       | 300<br>(100%)     | 300<br>(100%) |
| <i>E. coli</i> HB101 with<br>cloning vector-CGTase    | 90<br>(35%)           | 150<br>(59%)    | 15<br>(6%)        | 255<br>(100%) |
| <i>E. coli</i> HB101 with<br>expression vector-CGTase | 50<br>(10%)           | 100<br>(20%)    | 350<br>(70%)      | 500<br>(100%) |
| <i>B. subtilis</i> with<br>shuttle vector-CGTase      | <0.1                  | -               | <0.1              | <0.1          |

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะโคลน CGTase gene จาก *Bacillus A<sub>11</sub>* โดยใช้ระบบ Host-vector ของ *E. coli* และศึกษา restriction map ของ CGTase gene เพื่อเป็นพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาธรรมชาติของยีนต่อไป ข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพัฒนาประสิทธิภาพในการผลิตไซโคลเดรกซ์ทรินต่อไป ทั้งนี้ประเทศไทยซึ่งกำลังจะเป็นประเทศอุตสาหกรรมใหม่และมีผลผลิตทางการเกษตร เช่น แป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวเจ้า, แป้งข้าวเหนียว และ แป้งข้าวโพด เป็นต้น ที่ใช้เป็นวัตถุดิบได้อย่างดีสำหรับการผลิต CDs และ ยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจ (value added) ด้วย คาดว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทยต่อไปในอนาคต