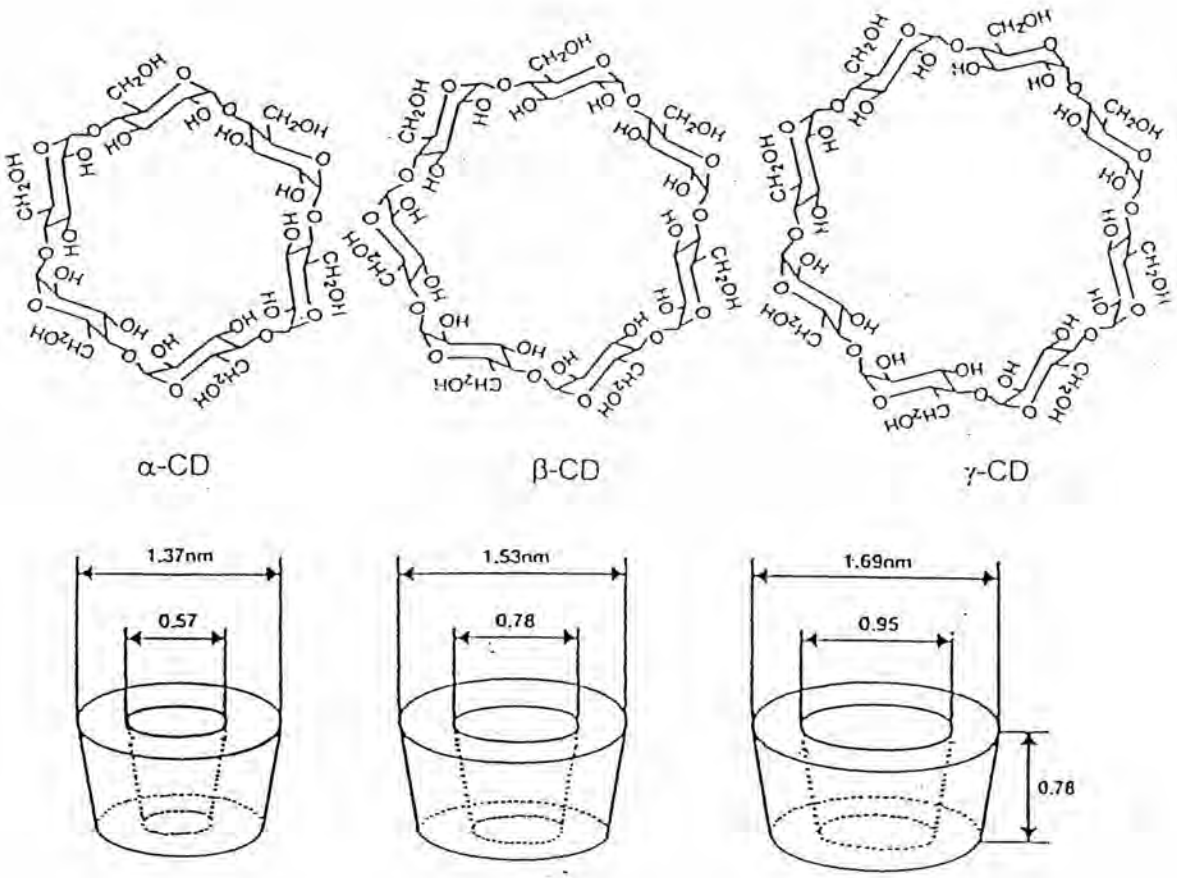
บทที่ 1
บทนำ

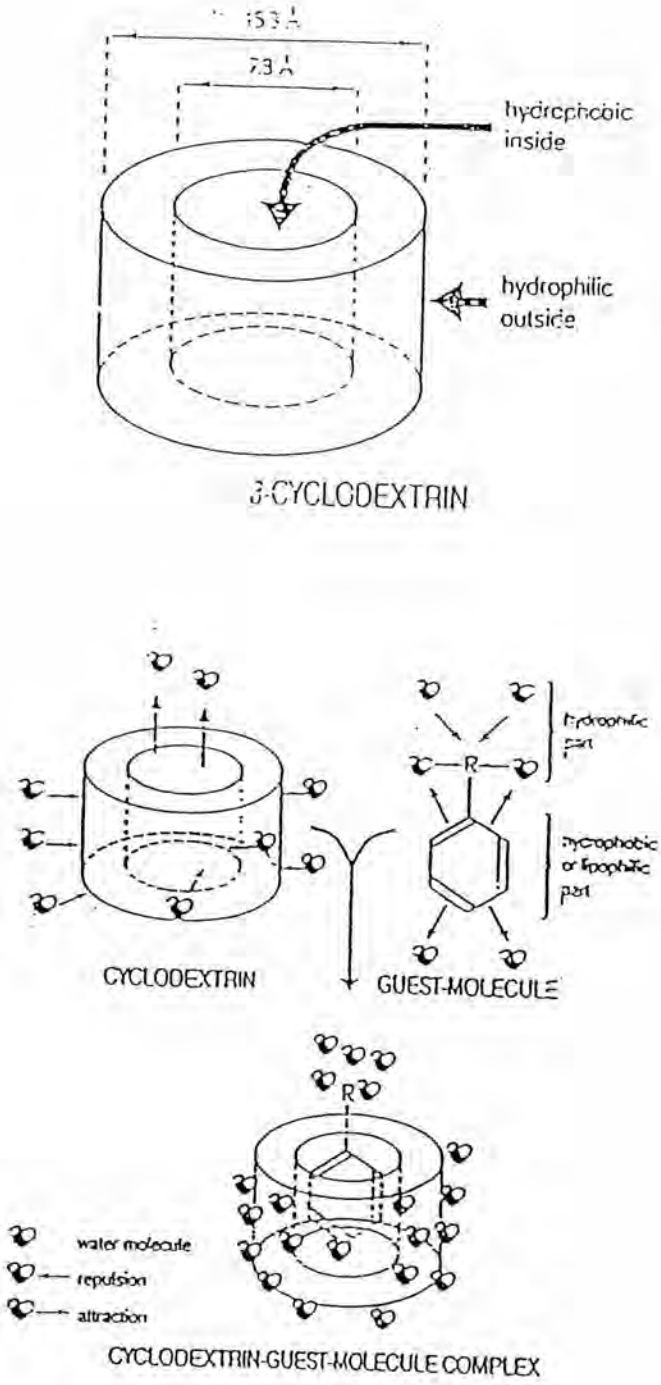
ไซโคลเดกซ์ทรินและการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน

ไซโคลเดกซ์ทริน (Cyclodextrin, CD) เป็นสารประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคสเชื่อมต่อกันเป็นวงแหวนปิดด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic (French, 1957) ไซโคลเดกซ์ทรินที่เกิดในธรรมชาติมี 3 ชนิด คือ แอลฟา (α), เบตา(β) และ แกมมา (γ)-CD ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 6,7 และ 8 หน่วย ตามลำดับ (รูปที่ 1) โมเลกุลของไซโคลเดกซ์ทรินมีลักษณะเป็นวงแหวน มีโพรงตรงกลางโมเลกุล ผิวภายนอกโพรงของโมเลกุลมีลักษณะไฮโดรฟิลิค ทำให้ไซโคลเดกซ์ทรินสามารถละลายในน้ำ หรือสารโพลาร์ได้ ส่วนโพรงด้านในของโมเลกุลมีลักษณะไฮโดรโฟบิกสามารถจับกับสารประกอบอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ที่มีขนาดพอเหมาะกับโพรงในไซโคลเดกซ์ทรินด้วยพันธะไฮโดรเจน ไฮโดรโฟบิก หรือแรงแวนเดอร์วาลล์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (inclusion complex) (รูปที่ 2) ทำให้สมบัติทางเคมีหรือกายภาพของสารที่ถูกจับเปลี่ยนไป จากคุณสมบัติของการเกิด inclusion complex นี้ ทำให้มีการนำไซโคลเดกซ์ทรินมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อาหาร การเกษตร เป็นต้น โดยใช้เป็นสารเพิ่มการละลาย เพิ่มความเสถียร ลดการระเหย หรือใช้ในการรักษากลิ่น รส ตลอดจนใช้กำจัดสารที่ไม่ต้องการออกจากสารละลาย (Fromming,1981;Schmid,1989 ; Szejtli, 1989) นอกจากนี้ ได้มีการนำไซโคลเดกซ์ทรินมาใช้ให้เกิดประโยชน์ด้านอื่น ๆ เช่น ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคล้าย อนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ substituted pyrophosphates, substituted phenyl acetates (Hendrich และ Cramer, 1965 ; Bender, 1986 ; Marzona และ Roda, 1990) ใช้ในกระบวนการแยก non-racemic mixture ออกจากกันด้วยเทคนิค HPLC โดยใช้ β-CD column (Florance และคณะ,1987) นอกจากมีการนำไซโคลเดกซ์ทรินทั้งสามชนิดมาใช้ประโยชน์หลายด้านแล้ว มีการสังเคราะห์และนำอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทริน เช่น methylated CD, hydroxypropyl CD และ maltosyl CD (รูปที่ 3) มาใช้ประโยชน์ด้วย สารอนุพันธ์เหล่านี้มีสมบัติในด้านการละลายน้ำดีกว่าสาร CD ดั้งต้น และยังพบว่ามีการนำโมเลกุลไซโคลเดกซ์ทรินมาเชื่อมต่อกันได้เป็น CD polymer นำไปใช้สร้าง inclusion complex กับสารบางชนิด เช่น limonin, naringin ทำให้ลดปริมาณสารที่ทำให้เกิดรสขม ในน้ำผลไม้ได้ (Wagner และคณะ, 1988)

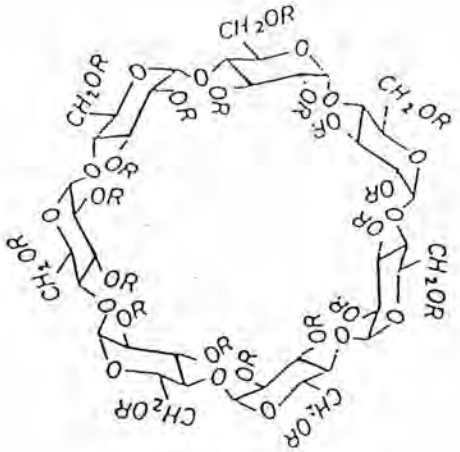


<u>รูปที่ 1</u> โครงสร้างไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α-, β- และ γ-CD ตามลำดับ

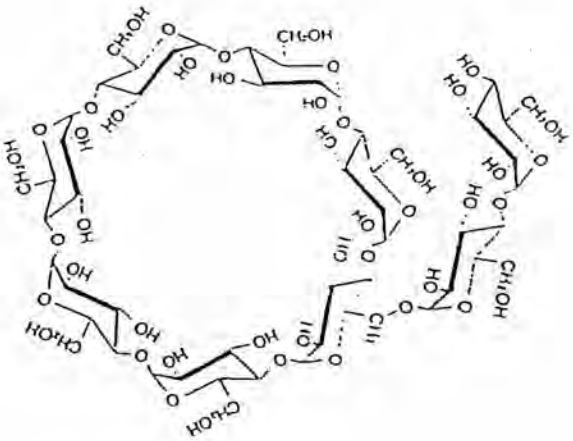
(Szejtli,1988)



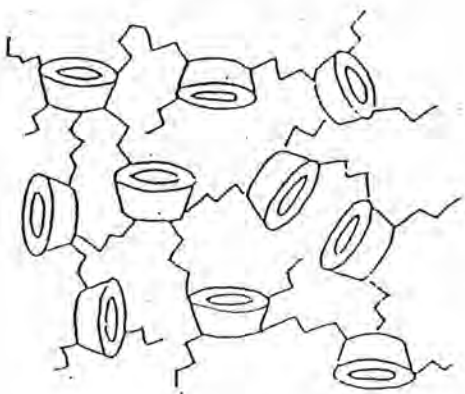
<u>รูปที่ 2</u> การเกิด inclusion complex ของไซโคลเดกซ์ทรินกับสารอื่น (Janssen,1992)



A



B



C

<u>รูปที่ 3</u> อนุพันธ์ชนิดต่าง ๆ ของไซโคลเดกซ์ทริน (Wacker,1994: Ensuiko,1994)

A : substituted CD (R = functional group)

B : branched CD

C : CD-polymer

เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งเป็นไซโคลเดกซ์ทริน คือ ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, E.C.24.1.19) ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งเป็นไซโคลเดกซ์ทริน โดยมีกลไกการทำงาน 3 แบบ คือ cyclization, coupling และ disproportionation (Bender,1981) สามารถแสดงได้ดังนี้

$$(glc)_n \underset{\text{coupling}}{\overset{\text{cyclization}}{\rightleftharpoons}} (glc)_{n-x} + c(glc)_x$$

$$(glc)_m + (glc)_p \xrightarrow{\text{disproportionation}} (glc)_{m-y} + (glc)_{p+y}$$

เมื่อ $(glc)_m$, $(glc)_n$,$(glc)_p$ คือ 1,4-α-D-glucopyranosyl chains ที่มี "m", "n", "p" D-glucopyranosyl residues

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

$c(Glc)_x$ คือ cyclodextrins

โดยที่ปฏิกิริยา cyclization จะเป็นปฏิกิริยาที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทริน และจะเกิดได้ดีที่สุดเมื่อสับสเตรทเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกลูโคส 16-18 หน่วย แต่ถ้าหากว่าสับสเตรทมีความยาวมากกว่า 100 หน่วยขึ้นไปจะเป็นสับสเตรทที่ไม่ดีสำหรับการเกิดปฏิกิริยา cyclization เพราะรูปร่างของสับสเตรทที่มีความยาวมากขึ้นจะมีรูปร่างเป็นเกลียว (Bender,1985) ทำให้เปลี่ยนไปเกิดปฏิกิริยา disproportionation แทน เพื่อตัดสับสเตรทให้เล็กลง หากสับสเตรทมีความยาวน้อยกว่า 14 หน่วยก็จะไม่เกิดปฏิกิริยา cyclization แต่จะเร่งปฏิกิริยา coupling เพื่อต่อสายกลูโคสให้ยาวขึ้น ให้เหมาะที่จะเกิดปฏิกิริยา cyclization (Szejtli, 1988)

แบคทีเรียที่ผลิต CGTase ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์บาซิลลัส เช่น *B. macerans* (Depinto และ Campbell, 1968) *B. circulans* (Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987) *B. megaterium* (Kitahata, Tsuyama และ Okada, 1974) *B. autolyticus* (Kaneda และคณะ,1992) Alkalophilic *Bacillus sp.* (Nakamura และ Horikoshi,1976) ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่สามารถผลิต CGTase ได้แก่ *K. puneumoniae* (Bender,1977) , *Thermoanaerobacter sp.* ATCC 53627(Starnes,1990) *K. oxytoca* (Binder,Huber และ Bock,1986) แบคทีเรียเหล่านี้จะผลิต CGTase แล้วขับออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยเอนไซม์แต่ละสายพันธุ์อาจมีสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีต่างกัน (ตารางที่ 1)

จากการที่ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นสารที่มีการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้มีการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินให้สูงขึ้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตและให้เพียงพอต่อความต้องการทางอุตสาหกรรมในด้านต่าง ๆ มีการนำเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถเพิ่มผลผลิต CGTase เช่น Bender (1986) และ Schmid (1989) ได้นำเอา α-CGTase และ β-CGTase gene ที่ได้จาก *Klebsiella oxytoca* M5a1 และจาก alkalophilic *Bacillus* 1-1 มาต่อกับ strong promoter แล้วส่งเข้าสู่ *E. coli* ที่ถูกทำให้กลายพันธุ์ ทำให้ทรานสฟอร์แมนท์สามารถผลิตเพิ่มขึ้น 20-25 เท่า จากเดิม ในขณะเดียวกัน ได้นำเอา α-CGTase และ β-CGTase gene เข้าไปขยายใน *Bacillus subtilis* พบว่าปริมาณ β-CGTase เพิ่มขึ้น 300 เท่า เมื่อเทียบกับ alkalophilic *Bacillus 1-1* และในปี ค.ศ. 1992 Paloherimo และคณะ ได้ทำการโคลน CGTase gene จาก *Bacillus strain* No. 38-2 ใส่เข้าไปใน *Bacillus subtilis* โดยได้ตัดต่อส่วน promoter ของยีน α-amylase จาก *B. amyloliquefacians* มาใส่เข้ากับ CGTase gene พบว่า ปริมาณของ CGTase เพิ่มขึ้นเป็น 14 เท่า เมื่อเลี้ยงในขวดเขย่า และเพิ่มเป็น 33 เท่า เมื่อเลี้ยงในถังหมัก

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของ CGTase จากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ

Organism	Predominant product	Optimum pH(activity)	Optimum temp(°C)	Molecular weight (dalton)	pI	Reference
Klebsiella pneumoniae M 5 al	α-CD	6.0-7.2	ND	68,000	4.8	Bender,1982
Alkalophilic *Bacillus* 38-2	β-CD	1)4.6 2)7.0 3)9.5	45-50	88,000	5.3	Nakamura and Horikoshi,1976
Alkaophilic *Bacillus* 17-1	β-CD	6.0	ND	74,000	ND	Yamamoto *et al.*,1972
Bacillus marcerans IFO 3490	α-CD	5.0-5.7	55	65,000	4.6	Kitahara *et al.*, 1974
Bacillus megaterium	β-CD	5.0-5.7	55	ND	6.07	Kitahara and Okada, 1974
Bacillus stearothermophilus	α-CD	6.0	ND	68,000	4.5	Kitahara and Okada, 1982
Bacillus macerans ATCC 8514	α-CD	6.2	ND	139,000	ND	Depinto and Campbell,1968
Micrococcus sp.	β-CD	5.8	55-65	88,000	4.2	Yaki *et al.*, 1980
B. Fermus/lentus 290-3	γ-CD	6.8	50	75,000	4.1	Englbrecht *et al.*, 1990

เนื่องจากประเทศไทยมีผลผลิตหลักที่สำคัญจากภาคเกษตรกรรม คือ ข้าว ข้าวโพด และมันสำปะหลัง การนำเอาผลผลิตเหล่านี้มาพัฒนาและเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจ โดยนำแป้งชนิดต่าง ๆ ไปเปลี่ยนเป็นไซโคลเดกซ์ทรินจึงเป็นงานที่ทางกลุ่มวิจัยในภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ความสนใจ โดยเริ่มการคัดเลือกสายพันธุ์บาซิลลัสที่ผลิต CGTase ได้สูง พบว่าสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่คัดเลือกได้ (Pongsawasdi และ Yagisawa,1987) จึงได้มีการศึกษาสภาวะในการเลี้ยงที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่าและศึกษาสมบัติเบื้องต้นของ (วัลยา เตชชัยกุล,2534) งานวิจัยต่อ ๆ มาได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพเพื่อให้การผลิตสูงขึ้น โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต CGTase ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (อุไรวรรณ รัชธร,2536) ตลอดจนหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึง CGTase บน DEAE-cellulose และตัวค้ำอนินทรีย์ (วรรณรัตน์ คุตติอาชีวะ,2535) ในการศึกษาพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต CGTase สูงขึ้น มีแนวทางทำได้โดยอาศัยเทคนิคพื้นฐาน 2 วิธี คือ การใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรม ทำการตัดต่อยีนที่ควบคุมการสร้าง ซึ่งได้ดำเนินงานวิจัยมาบ้างแล้วในส่วนของการตัดยีน CGTase จากเชื้อ *Bacillus sp.* A11 สายพันธุ์ wild type นำมาโคลนใน *Escherichia coli* หรือ *B. subtilis* (สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์, 2536 ; สุพิศรา วรรณะ,2538) ศึกษาหาตำแหน่งและหาลำดับเบสของยีน CGTase บางส่วน (สุพิศรา วรรณะ,2538 ; จรัล บุญชัย, 2539) ข้อมูลพื้นฐานเหล่านี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีตัดต่อยีนต่อไป อีกวิธีหนึ่งคือการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการกลายพันธุ์ โดยการทำมิวเตชันเพื่อปรับปรุงการผลิต CGTase โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตหรือสารเคมีซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

การกลายพันธุ์ (Mutation)

การกลายพันธุ์ (Mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงของยีนจากสภาพหนึ่งไปยังอีกสภาพหนึ่ง หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงของลักษณะอันสืบเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของยีน ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของ DNA ที่นิวคลีโอไทด์ชนิดหนึ่งเข้าไปแทนที่นิวคลีโอไทด์อีกชนิดหนึ่ง

ขบวนการกลายพันธุ์ (mutagenesis) คือขบวนการที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ถ้าขบวนการเกิดขึ้นเองในธรรมชาติโดยไม่มีการเติมสารก่อกลายพันธุ์ลงไปเรียกว่า spontaneous mutagenesis และตัวกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นคือ spontaneous mutant สำหรับกรณีที่มีการใช้สารก่อ

การกลายพันธุ์ (mutagens) ขบวนการดังกล่าวเรียกว่า induced mutagenesis (Boyd,1988 ; Marrell,1975)

ชนิดของสารก่อกลายพันธุ์ (mutagens) หรือ mutagenic agent

สารก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ในการทำสิ่งมีชีวิตให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทำให้เกิดเป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยมีลักษณะผิดแปลกไปจากพันธุ์พ่อแม่ แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ รังสี และสารเคมี (ตารางที่ 2)

1. รังสี (radiation mutagens) แบ่งเป็น 2 พวก คือ

1.1 Ionizing radiations เช่น รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา นิวตรอน และ อนุภาคต่าง ๆ

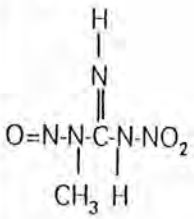
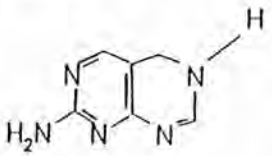
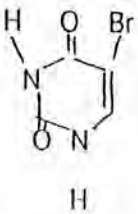
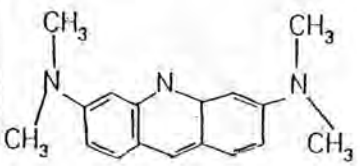
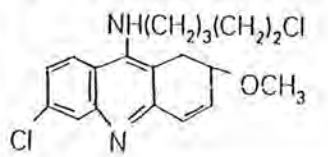
รังสีเหล่านี้สามารถแตกตัวได้ ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ โดยทำให้ DNA สายเดี่ยวหรือสายคู่ แตกออกที่ตำแหน่ง phosphodiester backbone มีผลทำให้เกิด deletion หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกรดนิวคลีอิก พันธะของ double helix แยกออกเกิดการจับคู่เบสผิดระหว่าง DNA สองสาย นอกจากนี้ มีการเกิด lesion repair คือ มีการซ่อมแซมสิ่งที่ถูกทำลายหรือแตกออกไป และจัดให้อยู่ในรูปใหม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับของนิวคลีโอไทด์ใหม่ เกิดการกลายพันธุ์ขึ้น

1.2 Nonionizing radiation เช่น แสงอัลตราไวโอเลต

รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet irradiation)

รังสีอัลตราไวโอเลตนิยมใช้ในการทำให้จุลินทรีย์เกิดกลายพันธุ์ เป็นรังสีที่มีพลังงานต่ำ (ความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร) ไม่เกิดการแตกตัว เป็น mutagen ที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำให้จุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม เนื่องจาก DNA base จะดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต เกิดพันธะโควาเลนท์ระหว่างไพริมิดีนเบสที่ติดกัน มีผลทำให้เกิด pyrimidine dimer (Freese,1963 ; Drake,1970) (รูปที่ 4) เบสชนิดอื่นก็อาจจะเกิด dimer ได้ และโอกาสที่ thymine จะเกิด dimer ได้สูงกว่า cytosine เช่น dimer thymine-thymine จะมีโอกาสเกิดขึ้นได้สูงกว่า thymine-cytosine และ cytosine-cytosine ในอัตรา 1:0.7:0.2 ผลที่เกิดจากอัลตราไวโอเลต นอกจากเกิด dimer แล้ว ยังเกิด cytosine hydrate เกิดขึ้นในอัตราความถี่ 0.3 การเกิด cytosine hydrate เกิดจาก tautomerize กลายเป็น base pair ที่จะจับกับ adenine ทำให้เกิดการ

ตารางที่ 2 สารก่อกลายพันธุ์และกลไกในการกลายพันธุ์ (Brige,1981)

Mutagen	Structure	Mode of action
X-ray	5 nm wavelength	Single-and double-strand breaks
UV light	254 nm wavelength	Pyrimidine dimers
Nitrous acid	HNO_2	Deamination; intrastrand crosslinks
Hydroxylamine	NH_2OH	Hydroxylation of cytosine
N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine		Production of 7-methyl guanine at replication fork
Ethylmethanesulfonate	$CH_2SO_3CH_2CH_3$	Alkylation of purines
Methylmethanesulfonate	$CH_3SO_3CH_3$	Alkylation of purines
2-aminopurine		May replace adenine; may hydrogen bond to cytosine
5-bromouracil		May replace thymine ; may hydrogen bond to guanine
Acridine orange		Production of frameshifts
ICR 191(a nitrogen mustard)		Production of frameshifts

เปลี่ยนแปลงแบบ G-C ---> A-T transition ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต ส่วนใหญ่เป็นการกลายพันธุ์แบบ transition mutationและอาจพบ transversion mutation, frameshift mutation และ deletions ได้ (Marrell, 1975 ; Boyd, 1988)

ความผิดปกติของเบสที่เกิดจากแสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้กลับคืนสู่สภาพปกติได้ เมื่อเซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตได้รับ visible light (แสงช่วงความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร) เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "photoreactivation" (รูปที่ 5) ถ้าเกิดปรากฏการณ์นี้ จะไม่สามารถตรวจพบการกลายพันธุ์ (Marrell,1975 ; Boyd,1988)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตทำได้โดยนำสารละลายเซลล์ใส่ในเพลท ระยะห่างระหว่างแหล่งแสงกับจุลินทรีย์อย่างน้อย 20 ซม. ขึ้นไป ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น 10^7 เซลล์ต่อ มล. (Calam,1970 ; Fantini,1975 ; Sikyts,1983) ระหว่างการฉายแสงจะกวนสารละลายเซลล์เบา ๆ ตลอดเวลา เพื่อให้แสงส่องผ่านเซลล์ได้อย่างทั่วถึง แสงอัลตราไวโอเลตที่นิยมใช้มีกำลังงาน 15 วัตต์ ปล่อยคลื่นแสง 253.7 นาโนเมตร ระยะเวลาที่ฉายแสงอยู่ในช่วง 30 วินาที ถึง 20 นาที ทั้งนี้ขึ้นกับความไว(sensitivity) ของจุลินทรีย์แต่ละชนิด

2. สารเคมีที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (chemical mutagens) เช่น nitrous acid, 5-bromouridine(BU), acridines และสารกลุ่ม alkylating agent ได้แก่ N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) , ethylmethanesulfonate(EMS) , methylmethanesulfonate(MMS) และ nitrogen mustard เป็นต้น แบ่งตาม mechanisms of action ได้ดังนี้ (Drake, 1970 ; Sikyts,1983 ; Boyd,1988)

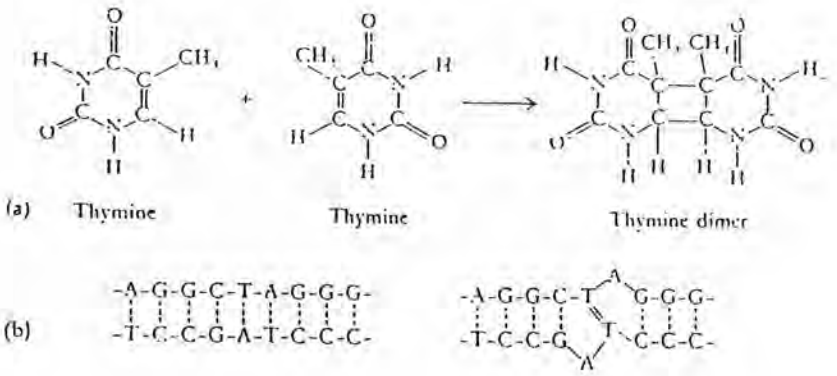
Base analogs

มีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับเบสปกติ จึงสามารถเข้าไปร่วมอยู่ในเส้นของ DNA ในระหว่างการจำลองตัวของ DNA ทำให้เกิดการจับคู่เบสผิด เช่น 5-Bromouracil (Bu) สามารถเกิด tautomerics shifts ได้ เมื่ออยู่ในรูป Keto form มีโครงสร้างโมเลกุลคล้าย Thymine จึงเข้าไปแทนที่ Thymine จับกับ Adenine ดังนั้นคู่เบสเดิมที่เป็น A-T เมื่อสร้างขึ้นใหม่ก็จะกลายเป็น A-Bu หลังจากเกิด replication แล้ว Bu เกิด tautomeric shift เปลี่ยนไปอยู่ในรูป Enol form จับกับ Guanine เป็น G-Bu ผลจากการกลายพันธุ์ทำให้เกิดการ transition จาก A-T$\rightarrow$ G-C ได้

Nitrous acid

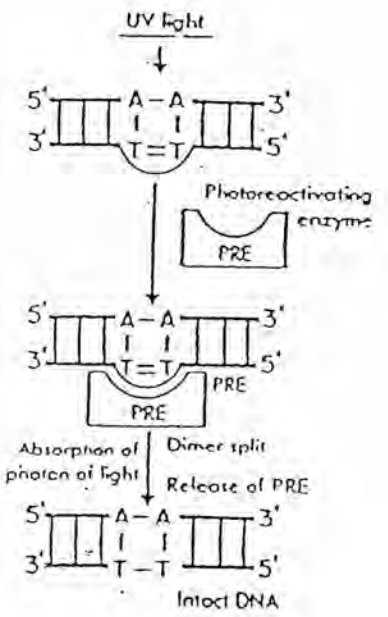
สามารถทำปฏิกิริยาโดยตรงโดยการขับ NH_2 (deamination) ออกไปจาก adenine, guanine และ cytosine เช่นเมื่อ NH_2 ถูกขับออกไปจาก adenine ทำให้ adenine เปลี่ยนไปเป็น

hypoxanthine ซึ่งจับคู่กับ cytosine แทนที่จะจับกับ thymine เมื่อ DNA เกิดการจำลองตัว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจาก A-T→ G-C transition



<u>รูปที่ 4</u> (a) การเกิด thymine dimer

(b) การเกิด thymine dimer บนโมเลกุลของ DNA (Patt,D.I., และ Patt,G.R.,1975)



<u>รูปที่ 5</u> การเกิดปรากฏการณ์ photoreactivation (Boyd, 1988)

Acridines

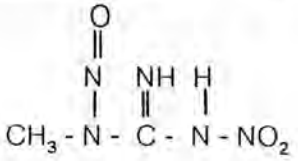
เช่น proflavin, acridine orange เป็นต้น ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยแทรกตัวเข้าไประหว่างคู่ของเบสบางคู่ (frameshift mutations) ทำให้เส้น DNA ยาวขึ้นกว่าเดิม เมื่อมีการจำลองตัวของ DNA ถ้า Acridines ปรากฏอยู่ในเส้น DNA สายเก่า (template strand) ก็จะมีเบสชนิดใหม่เข้าไปแทรกในจุดที่ตรงกันของสายใหม่ นอกจากนั้นการที่เส้น DNA ยาวขึ้น ทำให้การแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซมผิดปกติไป คือทำให้ DNA บางส่วนมีคู่เบสลดลง (deletion) หรือ เพิ่มขึ้น (addition) ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์

Alkylating agent

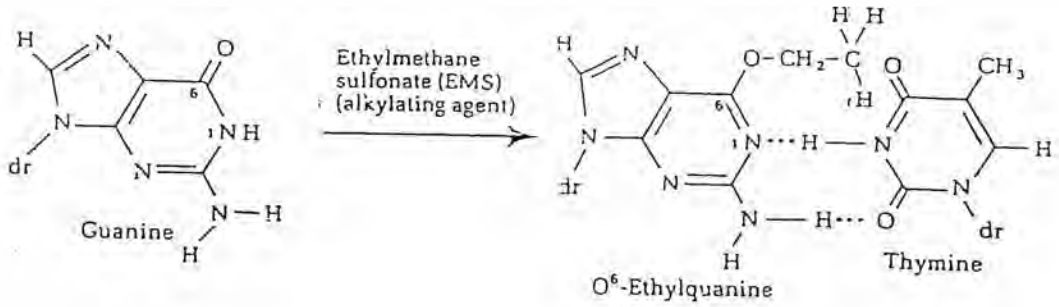
เช่น nitrogen mustards, methylmethanesulfonate (MMs) , ethylmethanesulfonate (EMS) และ N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) เป็นต้น เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่ที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการย้ายกลุ่มเมทธิลหรือเอทธิลเข้าไปอยู่ที่ base pair ของ DNA โดยจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตำแหน่งเฉพาะในเบสแต่ละชนิด คือที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจน ทำให้ base-pair เปลี่ยนแปลง เช่น EMS ทำให้เกิด ethylation (รูปที่ 6) ที่ตำแหน่ง 6-O ของเบส Guanine เป็นผลให้เกิด O^6 - ethylguanine จับคู่กับเบส Thymine เป็นผลให้เกิด G-C $\rightarrow$ A-T transition นอกจากนี้ผลของ alkylation อาจทำให้เกิด transversion และ frameshift mutation ได้ (รูปที่ 7)

N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)

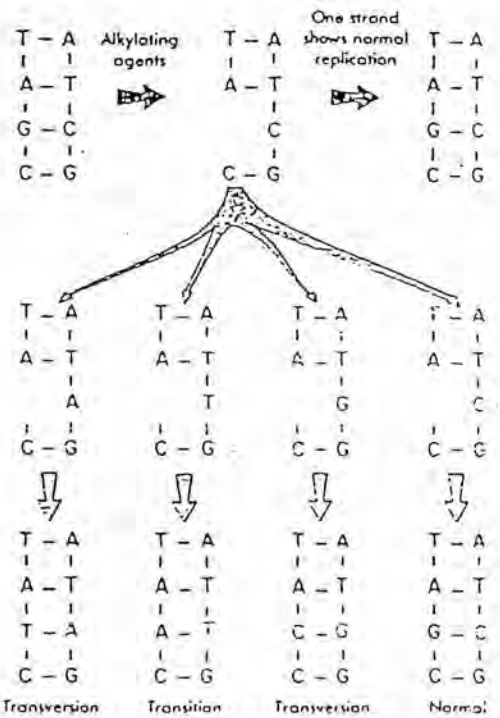
เป็นสารเคมีประเภท Alkylating agent ชนิดหนึ่งที่นิยมใช้มากในปัจจุบัน มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สูง โอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์มีมากใกล้เคียงกับการพิมพ์ DNA ขึ้นใหม่ เมื่อใช้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ และมีสูตรโครงสร้าง



NTG เป็นสารเคมีที่ประกอบด้วยกลุ่มเมทธิล ซึ่งสามารถที่จะเคลื่อนย้ายได้ โดยจะย้ายเข้าไปอยู่ที่ base pair ของ DNA นั้น และจะย้ายเข้าสู่ตำแหน่งเฉพาะในเบสแต่ละชนิด คือที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจน การเคลื่อนย้ายของหมู่เมทธิล มีผลโดยตรงต่อการจับคู่ผิดกัน



<u>รูปที่ 6</u> การเปลี่ยนของ guanine เป็น O^6- ethylguanine เมื่อใช้ alkylating agent Ethylmethane sulfonate (EMS) และ O^6- ethylguanine จับคู่ base pair กับ Thymine ก่อให้เกิด G-C → A-T transition (Russell, 1990)



<u>รูปที่ 7</u> ผลของ alkylation ทำให้เกิดการดึงเบสกวานีนออก เมื่อ DNA จำลองตัว จึงเกิดการกลายพันธุ์แบบ transition หรือ transversion (Boyd, 1988)

ของ base เช่น การเพิ่มหมู่เมทธิล ให้กับ hydrogen-bonding oxygen ของกวานีนและไทมีน การเกิด alkylation ดังกล่าวนี้ ทำให้เบสบนสาย DNA เปลี่ยนแปลงไป เมื่อ DNA แม่แบบมีการเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการจำลองตัว (replication) ทำให้ DNA สายใหม่ที่จำลองได้มี DNA ต่างไปจากเดิม ทำให้เกิดการจับคู่ผิดระหว่าง G กับ T จึงทำให้เกิด G-C--->A-T และ A-T---> G-C transition นอกจากนี้การย้ายหมู่ เมทธิล ยังมีผลต่อการทำงานของการซ่อมแซม DNA แบบ error-prone ก่อให้เกิดการ transversion ได้ด้วย (Freese,1963 ; Boyd,1988)

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทำได้โดยละลาย NTG ในสภาวะที่เป็นด่าง เนื่องจาก NTG จะแตกตัวอย่างรวดเร็วเป็น diazomethane (CH_2N_2) ซึ่งเป็น strong methylating agent แล้วเข้าจับกับเซลล์อย่างรวดเร็ว (Calam,1970 ; Hopwood,1970) นิยมละลาย NTG ในสารละลาย Tris-maleic acid pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ปัจจัยหลักที่สำคัญของการใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ความเข้มข้นของสารละลาย NTG พบว่าความเข้มข้นของ NTG ยิ่งมาก เปอร์เซนต์รอดของเซลล์ยิ่งต่ำลง จะพบเซลล์ที่กลายพันธุ์ไปแล้วเป็นจำนวนมากที่ช่วงความเข้มข้นที่ให้เปอร์เซนต์รอดของเซลล์ระหว่าง 0-50 เปอร์เซนต์ นิยมใช้ความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Mendell,1960 ; Calam,1970 ; Hopwood,1970)

ดังได้กล่าวไว้ข้างต้นว่า ยังไม่มีการรายงานการกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการทำมิวเตชันเพื่อปรับปรุงการผลิต CGTase มาก่อน แต่มีรายงานการกลายพันธุ์จุลินทรีย์ เพื่อปรับปรุงการผลิตย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นตัวอย่างเช่น ปี ค.ศ. 1982 Dhawale และ Ingredew ได้กลายพันธุ์สายพันธุ์ตั้งต้น *Schwanniomyces alluvius* UCD-54-38 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG โดยมีเป้าหมายเพื่อปรับปรุงการผลิต α-amylase และ glucoamylase คัดเลือกสายพันธุ์กลายขั้นปฐมภูมิด้วยการวัดขนาด clear zone บนวุ้นแข็งที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ คัดเลือกขั้นทุติยภูมิโดยวัดแอคติวิตีของ α-amylase และ glucoamylase ในสารละลาย จากการทดลองได้เชื้อสายพันธุ์กลาย R69 ซึ่งสามารถเพิ่มแอคติวิตีของ α-amylase และ glucoamylase ได้ 3 และ 4 เท่า ตามลำดับ เมื่อนำสารละลายมาไฮโดรไลซ์แป้งข้าวสาลี พบว่าได้แอคติวิตี amylolytic ของสายพันธุ์ตั้งต้นและสายพันธุ์กลาย R69 0.92 และ 2.41 หน่วย ตามลำดับ และในปี ค.ศ. 1991 Horn และคณะ ทดลองนำ *Schwanniomyces castellii* CSIR-Ya93 มากลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ได้สายพันธุ์กลาย B53 ที่สามารถมีแอคติวิตี α-amylase และ glucoamylase เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า และเมื่อทดลองใช้ glycerol, mannitol หรือ starch เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าสามารถผลิต α-amylase ,glucoamylase และ debranching activity ได้ระดับใกล้เคียงกัน เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 1.5 ลิตร

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาหาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต CGTase ของสายพันธุ์ *Bacillus sp.* A11 โดยการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยเทคนิคการกลายพันธุ์

วัตถุประสงค์งานวิจัยมีดังนี้

1. ศึกษาวิธีการและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำการกลายพันธุ์
2. ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์กลาย
3. คัดเลือกหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการผลิต CGTase ได้สูงขึ้น
4. ศึกษาการผลิต CGTase ของสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น
5. เปรียบเทียบ CGTase ของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้น