



ความจำเพาะต่อตัวรับและปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของ รีคอมบิแนนท์เอนไซม์แอมิโลมอลเตสต่อการสังเคราะห์กลูโคซิลโพลีออล Acceptor Specificity and Transglycosylation Reaction of Recombinant Amylomaltase on the Synthesis of Glucosyl-Polyols

ปริญญญา แห้วเพชร¹, ศศิชัย กังสดาลอำไพ², จารุณี ควรพิบูลย์^{2,*}

¹สาขาวิชาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

²สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก สาขาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

Patinya Haewpetch¹, Sasichai Kangsadalampai², Jarunee Kaulpiboon^{2,*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Thammasat University,
Pathum Thani 12120

²Department of Preclinical Science (Biochemistry), Faculty of Medicine, Thammasat University,
Pathum Thani 12120

Received 26 July 2021; Received in revised from 18 December 2021; Accepted 28 December 2021

บทคัดย่อ

เอนไซม์แอมิโลมอลเตสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายรูปแบบรวมถึงปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่ไกลโคซิล เพื่อผลิตฟังก์ชันน้ำตาลไกลโคไซด์ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ สำหรับในการศึกษานี้เป็นการแสดงออกของพลาสมิด p19bAMY ที่สร้างขึ้นจากเวกเตอร์ pET-19b และยีน AMase ของแบคทีเรีย *Thermus* sp. ใน *Escherichia coli* BL21 (DE3) เพื่อใช้ผลิตเอนไซม์แอมิโลมอลเตส โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์แอมิโลมอลเตส คือ การเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของ IPTG 0.8 มิลลิโมลาร์ จากนั้น ได้ใช้กระบวนการทำเอนไซม์แอมิโลมอลเตสชนิดหยาบที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ HisTrap FFTM พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9 เท่า มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อยู่ที่ 150 หน่วย/มิลลิกรัม และให้ผลผลิตที่ 36% เมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของ

เอนไซม์แอมิโลมอลเตสที่บริสุทธิ์มีค่าเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน การวิเคราะห์ความจำเพาะต่อตัวรับและปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์แอมิโลมอลเตสต่อการสังเคราะห์กลูโคซิลโพลีออล โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นตัวให้กลูโคซิลและน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับ พบว่าตัวรับโพลีออลที่มีแอกทวิตีสูงสุดคือ อิริทริทอล รองลงมาคือ มอลทิทอล และไซลิทอล ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ผลผลิตของผลิตภัณฑ์โดย TLC พบว่าผลิตภัณฑ์อิริทริทอลกลูโคไซด์ (EG_{1-4}) ที่สังเคราะห์ได้คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 29.3 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

คำสำคัญ: แอมิโลมอลเตส; น้ำตาลอิริทริทอล; โพลีออลกลูโคไซด์; แป้งมันสำปะหลัง; ทรานส์ไกลโคซิเลชัน

Abstract

Amylomaltase (AMase) catalyzes various reactions, including an intermolecular transglycosylation reaction to produce functional glycosides, which are practically used in many industries. In this study, the p19bAMY plasmid was constructed from pET-19b vector containing *Thermus sp.* amylomaltase gene. This plasmid was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) for producing AMase. The optimal expression was obtained when the AMase-expressing cells were cultured at 37°C 250 rpm for 24 hours with 0.8 mM IPTG. The crude AMase was subsequently purified to 9-fold by HisTrap FFTM affinity column with the specific activity of 150 units/mg and 36% yield. The relative molecular mass of the purified enzyme was 60 kDa, determined by 10% SDS-PAGE. Moreover, the acceptor specificity was investigated from transglycosylation reaction using tapioca starch as glycosyl donor and various polyols as acceptors. Among polyol acceptors, erythritol gave the highest activity, followed by maltitol and xylitol, respectively. Upon analysis of the product by TLC, the yield of synthesized erythritol glucosides (EG_{1-4}) was 29.3% (w/w).

Keywords: Amylomaltase; Erythritol; Polyol glucosides; Tapioca starch; Transglycosylation

1. บทนำ

ฟังก์ชันนัลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (functional oligosaccharide) รวมถึงน้ำตาลต้านฟันผุ (anti-cariogenic sugar) และพรีไบโอติก (prebiotics) กำลังได้รับความนิยมอย่างมาก ในกลุ่มผู้บริโภคที่ให้ความสำคัญกับสุขภาพมากขึ้นในแง่ของการเลือกบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ การคำนึงถึงเรื่องคุณค่าของสารอาหาร ความปลอดภัย และผลของสารอาหารต่อสุขภาพ จึงเป็นจุดกำเนิดของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่เรียกว่า อาหารฟังก์ชันซึ่งมีผลต่อการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกาย ทำให้สุขภาพดี และปราศจากโรคภัยไข้เจ็บ [1] และ

เอนไซม์แอมิโลมอลเตส (amylomaltase, AMase; EC 2.4.1.25) เป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันเพื่อสังเคราะห์ฟังก์ชันนัลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เคมีการแพทย์ และอุตสาหกรรมยาได้ เนื่องจากเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันที่โยกย้ายหมู่กลูโคซิล/ไกลโคซิลจากสารตั้งต้นตัวให้ไปยังตัวรับได้จึงทำให้เกิดการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ๆ ที่น่าสนใจ [2, 3]

เอนไซม์แอมิโลมอลเตสอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ 4 α -glucanotransferase ชนิดที่ 2 เป็นเอนไซม์ภายในเซลล์เร่งปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของ α -1,4-D-

glucan โดยที่เอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 4 ประเภท [1-3] คือ 1) เร่งปฏิกิริยา disproportionation โดยมีการโยกย้ายหมู่น้ำตาล D-glucan จากตัวให้ไปยังตัวรับ 2) เร่งปฏิกิริยา cyclization เพื่อโยกย้ายหมู่ น้ำตาล D-glucan ภายในโมเลกุลของ α -1,4-glucan ชนิดเดียวกัน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ (large-ring cyclodextrin, LR-CD) หรือเรียกอีกชื่อว่าไซโคลแอมิโลส (cyclic α -1,4-glucan; cycloamylose, CA) ที่มีระดับโพลิเมอไรเซชัน (degree of polymerization; DP) สูงกว่า 16 [4] 3) เร่งปฏิกิริยา coupling เป็นปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยา cyclization สามารถเปลี่ยนไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ให้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรง แต่ปฏิกิริยา coupling ของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสเกิดขึ้นในระดับที่ต่ำมาก เช่นเดียวกันกับปฏิกิริยาที่ 4) คือ ปฏิกิริยา hydrolysis ซึ่งเร่งการสลายพันธะ α -1,4-glucan ของสารตั้งต้นด้วยน้ำ [5-7] แอมิโลมอลเทสพบครั้งแรกใน *E. coli* และเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในเมแทบอลิซึมของน้ำตาลมอลโทส [8, 9] มีการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสเป็นจำนวนมากเพื่อให้เข้าใจถึงบทบาทการทำงานของโมเลกุลภายในเอนไซม์อย่างละเอียด โดยการศึกษาดังกล่าวมุ่งเน้นไปที่เอนไซม์จากแหล่งผลิตแบคทีเรียที่มีความทนร้อนเพื่อให้ได้เอนไซม์ทนร้อน ที่มีความทนทานสูงเหมาะสำหรับการผลิตปริมาณมากในถังหมักทางอุตสาหกรรม มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์แอมิโลมอลเทสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต LR-CDs ซึ่ง LR-CDs สามารถสร้างสารประกอบเชิงซ้อนโดยรวมเข้ากับสารหลากหลายชนิดมีผลช่วยให้สารนั้นๆ มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ดีขึ้น เช่น มีการละลายน้ำที่ดีขึ้น และมีความเสถียรของตัวสารเพิ่มขึ้น เป็นต้น มีรายงานการวิจัยที่มีการใช้เอนไซม์แอมิโลมอลเทสในการผลิตเจลแบ่งที่ทนความร้อน (thermoreversible gel) ได้ สามารถใช้แทนเจลลาติน โดยเมื่อทำการเจลาติไนซ์แป้งมันฝรั่งด้วยเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus thermophilus* จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ประกอบไปด้วยอะไมโลเพคตินที่มีไซ

ด้านข้างที่ยาวขึ้น ผลิตภัณฑ์นี้สามารถละลายได้ในน้ำหรือเปลี่ยนกลับเป็นของเหลวได้เมื่อได้รับความร้อน [10]

โพลีออล หรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) เป็นน้ำตาลที่มีกลุ่มแอลกอฮอล์อยู่ในองค์ประกอบ เช่น อิริทริทอล, อะราบิทอล, ซิลิทอล, แมนนิทอล, กาแลคทิทอล, ซอร์บิทอล และมอลทิทอล เป็นต้น โพลีออลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของน้ำตาลอัลโดสและน้ำตาลคีโตสในระหว่างการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต โพลีออลจัดเป็นสารให้ความหวานที่มีแคลอรีต่ำ โดยเฉลี่ยแล้วโพลีออลให้แคลอรีประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำตาลทรายขาว (sucrose) และไม่ค่อยถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด จึงส่งผลให้ระดับน้ำตาล(กลูโคส)ในเลือดเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เนื่องจากการดูดซึมที่ไม่ดี จึงเหมาะสำหรับผู้บริโภคที่ต้องการลดระดับน้ำตาลในเลือด หรือผู้ป่วยโรคเบาหวาน [11] ตัวอย่างของน้ำตาลโพลีออลที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา เช่น อิริทริทอล ($C_4H_{10}O_4$) มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวที่ไม่ดูดความชื้น ไม่มีกลิ่น มีรสหวานปานกลาง มีจุดหลอมเหลวที่ 122 องศาเซลเซียส [12] และให้พลังงานเพียง 0.2 กิโลแคลอรีต่อกรัมซึ่งมีค่าน้อยกว่า 5% ของน้ำตาลทราย [13] สูตรทางเคมีของอิริทริทอล คือ (2R, 3S)-butane-1,2,3,4-tetraol ซึ่งเป็นโพลีออล 4 คาร์บอน เรียงเป็นเส้นตรง ใช้เป็นสารให้ความหวานแคลอรีต่ำ [14] อิริทริทอลถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กเพียง 10% ของที่รับประทานเข้าไป และแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ไม่สามารถใช้อิริทริทอลในการหมักได้ ดังนั้น อิริทริทอลส่วนใหญ่จึงถูกขับออกทางปัสสาวะเกือบทั้งหมด อีกทั้งยังมีรายงานด้วยว่า แบคทีเรียในช่องปากไม่สามารถหมักอิริทริทอลได้ จึงไม่มีการผลิตกรดที่นำไปสู่การเกิดฟันผุ และพบว่าอิริทริทอลมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus mutans* ที่เป็นสาเหตุของโรคฟันผุ (dental caries) ได้ [14] ปัจจุบันนิยมผลิตอิริทริทอลจากปฏิกิริยารีดักชันของ D-erythrose โดยมีการเติมหมู่ไฮโดรเจนเข้าไป [15] ในทางอุตสาหกรรมมีการประยุกต์ใช้อิริทริทอลในหมากฝรั่ง และลูกอมที่ปราศจากน้ำตาล

มีการใช้อิทธิพลมากในน้ำอัดลม มีการใช้อิทธิพลเพื่อช่วยเพิ่มรสชาติของเครื่องดื่มที่มีรสหวานจากหญ้าหวาน [13] นอกจากนี้โพลีออลส่วนใหญ่ยังมีคุณสมบัติไม่ดูดความชื้นจึงถูกนำมาใช้เป็นสารชะลอการดูดซับความชื้นในชิ้นผลไม้ ผลไม้อัดแท่ง และขนมที่ทำจากแป้ง ตลอดจนใช้เป็นส่วนประกอบในสารที่ใช้เคลือบอาหาร [14]

สำหรับงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ของเซลล์รีคอมบิแนนท์ การทำเอนไซม์แอมิโลมอลเตสให้บริสุทธิ์ และการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์แอมิเลส ตลอดจนการศึกษาความจำเพาะต่อตัวรับโพลีออลของเอนไซม์จากปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน และความสามารถในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคซิลโพลีออลของเอนไซม์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี วัสดุและสายพันธุ์แบคทีเรีย

กลูโคส (G_1), มอลโทส (G_2), มอลโทไตรโอส (G_3), มอลโทเตตระโอส (G_4), เซรัมโบวินอัลบูมิน และแอมพิซิลินจากบริษัท Sigma-Aldrich ไฮโปเปปโตโนจากบริษัท Nihon Pharmaceutical Co., Ltd. โซเดียมคลอไรด์จากบริษัท J.T. Baker (Selangor Darul Ehsan, Malaysia) แป้งมันสำปะหลังจากบริษัท Flo-max™ (Amsterdam, Netherlands) น้ำตาลโพลี ออลจากบริษัท TCI (Toshima, Kita-ku, Tokyo, Japan) เมทานอล, ไอโซโพรพิล, ผงวุ้น, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต, ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต และแผ่นโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC silica gel 60 F₂₅₄ glass plates) จากบริษัท Merck (Darmstadt, Germany) IPTG จากบริษัท Vivantis (Sendirian Berhad, Malaysia) เอทิลอะซิเตทจากบริษัท VWR (fontenay sous bois, France) กรดซัลฟูริกจากบริษัท Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, France) ชุดตรวจวัดกลูโคสออกซิเดสจากบริษัท Human mti-diagnostics GmbH

(Idstein, Germany) โครมาโทกราฟีคอลัมน์ HisTrap FF™ จากบริษัท GE Healthcare (UK) อิมิดาโซลจากบริษัท USB Corporation (Ohio, United States) และสารเคมีอื่นๆ

เซลล์รีคอมบิแนนท์ p19AMY ที่มีพลาสมิด pET-19b ประกอบด้วยยีนของเอนไซม์ AMase จาก *Thermus* sp. ที่แสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) [16]

2.2 การเลี้ยงแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย

2.2.1 การเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์เพื่อผลิตเอนไซม์แอมิโลมอลเตส

เซลล์รีคอมบิแนนท์ p19AMY จะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ LB ที่พีเอช 7.2 ที่ประกอบด้วยไฮโป เปปโตโน 1 เปอร์เซ็นต์, สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์, โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์และ แอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเขย่าที่ 250 รอบต่อนาทีจนกระทั่งวัดค่า OD₆₀₀ ได้ประมาณ 0.4-0.6 จึงใส่ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ เพื่อเหนี่ยวนำให้ยีนแอมิโลมอลเตสมีการแสดงออก และเขย่าต่อไปที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลาอีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเก็บเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 4,800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที ต่อมานำเซลล์ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง ultraonic homogenizer เพื่อให้ได้เอนไซม์แอมิโลมอลเตสชนิดหยาบ

2.2.2 การทำเอนไซม์แอมิโลมอลเตสให้บริสุทธิ์

นำเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตในข้อที่ 2.2.1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ HisTrap FF™ ทำการเตรียมคอลัมน์โดยการชะด้วยบัฟเฟอร์ ก. (20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กับอิมิดาโซลความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นผ่านเอนไซม์แอมิโลมอลเตสเข้าสู่คอลัมน์ แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ ก. จนกระทั่งค่า A₂₈₀ ลดลงเป็น

ศูนย์จึงทำการแช่เอนไซม์แอมิโลมอลเลสที่เกาะอยู่กับคอลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ ข. (20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 ที่ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กับอิมิดาโซลความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์) ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิม [16] และเก็บเอนไซม์แอมิโลมอลเลสบริสุทธิ์ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ เพื่อหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี starch transglycosylation [17] และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford [18]

2.3 การวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอมิโลมอลเลส

2.3.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี starch transglycosylation

ปฏิกิริยา starch transglycosylation ประกอบด้วยการใช้ 0.2% (w/v) แป้งมันฝรั่งที่ละลายน้ำปริมาตร 250 ไมโครลิตร 1% (w/v) มอลโทสปริมาตร 50 ไมโครลิตร เอนไซม์แอมิโลมอลเลส 100 ไมโครลิตร และ 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.4 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกันทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการ

ต้มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำสารละลายมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายไอโอดีน 1 มิลลิลิตร ที่ประกอบไปด้วยไอโอดีนความเข้มข้น 0.02% (w/v) ในโพแทสเซียมไอโอไดด์ความเข้มข้น 0.2% (w/v) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยที่กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ความเข้มข้นสีน้ำเงินของสารประกอบเชิงซ้อนของแป้ง-ไอโอดีน ลดลง 1 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.3.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี กลูโคสออกซิเดส

การวัดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันโดยวิธี กลูโคสออกซิเดส ทำโดยผสมสารต่างๆ ตามรายงานของ Miwa และคณะ [19] เมื่อปฏิกิริยาครบกำหนดเวลา ดูดสารละลายผสมมา 10 ไมโครลิตร เติมน้ำยา กลูโคสออกซิเดส 1 มิลลิลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร ความเข้มข้นของกลูโคสคำนวณจากสมการที่ 2.1

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร)} = \frac{5.55 \times A_{\text{sample}}}{A_{\text{std}}} \quad [2.1]$$

การดูดกลืนของสารละลายมาตรฐาน (A_{std}) วัดโดยใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร (5.55 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร) กับน้ำยา กลูโคสออกซิเดส 1 มิลลิลิตร กำหนดให้หนึ่งหน่วยกิจกรรมของปฏิกิริยา หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตกลูโคส 1 ไมโครโมล ต่อเวลาที่ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.4 การวัดปริมาณโปรตีน

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน (protein assay reagent) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

595 นาโนเมตร ภายในเวลา 30 นาที ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford [18, 20] โดยใช้ BSA (1 มก./มล.) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.5 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Native-PAGE และ วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอมิโลมอลเลสด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยเทียบกับขนาดของโปรตีนมาตรฐาน [20-23]

2.6 ความจำเพาะต่อตัวรับในการสังเคราะห์กลูโคซิลโพลีออลของเอนไซม์แอมิโกลมอลเทส

การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสต่อตัวรับโพลีออล โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นตัวให้กับโพลีออลชนิดต่างๆ เป็นสารตั้งต้นตัวรับที่มีความเข้มข้น 1% (w/v) ทำการบ่มตัวให้กับตัวรับแต่ละชนิดใน 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความสามารถของเอนไซม์ต่อตัวรับโพลีออลชนิดต่างๆ ในการเร่งปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน วัดจากผลผลิตกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีกลูโคสออกซิเดส โดยคิดเทียบให้ตัวรับมอลโทสที่ให้ปริมาณผลผลิตสูงสุดเป็น 100%

2.7 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคซิลโพลีออลด้วยเทคนิค TLC

การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคซิลโพลีออลบนแผ่น TLC (ซิลิกาเจล 60 F₂₅₄ ขนาด 20x20 เซนติเมตร) ทำ

โดยใช้เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วยไอโซโพรพานอล/เอทิลอะซิเตท/น้ำ ในอัตราส่วน 3:1:1 (v/v) เมื่อชะแผ่น TLC ด้วยตัวทำละลายที่เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว นำแผ่น TLC ไปจุ่มลงในสารละลายกรดซัลฟูริกต่อเมทานอลในอัตราส่วน 1:9 (v/v) 2 รอบ จากนั้นนำแผ่น TLC ไปทำให้แห้งและให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นได้ (จุดสีน้ำตาลเข้ม/ดำ) ด้วยเครื่องวัดความเข้มของสีแบบสแกน (scanning densitometer) โดยใช้โปรแกรม Bio-Rad Quantity One 1-D (G-800) กำหนดให้จุดความเข้มของมอลโทส (5 ไมโครกรัม) เป็นจุดมาตรฐาน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากสมการ 2.2

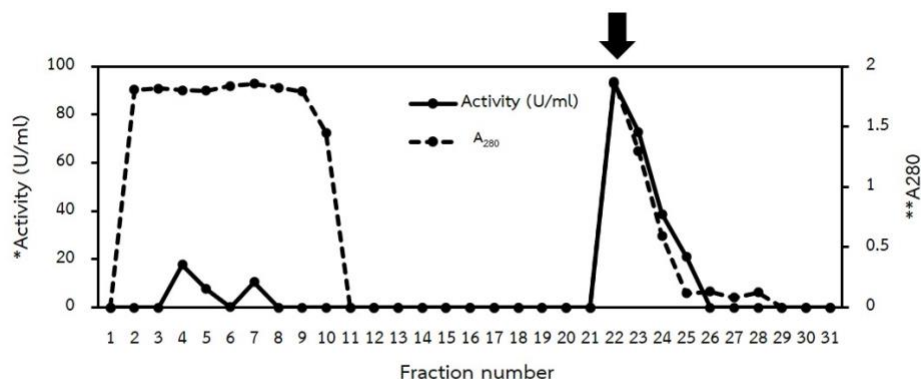
$$\text{ผลผลิตที่ได้ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้} \times 100}{\text{ปริมาณของสารตั้งต้นตัวรับที่เวลาเริ่มต้น}} \quad [2.2]$$

3. ผลการศึกษาและวิจารณ์

3.1 การผลิตและการทำเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสให้บริสุทธิ์

ภายหลังการผลิตและการทำเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสให้บริสุทธิ์ตามสภาวะที่ได้กล่าวข้างต้น พบว่าเอนไซม์ถูกชะออกมาใน fraction ที่ 21-26 (รูปที่ 1) ตำแหน่งถูกครีส์ตำราตำแหน่งที่ทำการชะเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสด้วยบัฟเฟอร์ ข. ผลการทำเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสให้บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสชนิดหยาบมีค่ากิจกรรมจำเพาะที่ 16 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และหลังจากผ่านเอนไซม์ชนิดหยาบเข้าสู่คอลัมน์ HisTrap FF™ แล้ว พบว่าเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9 เท่า โดยให้ค่ากิจกรรมจำเพาะที่ 149 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนและให้ผลผลิต 36 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) จาก

รายงานก่อนหน้านี้ พบว่าเอนไซม์แอมิโกลมอลเทสจาก *Synechocystis* sp. PCC 6803 สามารถทำให้บริสุทธิ์ขึ้นเป็น 2.9 เท่าโดยให้ผลผลิต 84 เปอร์เซ็นต์ [24] และแอมิโกลมอลเทสจาก *Thermus brockianus* ได้รับการทำให้บริสุทธิ์ 35 เท่าโดยให้ผลผลิต 67 เปอร์เซ็นต์ หลังการให้ความร้อน (heat treatment) และใช้โครมาโทกราฟีคอลัมน์ Ni²⁺-NTA [25] เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์กับแอมิโกลมอลเทสจากแหล่งอื่นๆ จะเห็นว่า แอมิโกลมอลเทสในการศึกษานี้สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นในจำนวนเท่าที่มากกว่า แต่ผลผลิตของเอนไซม์ที่ได้ค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้เนื่องจาก แอมิโกลมอลเทสจาก *Thermus* sp. มีเสถียรภาพของเอนไซม์ยังไม่ดี มีความจำเป็นต้องศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ต่อไป



*Activity assayed by starch transglycosylation activity.

**A₂₈₀ assayed by Bradford's method.

Figure 1 Purification of AMase from p19bAMY transformant cells by HisTrap FF™ affinity column chromatography

Table 1 Purification of AMase from p19bAMY transformant cells

Fraction	Total volume (ml)	Total activity ^b (U)	Total protein ^c (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	% Yield
Crude extract ^a	10.00	536.80	32.30	16.62	1.00	100
HisTrap FF™	2.00	194.06	1.30	149.30	8.98	36.15

^aCrude extract was prepared from 1.0 liter of cell culture.

^bAssayed by starch transglycosylation activity

^cAssayed by Bradford's method

3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำสารละลายเอนไซม์ส่วนต่างๆ ที่เตรียมได้ ได้แก่ เอนไซม์ชนิดหยาบ (crude extract/enzyme) และเอนไซม์หลังการแยกด้วยคอลัมน์ HisTrap FF™ มาติดตามแถบโปรตีน โดยย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน coomassie brilliant blue R-250 (รูปที่ 2A.) และย้อมด้วยสารละลายแป้งและไอโอดีนเพื่อตรวจวัดกิจกรรม starch transglycosylation บนแผ่นเจล (รูปที่ 2B.)

ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Native-PAGE ในรูป 2A. พบว่าเอนไซม์ชนิดหยาบให้โปรตีนหลายแถบ และเมื่อผ่านเอนไซม์นี้เข้าสู่คอลัมน์ HisTrap FF™ แล้วจะปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวบนแผ่นเจล เป็นการยืนยันได้ว่าโปรตีนที่ได้มีความบริสุทธิ์เหมาะที่จะใช้ศึกษาลักษณะสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ นอกจากนี้ ในรูป 2B. ยังสังเกตเห็นแถบใส (clear band) ที่ชัดเจนบนพื้นหลังสีเขียวน้ำเงินเข้มใน

ตำแหน่งเดียวกับแถบโปรตีนบริสุทธิ์ ผลลัพธ์นี้ช่วยบ่งชี้ว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้เป็นเอนไซม์แอมิโลมอลเตสซึ่ง

สามารถเร่งกิจกรรม starch transglycosylation เพื่อย่อยสลายแป้งได้

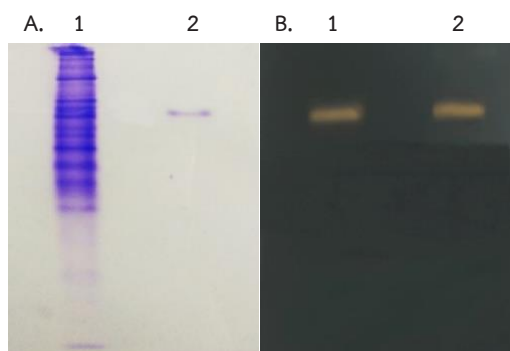


Figure 2 10% Non-denaturing PAGE of AMase from each purification step

(A.) Coomassie brilliant blue staining Lane 1: Crude enzyme (30 µg) Lane 2: Histrap FF™ column chromatography (5 µg) (B.) Starch transglycosylation activity staining Lane 1: Crude enzyme (0.2 U) Lane 2: Histrap FF™ column chromatography (0.2 U)

จากรูปที่ 3 ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของเอนไซม์แอมิโลมอลเตสด้วยเทคนิค SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์แอมิโลมอลเตสมีขนาดเท่ากับ 60 กิโลดาลตันสัมพันธ์กับขนาดของยีน AMase จากรายงานก่อนหน้านี้ [16] ซึ่งพบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกันกับเอนไซม์กลูคาโนทรานส์เฟอเรสหรือแอมิโลมอลเตส (4αGTase) จาก *T. Aquatus* (57 กิโลดาลตัน) [26], *Synechocys-*

tis sp. PCC 6803 (57 กิโลดาลตัน) [24] และ D-enzyme ของมันฝรั่ง (60 กิโลดาลตัน) [27] แต่มีขนาดแตกต่างจากเอนไซม์กลูคาโนทรานส์เฟอเรสใน *Thermococcus litoralis* (79 กิโลดาลตัน) [28], *C. glutamicum* (84 กิโลดาลตัน) [29] และ *E. coli* IFO 3806 (93 กิโลดาลตัน) [30] ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอมิโลมอลเตสมีคุณสมบัติเฉพาะตามแหล่งผลิตของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

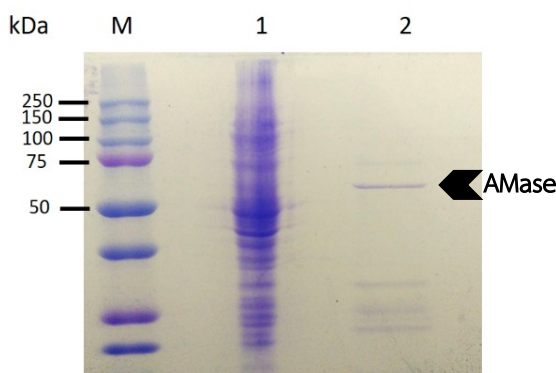


Figure 3 10% SDS-PAGE of AMase from each purification step

Lane M: Protein marker (prestained protein standard BIO-RAD) (10 µl) Lane 1: Crude enzyme (30 µg) Lane 2: Histrap FF™ column (5 µg) The arrow indicates a molecular weight of AMase (60 kDa)

3.3 ความจำเพาะต่อตัวรับและปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสรีคอมบิแนนท์ต่อการสังเคราะห์กลูโคซิลโพลีออล

การศึกษาความจำเพาะต่อตัวรับของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสรีคอมบิแนนท์ด้วยวิธีกลูโคสออกซิเดส (รูปที่ 4) ผลการศึกษา พบว่ามอลโทสให้กิจกรรมสูงสุด ซึ่งกำหนดเป็น 100% ตามมาด้วย อิริทริทอล มอลทิทอล ไสลิทอล แมนนิทอล อะราบิทอล กาแลคทิทอล และซอร์บิทอล ซึ่งให้ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์เป็น 52.7, 43.9, 21.9, 17.5, 16.7, 13.2 และ 10.9% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับมอลโทส และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ กลูโคซิลโพลีออลที่ผลิตขึ้นด้วยเทคนิค TLC หลังจากการบ่มปฏิกิริยาครบ 24 ชม. พบว่าเฉพาะปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ใช้มอลโทส (รูปที่ 5 ช่องที่ 6) และน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดอิริทริทอลเป็นสารตั้งต้นตัวรับ (รูปที่ 5 ช่องที่ 8) เท่านั้น ที่สามารถผลิตผลิตภัณฑ์มอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์และผลิตภัณฑ์กลูโคซิลโพลีออลชนิดอิริทริทอลกลูโคไซด์ได้ โดยในการศึกษานี้เราสนใจในส่วน

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้สารโพลีออลเป็นตัวรับเนื่องจากสามารถใช้เป็นน้ำตาลต้านฟันผุได้ โดยผลิตภัณฑ์จากโพลีออลที่สังเคราะห์ได้พบว่ามี 4 ชนิด คือ กลูโคซิล-อิริทริทอล (EG_1) มอลโทซิล-อิริทริทอล (EG_2) มอลโทไตรโอซิล-อิริทริทอล (EG_3) และมอลโทเตตระโอซิล-อิริทริทอล (EG_4) ตามลำดับ โดยมีค่าผลรวมของผลิตภัณฑ์เป็น 29.3%

สำหรับในรูปที่ 6 พบว่าช่องที่ 11 กับ 12 เกิดจุดเข้มสีดำขึ้นด้วย แต่จุดสีดำเข้มที่เกิดขึ้นพิสูจน์ได้ว่าเป็นสารตั้งต้น(มอลทิทอล) ที่เหลืออยู่ของปฏิกิริยา เนื่องจากช่องที่ 12 ซึ่งบ่มปฏิกิริยาครบ 24 ชั่วโมง เกิดจุดสีดำเข้มที่ตำแหน่งเดียวกันกับที่สถานะตั้งต้นของการบ่มปฏิกิริยาที่ 0 ชั่วโมง โดยปกติแล้วโพลีออล (น้ำตาลแอลกอฮอล์) จะไม่สามารถมองเห็นได้บนแผ่น TLC แต่เนื่องจากโครงสร้างของมอลทิทอลประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกับซอร์บิทอล จึงสามารถทำให้มองเห็นได้แม้จะไม่ได้เกิดปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันเพื่อสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคซิลโพลีออลขึ้นก็ตาม (รูปที่ 6 ช่องที่ 11-12)

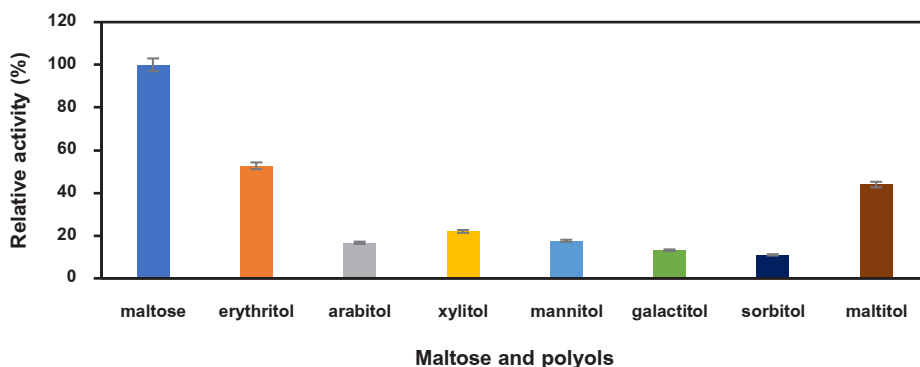


Figure 4 Starch transglycosylation activity of the recombinant AMase with various polyol and maltose acceptors assayed by glucose oxidase method

ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันประกอบด้วยการ
บ่ม 1% (w/w) แป้งมันสำปะหลังและ 1% (w/w)
มอลโทสหรือโพลีออลใน 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต
บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง ความสามารถของเอนไซม์ต่อตัวรับโพลี
ออลชนิดต่างๆ วัดจากผลผลิตกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยวิธี
กลูโคสออกซิเดส

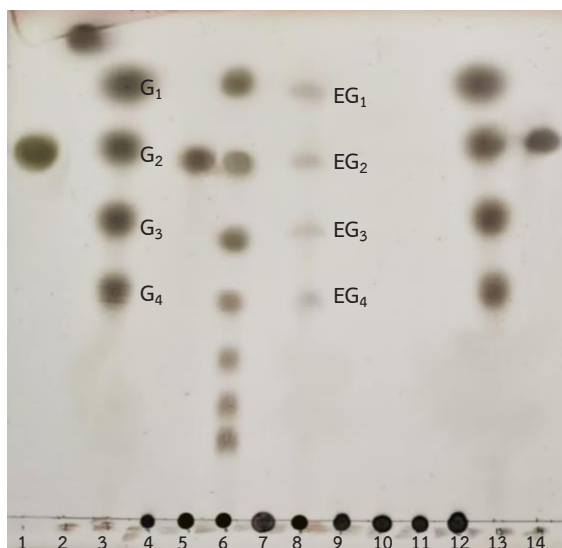


Figure 5 TLC analysis of the glucosyl-polyol products

TLC analysis of the glucosyl-polyol products of AMase (90 U). Reaction mixture incubated with 1% (w/v) tapioca starch and various polyol acceptors. Lanes 1, 14: Standard maltose (5 μ g); Lane 2: 1% (w/v) xylose (5 μ g); Lanes 3, 13: G_1 - G_4 (10 μ g); Lane 4: tapioca starch (10 μ g); Lanes 5, 6: reaction mixture with 2% (w/v) maltose acceptor for 0 and 24 hours; Lanes 7, 8: reaction mixture with 2% (w/v) erythritol acceptor for 0 and 24 hours; Lanes 9, 10 reaction mixture with 2% (w/v) arabitol acceptor for 0 and 24 hours; Lanes 11, 12: reaction mixture with 2% (w/v) xylitol acceptor for 0 and 24 hours. TLC condition was used as isopropyl/ethyl acetate/water with a 3:1:1 (v/v) ratio.

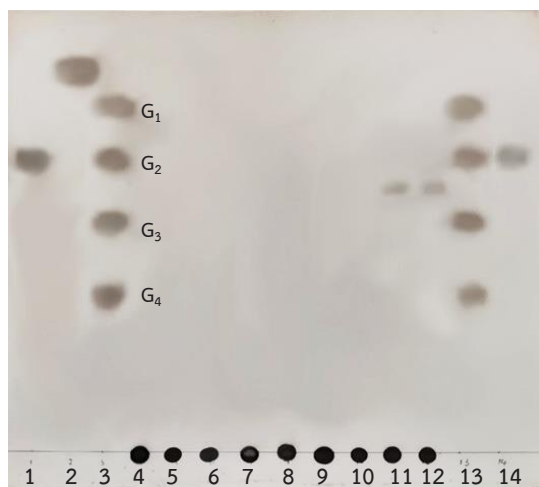


Figure 6 TLC analysis of the glucosyl-polyol products

TLC analysis of the glucosyl-polyol products of AMase (90 U). Reaction mixture incubated with 1% (w/v) tapioca starch and various polyol acceptors. Lanes 1, 14: standard maltose (5 µg); Lane 2: 1% (w/v) xylose (5 µg); Lanes 3, 13: G_1 - G_4 (10 µg); Lane 4: tapioca starch (10 µg); Lanes 5, 6: reaction mixture with 2% (w/v) mannitol acceptor for 0 and 24 hours; Lanes 7, 8: reaction mixture with 2% (w/v) galactitol acceptor for 0 and 24 hours; Lanes 9, 10: reaction mixture with 2% (w/v) sorbitol acceptor for 0 and 24 hours; Lanes 11, 12: reaction mixture with 2% (w/v) maltitol acceptor for 0 and 24 hours. TLC condition was used as isopropyl/ethyl acetate/water with a 3:1:1 (v/v) ratio.

4. สรุปผลการศึกษา

พลาสมิด p19bAMY ที่สร้างจากเวกเตอร์ pET-19b และยีนแอมิโลมอลเตสของแบคทีเรีย *Thermus* sp. สามารถแสดงออกได้ใน *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) และใช้สำหรับผลิตเอนไซม์แอมิโลมอลเตสในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ IPTG 0.8 มิลลิโมลาร์ในอาหาร LB สำหรับการทำให้เอนไซม์แอมิโลมอลเตสให้บริสุทธิ์สามารถทำได้ใน 1 ขั้นตอนโดยใช้คอลัมน์ HisTrap FF™ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9 เท่าและมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อยู่ที่ 150 ยูนิต/มิลลิกรัม โดยให้ผลผลิตที่ 36% และมวลโมเลกุลของเอนไซม์แอมิโลมอลเตสรีคอมบิแนนท์ที่บริสุทธิ์เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีขนาดเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน เมื่อ

ศึกษาความจำเพาะต่อตัวรับและปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์แอมิโลมอลเตสต่อการสังเคราะห์กลูโคซิลโพลีออล โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นตัวให้และน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เป็นตัวรับ พบว่าอิทธิพลเป็นตัวรับที่ดีที่สุดในกลุ่มน้ำตาลโพลีออลโดยให้ผลผลิตสูงสุดที่ 29.3% (w/w) และด้วยคุณสมบัติของน้ำตาลแอลกอฮอล์อิทธิพลกลูโคไซด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งทางอุตสาหกรรม และทางชีวการแพทย์ เช่น ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารกลุ่ม sugar free ใช้เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำสำหรับผู้ป่วยเบาหวานหรือใช้เป็นน้ำตาลต้านฟันผุได้ เนื่องจากโพลีออลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์นี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Streptococcus*

mutans ที่เป็นสาเหตุสำคัญของปัญหาช่องปากได้ และเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดนำไปสู่การใช้เป็นผลิตภัณฑ์น้ำตาลต้านฟันผุ จึงควรศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

น.ส. ปริญญญา แห้วเพชร ได้รับทุนปริญญาเอก มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีการศึกษา 2560 ผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ทุนนี้

6. References

- [1] Yu, H., and Chen, X., 2008, Enzymatic synthesis of carbohydrate-containing biomolecules, pp.1-22, Wiley Encyclopedia of Chemical Biology.
- [2] Jaitak, V., Kaul, V. K., Kumar, N., Singh, B., Savergave, L. S., Jogdand, V. V., and Nene, S., 2009, Simple and efficient enzymatic transglycosylation of stevioside by β -cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*, *Biotechnol. Lett.* 31: 1415-1420.
- [3] Jung, S. W., Kim, T. K., Lee, K. W., and Lee, Y. H., 2007, Catalytic properties of β -cyclodextrin glucanotransferase from *Alkalophilic Bacillus* sp. BL-12 and intermolecular transglycosylation of stevioside, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 12: 207-212.
- [4] Przytyl, I., Tomoo, K., Terada, Y., Takaha, T., Fujii, K., Saenger, W., and Sträter, N., 2000, Crystal structure of amylomaltase from *Thermus aquaticus*, a glycosyltransferase catalysing the production of large cyclic glucans, *J. Mol. Biol.* 296: 873-886.
- [5] Takaha, T., and Smith, S. M., 1999, The functions of 4- α -glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 16: 257-280.
- [6] Bhuiyan, S. H., Kitaoka, M., and Hayashi, K., 2003, A cycloamylose-forming hyperthermostable 4- α -glucanotransferase of *Aquifex aeolicus* expressed in *Escherichia coli*, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 22: 45-53.
- [7] Szejtli, J., 1988, Cyclodextrin Technology, Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- [8] Boos, W., and Shuman, H., 1998, Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 204-229.
- [9] Monod, J., and Torriani, A. M., 1950, Amylomaltase of *Escherichia coli*, *Annales de l'Institut Pasteur.* 78(1): 65-77.
- [10] Kaper, T., van der Maarel, M., Euverink, G. J., and Dijkhuizen, L., 2004, Exploring and exploiting starch-modifying amylomaltases from thermophiles, *Biochem. Soc. Trans.* 32: 279-282.
- [11] Marcus, J. B., 2013, Carbohydrate basics: sugars, starches and fibers in foods and health, *Food science and the culinary arts*, pp. 149-187.
- [12] Rapaille, A. G. J., Heume M., 2016, Sugar Alcohols, In Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health*, Oxford: Academic Press
- [13] BeMiller, J. N., 2019, Carbohydrate reactions. carbohydrate chemistry for food scientists, AACC International Press.

- [14] Frigaard, N. U., 2018, Sugar and Sugar Alcohol Production in Genetically Modified Cyanobacteria.
- [15] Granström, T., and Leisola, M., 2013, Microbial production of xylitol and other polyols, In microbial production of food ingredients, pp 469-493.
- [16] Watanasatitarpa, S., Rudeekulthamrong, P., Krusong, K., Srisimarat, W., Zimmermann, W., Pongsawasdi, P., and Kaulpiboon, J., 2014, Molecular mutagenesis at Tyr-101 of the amyloamylase transcribed from a gene isolated from soil DNA, Appl. Biochem. Microbiol. 50: 243-252.
- [17] Park, J. H., Kim, H. J., Kim, Y. H., Cha, H., Kim, Y. W., Kim, T. J., Kim, Y. R., and Park, K. H., 2007, The action mode of *Thermus aquaticus* YT-1 4- α -glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin, Carbohydr. Polym. 67: 164-173.
- [18] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72: 248-254.
- [19] Miwa, I., Okuda, J., Maeua, K., and Okuda, G., 1972, Mutarotase effect on colorimetric determination of blood glucose with β -D-glucose oxidase, Clinica Chimica Acta. 37: 538-540.
- [20] Weber, K., and Osborn, M., 1975, Proteins and SDS: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures, The Proteins, Academic Press, New York.
- [21] Chotipanang, K., Bhunthumnavin, W., and Prousoontorn, M. H., 2011, Synthesis of alkyl glycosides from cyclodextrin using cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. RB01, J. Inclusion Phenom. Macrocylic Chem. 70: 359-368.
- [22] Kaulpiboon, J., and Pongsawasdi, P., 2005, Purification and characterization of cyclodextrinase from *Paenibacillus* sp. A11, Enzyme Microb. Technol. 36: 168-175.
- [23] Kaulpiboon, J., Poomipark, N., and Watanasatitarpa, S., 2016, Expression and characterization of amyloamylase gene involved in the large-ring cyclodextrin and isomalto-oligosaccharide production, Thammasat Int. J. Sci. Technol. 21: 18-28.
- [24] Lee, B. H., Oh, D. K., and Yoo, S. H., 2009, Characterization of 4- α -glucanotransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and its application to various corn starches, New Biotechnol. 26: 29-36.
- [25] Bang, B. Y., Kim, H. J., Kim, H., Baik, M.Y., Ahn, S. C., Kim, C., and Park, C. S., 2006, Cloning and overexpression of 4- α -glucanotransferase from *Thermus brockianus* (TBGT) in *E. coli*, J. Microbiol. Biotechnol. 16: 1809-1813.
- [26] Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T., and Okada, S., 1999, *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amyloamylase gene cloning and expression and enzyme characterization: production of cycloamylose, Appl. Environ. Microbiol. 65: 910-915.
- [27] Takaha, T., Yanase, M., Okada, S., and Smith, S. M., 1993, Disproportionating

- enzyme (4- α -glucanotransferase; EC 2.4.1.25) of potato: purification, molecular cloning, and potential role in starch metabolism, J. Biol. Chem. 268: 1391-1396.
- [28] Xavier, K. B., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W., and Santos, H., 1999, Maltose metabolism in the hyperthermophilic archaeon thermococcus purification and characterization of key enzymes, J. Bacteriol. 181: 3358-3367.
- [29] Srisimararat, W., Powviriyakul, A., Kaulpi-boon, J., Krusong, K., Zimmermann, W., and Pongsawasdi, P., 2011, A novel amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the large-ring cyclodextrin products, J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem. 70: 369-375.
- [30] Kitahata, S., Murakami, H., and Okada, S., 1989, Purification and some properties of amylomaltase from *Escherichia coli* IFO 3806, Agric. Biol. Chem. 53: 2653-2659.