



การทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสและเอนไซม์แอมิโลมอลเตส
เพื่อใช้ในการสังเคราะห์รูทีนไกลโคไซด์

Purification of Cyclodextrin Glycosyltransferase and Amylomaltase for Rutin Glycoside Synthesis

ทักษิณ ลันอาร์ณ¹, จารุณี ควรพิบูลย์^{2*}

¹หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

²สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก สาขาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

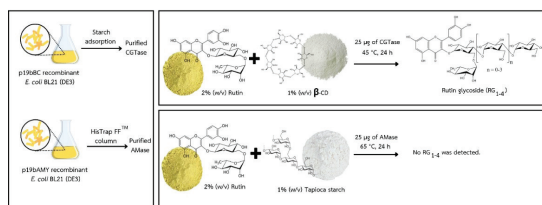
Thaksin Lunarun¹, Jarunee Kaulpi boon^{2*}

¹Biochemistry and Molecular Biology Master Degree Program, Faculty of Medicine, Thammasat University, Pathum Thani 12120

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

Received 13 July 2024; Received in revised 19 February 2025; Accepted 28 February 2025

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Rutin, a bioflavonoid with beneficial properties, suffers from poor water solubility and low stability, leading to inadequate gastrointestinal absorption. To overcome these limitations, the synthesis of rutin glycosides with improved solubility and stability was investigated using cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) and amyloamylase (AMase). This study aimed to identify the most effective enzyme for catalyzing the transglycosylation reaction. CGTase, derived from recombinant p19bBC in *Escherichia coli* BL21 (DE3), was produced by

shaking incubation at 250 rpm and 37°C for 24 hours, with an IPTG concentration of 0.2 mM. The CGTase was purified by starch adsorption, which increased the enzyme purity 5-fold with a specific activity of 4,530 U/mg, a 73% yield, and a molecular weight of 72 kDa. Similarly, AMase was produced from recombinant p19bAMY in *E. coli* BL21 (DE3) under the same incubation conditions, with an IPTG concentration of 0.8 mM. The enzyme was purified using HisTrap FF column, resulting in a 56-fold increase in purity, a specific activity of 391 U/mg, a 51% yield, and a molecular weight of 60 kDa. Thin-layer chromatography (TLC) analysis of the transglycosylation reactions revealed that CGTase catalyzed the formation of four distinct rutin glycosides (RG₁-RG₄) when beta-cyclodextrin was used as the glycosyl donor. In contrast, AMase did not catalyze the formation of any rutin derivatives. Therefore, CGTase is considered a promising enzyme for the synthesis of rutin glycosides.

คำสำคัญ	บทคัดย่อ
ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิล ทรานสเฟอเรส (CGTase); แอมิโลมอลเทส (AMase); รูติน; รูตินไกลโคไซด์; ทรานส์ไกลโคซิเลชัน Keywords Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase); Amylomaltase (AMase); Rutin; Rutin glycosides; Transglycosylation	รูตินเป็นไบโอฟลาโวนอยด์ที่มีประโยชน์ แต่ละลายน้ำและเสถียรภาพต่ำทำให้ดูดซึมในทางเดินอาหารได้ไม่ดี การศึกษานี้จึงได้สังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ที่ละลายน้ำและเสถียรขึ้นด้วยเอนไซม์ CGTase และ AMase และเพื่อค้นหาเอนไซม์ที่เหมาะสม CGTase จาก <i>E. coli</i> BL21 (p19bBC) ผลิตโดยเขย่าเชื้อที่ 250 rpm 37°C 24 ชั่วโมง ใช้ IPTG 0.2 มิลลิโมลาร์และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดูดซับด้วยแป้ง พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5 เท่า มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 4,530 หน่วยต่อมิลลิกรัม ให้ผลผลิต 73% น้ำหนักโมเลกุล 72 กิโลดาลตัน ในขณะที่การผลิตเอนไซม์ AMase จาก <i>E. coli</i> BL21 (p19bAMY) เขย่าเชื้อที่ 250 rpm 37°C 24 ชั่วโมง ใช้ IPTG 0.8 มิลลิโมลาร์ ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ HisTrap FF พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 56 เท่า มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ 391 หน่วยต่อมิลลิกรัม ให้ผลผลิต 51% น้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน การวิเคราะห์ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันด้วย TLC แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ CGTase สามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างรูตินไกลโคไซด์ที่แตกต่างกันสี่ชนิด (RG₁-RG₄) เมื่อใช้เบต้า-ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นตัวให้หมู่ไกลโคไซด์ ในขณะที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์ AMase ไม่สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์ของรูตินได้ ดังนั้นเอนไซม์ CGTase จึงเป็นเอนไซม์หนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ได้

1. บทนำ

รูติน (Rutin, 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rhamnoglucoside) เป็นฟลาโวนอยด์ไกลโคไซด์ที่เกิดจากการรวมกันของเคอควิซินและน้ำตาลรูตินโนส ที่บริเวณตำแหน่ง OH-3 ของเคอควิซิน พบในผักและผลไม้หลายชนิด โดยเฉพาะบักวีท แอปริคอต เชอร์รี่ องุ่น เกรปฟรุ้ต พลัม ชาเขียว และส้ม [1] รูตินมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันหลอดเลือด ด้านมะเร็ง ป้องกันระบบประสาท ด้านแบคทีเรียและเชื้อรา [2] อย่างไรก็ตาม รูตินมีความสามารถในการละลายน้ำและความเสถียรต่ำ ทำให้การดูดซึมในระบบย่อยอาหารไม่ดีเท่าที่ควร เป็นเหตุให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านอาหารและยา [3] มีรายงานการศึกษาหลายชิ้นที่มีจุดประสงค์ในการเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและประสิทธิภาพของรูติน เช่น การห่อหุ้มรูตินด้วยไขมันที่มีโครงสร้างระดับนาโน [4] การห่อหุ้มรูตินด้วยเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน [5] และการสังเคราะห์อนุพันธ์ของรูตินโดยอาศัยปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินกลูคาโนทรานสเฟอเรสจาก *Geobacillus* sp. [6] เป็นต้น รูตินไกลโคไซด์ (Rutin glycosides, RGs) เป็นอนุพันธ์ของรูติน มีประโยชน์และมีความน่าสนใจในหลาย ๆ ด้านเมื่อเปรียบเทียบกับรูติน เช่น *ความสามารถในการละลายน้ำ*: รูตินปกติมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ การเปลี่ยนเป็นรูตินไกลโคไซด์ช่วยให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น ทำให้มีศักยภาพสูงขึ้นในการนำไปใช้งานด้านเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมอาหารในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเครื่องดื่ม โดยการละลายของสารที่ดีเป็นปัจจัยหนึ่งทางเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics) ที่จะช่วยให้ยาดูดซึมเข้าร่างกาย (Drug absorption) ได้ดียิ่งขึ้น, *ด้านการเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพของรูติน*: การเติมหมู่ไกลโคไซด์ช่วยเพิ่มเสถียรภาพของรูตินในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด เช่น ระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น, *ด้านอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง*: รูตินไกลโคไซด์สามารถนำไปใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเครื่องสำอาง หรือเป็นส่วนผสมในยา

ที่ช่วยเสริมสุขภาพหลอดเลือด ด้านการอักเสบ เสริมฤทธิ์การดูดซึมวิตามินซี และช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด (Potential anti-diabetic effect) [2, 6, 7]

ปฏิกิริยาไกลโคซิเลชันของเอนไซม์โดยการถ่ายโอนหน่วยไกลโคซิลจากตัวให้ไปยังตัวรับทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ เป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีศักยภาพในการเพิ่มความสามารถในการละลาย การดูดซึมและความคงตัวของสารประกอบทางชีวภาพหลายชนิด [7] ปฏิกิริยาของเอนไซม์มีข้อดีกว่าปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากมีความจำเพาะและความเสถียรสูง ความเป็นพิษและต้นทุนต่ำ [8] โดยเอนไซม์ต่างชนิดกันจะมีความจำเพาะต่อตำแหน่งทรานส์ไกลโคซิเลชันของโมเลกุลตัวรับแตกต่างกัน นำไปสู่ผลิตภัณฑ์ไกลโคไซด์ที่หลากหลายซึ่งทำงานได้แตกต่างกัน โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิลทรานสเฟอเรส เช่น เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase, EC 2.4.1.19) และเอนไซม์แอมิโลมอลเทส (AMase, EC 2.4.1.25) ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 4 รูปแบบ ได้แก่ Disproportionation, Cyclization, Coupling และ Hydrolysis ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (A) *Disproportionation*: เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะไกลโคซิดิกบริเวณ α -1,4-D-glucan ในโมเลกุลตัวให้แล้วถ่ายโอนไปยังตัวรับ (B) *Cyclization*: เร่งปฏิกิริยาโยกย้ายหมู่ น้ำตาล D-glucan ภายในโมเลกุลของ α -1,4-glucan ชนิดเดียวกัน ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ (Cyclodextrin, CD) (C) *Coupling*: เร่งปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยา Cyclization โดยไซโคลเดกซ์ทรินจะถูกแยกออกและถ่ายโอนไปยังโมเลกุลของตัวรับ เกิดเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรง (D) *Hydrolysis*: เร่งปฏิกิริยาสลายพันธะ α -1,4-D-glucan ของสารตั้งต้นด้วยน้ำ [9] แม้ว่าเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสและเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจะกระตุ้นปฏิกิริยาที่คล้ายกัน แต่เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีโครงสร้าง หน้าที่และปฏิกิริยาหลักที่แตกต่างกัน โดยเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสสามารถเร่งปฏิกิริยาทั้ง 4 รูปแบบ

ได้เท่า ๆ กัน ในขณะที่เอนไซม์แอมิโลมอลเตสเร่งปฏิกิริยา Disproportionation และ Cyclization เป็นปฏิกิริยาหลัก

เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจัดเป็นพวกเอนไซม์นอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ในกลุ่ม 4- α -glucanotransferase จาก Family GH77 พบมากใน *Bacillus* sp. เอนไซม์นี้มีการใช้งานอย่างแพร่หลาย เนื่องจากความสามารถในการสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินและผลิตภัณฑ์ทรานส์ไกลโคไซด์ [10] ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่มีการประยุกต์ใช้ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสในการสังเคราะห์ไกลโคไซด์ที่น่าสนใจ เช่น การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเจนิสตินกลูโคไซด์โดยใช้เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Paenibacillus macerans* ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำและความเสถียรดีขึ้น [11] การสังเคราะห์แมนจิเฟรินกลูโคไซด์เพื่อเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของแมนจิเฟรินโดยใช้เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Thermoanaerobacter* sp. [12] เป็นต้น ในขณะที่เอนไซม์แอมิโลมอลเตส เป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ ในกลุ่ม 4- α -glucanotransferase จาก Family GH13 มีความสามารถในการตัดแปรงและการใช้งานทางชีวภาพที่หลากหลายทำให้เป็นที่น่าสนใจในอุตสาหกรรม เช่น การสังเคราะห์สารทดแทนน้ำตาล การผลิตเจลแข็งที่ทนความร้อน (Thermoreversible gel) การสังเคราะห์ไซโคลอะไมโลสและการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ทรานส์ไกลโคไซด์ [10] มีรายงานการวิจัยที่มีการใช้ปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคไซด์ของเอนไซม์แอมิโลมอลเตสในการสังเคราะห์ไกลโคไซด์ที่น่าสนใจ เช่น การสังเคราะห์อัลฟา-อาร์บูตินกลูโคไซด์ ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดีขึ้นและยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสของมนุษย์แบบแข่งขันได้ดีกว่าสารตั้งต้น [13] การสังเคราะห์มอลโทอลิโกซิลซูโครสโดยเอนไซม์แอมิโลมอลเตสจาก *Corynebacterium glutamicum* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นน้ำตาลต้านฟันผุและ

สามารถนำมาใช้ทดแทนซูโครสในอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องได้ [14]

สำหรับงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยสนใจที่จะค้นหาเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตรูตินไกลโคไซด์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ไกลโคไซด์มีความสามารถในการละลายน้ำ ความเสถียรของสาร และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่ารูตินชนิดดั้งเดิม นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ค่อนข้างต่ำ [15] ดังนั้น ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยจึงได้ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะสมบัติรวมถึงความจำเพาะของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสและเอนไซม์แอมิโลมอลเตสต่อการเร่งปฏิกิริยา ทรานส์ไกลโคไซด์ในการสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สารเคมี วัสดุและสายพันธุ์แบคทีเรีย

กลูโคส (G_1) มอลโทส (G_2) มอลโทไตรโอส (G_3) มอลโทเตตระโอส (G_4) อัลบูมินในซีรัมวัว (Bovine serum albumin, BSA) แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต แอมพิซิลิน รูติน และเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทรินจากบริษัท Sigma (U.S.A.) ไฮโปเปปโตนจากบริษัท Nihon pharmaceutical Co., Ltd. (Japan) โซเดียมคลอไรด์จากบริษัท J.T. Baker (Malaysia) แป้งมันสำปะหลังจากบริษัท Flo-max™ (Netherlands) β -mercaptoethanol จากบริษัท Fluga (Switzerland) กรดไฮโดรคลอริก จากบริษัท Carlo erba reagents (France) เมทานอล ไอโซโพรพิล โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต โบรโมไทมอลบลูและแผ่นโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC silica gel 60 F₂₅₄ glass plates) จากบริษัท Merck (Germany) IPTG จากบริษัท Vivantis (Malaysia) เอทิลอะซิเตทจากบริษัท VWR (France) กรดซัลฟูริกจากบริษัท Carlo erba reagents (France) คอลัมน์โครมาโทกราฟี HisTrap FF™ จากบริษัท GE Healthcare (UK)

อิมิดาโซลจากบริษัท USB Corporation (U.S.A.) Bradford reagent TEMED โกลซีนจากบริษัท Bio-Rad (U.S.A.) ทริส(ไฮดรอกซีเมทิล)อะมิโนมีเทน โซเดียมโอดีเตซิลซัลเฟต จากบริษัท Vivantis (U.S.A.) กลีเซอรอล จากบริษัท VWR Chemicals BDH® (UK) และสารเคมีอื่น ๆ เกรดงานวิเคราะห์ (Analytical grade)

รีคอมบิแนนท์ p19bBC เป็นพลาสมิด pET-19b ที่ประกอบด้วยยีนของเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus circulans* A11 [16] และรีคอมบิแนนท์ p19bAMY เป็นพลาสมิด pET-19b ประกอบด้วยยีนของเอนไซม์ AMase จาก *Thermus* sp. [17] และใช้ *E. coli* สายพันธุ์ BL21 (DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้าน

2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรีย

2.2.1 การเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์เพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase

นำเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ p19bBC ไปเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani pH 7.0 ที่ประกอบด้วยเปปโตเน 1 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์และแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อความขุ่นมีค่าประมาณ 0.4–0.6 จึงเติม IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน และเลี้ยงต่อไปที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ CGTase ชนิดหยาบที่อยู่ในสารละลายใสส่วนบนจะถูกรวบรวม เพื่อให้ทำปฏิกิริยาต่อไป

2.2.2 การเลี้ยงเซลล์รีคอมบิแนนท์เพื่อผลิตเอนไซม์ AMase

นำเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์ p19bAMY ไปเลี้ยงในอาหารและสภาวะเดียวกันกับเอนไซม์ CGTase แต่จะเติม IPTG ที่ความเข้มข้น 0.8

มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงต่อไปที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,750 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทสารละลายใสด้านบนทิ้ง ส่วนตะกอนเซลล์ที่ได้จะถูกแขวนลอยในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 แล้วทำให้เซลล์แตกโดยเครื่องอัลตราโซนิคโฮโมจีไนเซอร์ (รุ่น VCX130, SONIC, U.S.A.) เอนไซม์ AMase ชนิดหยาบที่ได้ออกมาจะถูกรวบรวม เพื่อให้ทำปฏิกิริยาต่อไป

2.3 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

2.3.1 การทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์

นำเอนไซม์ที่ได้ในข้อที่ 2.2.1 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการดูดซับด้วยแป้ง [18] โรยแป้งข้าวโพดอบแห้งลงในสารละลายเอนไซม์หยาบ โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% (w/v) แล้วกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เก็บรวบรวมตะกอนแป้งเค้ก จากนั้นล้างด้วยบัฟเฟอร์ TB1 pH 8.5 ที่ประกอบด้วยทริส ไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วกวนแป้งเค้กผสมกับน้ำตาลมอลโทส ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ในบัฟเฟอร์ TB1 ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อยู่ในส่วนสารละลายด้านบน นำไปหาค่าการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธี Dextrinizing [19] และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford [20]

2.3.2 การทำเอนไซม์ AMase ให้บริสุทธิ์

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อที่ 2.2.2 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Histrap FF™ [21] เตรียมคอลัมน์โดยการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ ก. (20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กับอิมิดาโซลความเข้มข้น 20

มิลลิโมลาร์) ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ประมาณ 5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ จากนั้นโหลด เอนไซม์หยาบเข้าสู่คอลัมน์ แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ ก. จนกระทั่งค่า A_{280} เป็นศูนย์ ต่อจากนั้นจึงชะเอนไซม์ AMase ที่เกาะอยู่กับคอลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ ข. (20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 ที่ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ กับอิมิดาโซล ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์) เก็บเอนไซม์ AMase บริสุทธิ์ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ นำไปหาค่าการทำงานของ เอนไซม์ด้วยวิธี Starch transglycosylation [22] และ หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Bradford [20]

2.4 การวัดการทำงานของเอนไซม์

2.4.1 การวัดการทำงานของเอนไซม์ CGTase ด้วยวิธี Dextrinizing

วัดการทำงานของเอนไซม์ CGTase ตามวิธี Dextrinizing [19] ปฏิบัติการประกอบด้วยเอนไซม์ CGTase 5 ไมโครลิตร และสารละลายน้ำแป้ง 0.2% (w/v) 150 ไมโครลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติม สารละลายไอโอดีน ที่ประกอบด้วยไอโอดีนความเข้มข้น 0.02% (w/v) ในโพแทสเซียมไอโอไดด์ความเข้มข้น 0.2% (w/v) 0.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้าย เป็น 5 มิลลิลิตรโดยใช้น้ำกลั่น นำไปวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ 600 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ส่งผลให้ความเข้มของสีน้ำเงินของ สารประกอบเชิงซ้อนของแป้ง-ไอโอดีนลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.4.2 การวัดการทำงานของเอนไซม์ AMase ด้วยวิธี Starch transglycosylation

วัดการทำงานของเอนไซม์ AMase ตามวิธี Starch transglycosylation [22] ปฏิบัติการประกอบด้วย เอนไซม์ AMase 100 ไมโครลิตร สารละลายน้ำแป้ง 0.2% (w/v) 250 ไมโครลิตร โมลโทส 1% (w/v) 50

ไมโครลิตร และ 20 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ PH 7.4 600 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับ สารละลายไอโอดีน ที่ประกอบด้วยไอโอดีนความเข้มข้น 0.02% (w/v) ในโพแทสเซียมไอโอไดด์ความเข้มข้น 0.2% (w/v) 1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือปริมาณ เอนไซม์ที่ส่งผลให้ความเข้มของสีน้ำเงินของสารประกอบ เชิงซ้อนของแป้ง-ไอโอดีนลดลง 1 % ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.5 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณของโปรตีนตามวิธีของ Bradford โดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน [20] นำตัวอย่างสารละลาย โปรตีน 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายสำหรับ หาความเข้มข้นของโปรตีน (Protein assay reagent) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที แล้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโน เมตร ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาเทียบหาปริมาณโปรตีนจาก กราฟมาตรฐาน

2.6 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (Native PAGE) และตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของ เอนไซม์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยเทียบกับขนาดของโปรตีนมาตรฐาน [23]

2.7 ความจำเพาะของเอนไซม์ในการสังเคราะห์รูติน ไกลโคไซด์

การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ที่เหมาะสม ต่อปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันในการสังเคราะห์รูติน ไกลโคไซด์ โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase ประกอบ ด้วยเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทริน (β -CD) 1% (w/v) เป็นสาร ตั้งต้นตัวให้ และรูติน 2% (w/v) เป็นสารตั้งต้นตัวรับ

เร่งปฏิกิริยาด้วย 25 µg CGTase (4 U Dextrinizing assay/µg protein) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์ AMase ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 1% (w/v) เป็นสารตั้งต้นตัวให้ และรูติน 2% (w/v) เป็นสารตั้งต้นตัวรับ เร่งปฏิกิริยาด้วย 25 µg AMase (0.4 U Starch transglycosylation assay/µg protein) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์รูตินไกลโคไซด์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค TLC

2.8 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์รูตินไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค Thin-layer chromatography (TLC)

ในการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์รูตินไกลโคไซด์ใช้แผ่นโครมาโทกราฟีแบบเยื่อบาง (TLC silica gel 60 F₂₅₄ glass plates) ขนาด 20x20 เซนติเมตร โดยเฟสเคลื่อนที่เป็นสารละลายเอทิลอะซิเตต/กรดอะซิติก/น้ำ อัตราส่วน (3:1:1, v/v) เมื่อผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่ครบเวลาที่กำหนด นำแผ่น TLC ไปจุ่มในละลายกรดซัลฟิวริกต่อเมทานอล อัตราส่วน (1:9, v/v) 2 รอบ และให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นได้ (จุดสีน้ำตาล/ดำ) ด้วยเครื่องวัดความเข้มของสีแบบสแกน (Scanning densitometer) [18]

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้ จะทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ผลการทดลองที่ได้แสดงเป็นค่า mean ± S.D. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรม *T-test* (GraphPad software) กำหนดให้ $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

3. ผลการศึกษาและวิจารณ์

3.1 การผลิตและการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

3.1.1 การผลิตและการทำเอนไซม์ CGTase ให้บริสุทธิ์

ผลการผลิตและการทำให้เอนไซม์ CGTase บริสุทธิ์พบว่า เอนไซม์ CGTase ชนิดหยาบมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 921 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากนั้นทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีการดูดซับด้วยแป้ง พบว่าเอนไซม์ CGTase มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5 เท่าและให้ผลผลิต 73% มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 4,530 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Table 1) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเอนไซม์ CGTase จาก *Microbacterium terrae* KNR 9 สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 50 เท่า โดยให้ผลผลิต 33% ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตก่อนการดูดซับด้วยแป้ง [24] และเอนไซม์ CGTase จาก *Paenibacillus* sp. RB01 สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 34 เท่า โดยให้ผลผลิต 31% ด้วยวิธีการดูดซับด้วยแป้ง [25] นอกจากนี้ การกรองแบบ ultrafiltration ก่อนทำการดูดซับด้วยแป้ง สามารถทำให้เอนไซม์ CGTase จาก *B. pseudocaliphilus* 8SB บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.2 เท่า โดยให้ผลผลิต 62.4% [26] เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยต่าง ๆ จะเห็นว่า วิธีการดูดซับด้วยแป้งเป็นขั้นตอนที่มีประสิทธิภาพในการทำให้เอนไซม์ CGTase มีความบริสุทธิ์ และหากใช้เอนไซม์ที่ผลิตออกมาจากเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pET-19b (T7 โปรโมเตอร์) จะทำให้ได้ปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตออกมาภายนอกเซลล์สูงและมีความบริสุทธิ์ค่อนข้างมาก ทำให้ใช้ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์น้อยกว่าเอนไซม์ที่ได้จากเซลล์ดั้งเดิมโดยตรง จึงทำให้ปริมาณผลผลิตของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มากกว่าด้วย [15]

Table 1 Purification of CGTase from the p19bBC transformant cells

Procedures	Total activity ^b (U)	Total protein ^c (mg)	Specific activity (U/mgprotein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude CGTase ^a	129,850±25.1	141±1.0	921±6.5	1±0.0	100±0.0
5% Starch adsorption	95,129±19.0	21±0.6	4,530±118.0	5±0.2 ^D	73±0.1

^aCrude extract was prepared from 1.5 liters of cell culture.

^bAssayed by dextrinizing activity

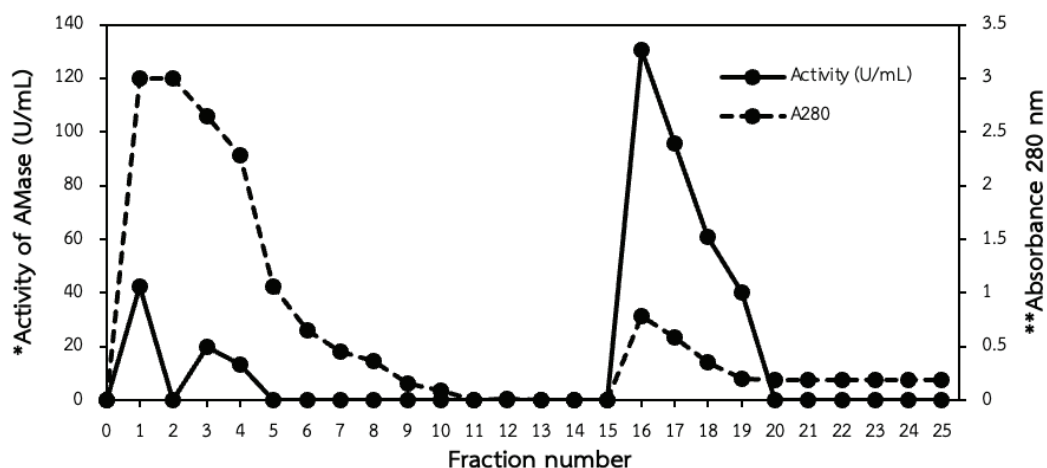
^cAssayed by Bradford's method

^D $P < 0.05$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

3.1.2 การผลิตและการทำเอนไซม์ AMase ให้บริสุทธิ์

ผลการผลิตและการทำเอนไซม์ AMase ให้บริสุทธิ์ พบว่า เอนไซม์ถูกชะออกจากคอลัมน์ HisTrap FF™ ด้วยบัฟเฟอร์ ข. ออกมาใน Fraction ที่ 15-20 (Figure 1) ตำแหน่งลูกศรสีดำแสดงถึง Fraction ที่เอนไซม์ถูกชะออกมา โดยพบว่าเอนไซม์ AMase ชนิดหยาบมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 7 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน หลังจากผ่านคอลัมน์ HisTrap FF™ แล้ว พบว่าเอนไซม์ AMase มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 56 เท่า และให้ผลผลิต 51% โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 391 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Table 2) จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า เอนไซม์ AMase จาก *Pyrobaculum calidifontis* สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ 24 เท่า ให้ผลผลิต 11% ด้วยวิธีการให้ความร้อน (Heat treatment) และผ่านคอลัมน์ Hitrap™ Q FF และ Resource Q ตามลำดับ [27] และเอนไซม์ AMase จาก *Streptococcus agalactiae* ได้รับการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.3 เท่า ให้ผลผลิต 60% โดย

ผ่านคอลัมน์ HisTrap FF™ เพียงขั้นตอนเดียว [28] เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์กับ AMase จากแหล่งอื่นๆ จะเห็นว่า เอนไซม์ AMase ที่ผลิตได้จากเซลล์ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด p19bAMY (มีลำดับ His-Tag อยู่บริเวณปลาย N-terminal ของยีน AMase) บรรจุอยู่ให้ปริมาณผลผลิตและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความสะดวกในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ในขั้นตอนเดียวด้วย Histrap FF™ affinity column แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก AMase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ เมื่อออกมานอกเซลล์แล้วจะมีความเสถียรต่ำ การทำให้บริสุทธิ์ด้วยความร้อนของ AMase จากแหล่งผลิตอื่นๆ อาจทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์บริสุทธิ์ลดลงค่อนข้างมาก ดังนั้น ขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์กลุ่ม Intracellular enzyme ควรเป็นการจับกับแบบเฉพาะเจาะจงกับคอลัมน์เพียงขั้นตอนเดียวจะช่วยให้ได้ผลผลิตคงเหลือที่มากกว่า [17]



*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 2 Purification of AMase from p19bAMY transformant cells

Fraction	Total activity ^b (U)	Total protein ^c (mg)	Specific activity (U/mgprotein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude AMase ^a	3,866±20.0	528±2.0	7±0.2	1±0.0	100±0.0
Histrap FFTM column	1,955±30.0	5±0.5	391±45.1	56±5.0 ^d	51±0.6

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

^bAssayed by starch transglycosylation activity

^cAssayed by Bradford's method

^dP < 0.05 แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างก่อนและหลังการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

โดยหลักการแล้วการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ต้องอาศัยหลายกระบวนการร่วมกัน ตั้งแต่การผลิต/สกัด การตกตะกอน การแยกด้วยโครมาโทกราฟี เป็นต้น การลดขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์หรือการเลือกใช้วิธีการที่มีความจำเพาะสูง ยกตัวอย่างเช่น โครมาโทกราฟีแบบแยกตามความจำเพาะ (Affinity chromatography) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสาร โดยอาศัยความจำเพาะทางชีวภาพระหว่างโมเลกุลของสารที่ต้องการแยกกับตัว

เชื่อมโยงที่เรียกว่าลิแกนด์ เช่น การจับกันระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจน เอนไซม์กับซับสเตรท หรือเอนไซม์กับโคแฟกเตอร์ เป็นต้น จะสามารถช่วยแยกสารชีวโมเลกุลที่ต้องการได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม สำหรับการศึกษานี้ การเลือกวิธีการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Affinity chromatography ของเอนไซม์ CGTase และ AMase มีความแตกต่างกันตามลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยเอนไซม์ *Bacillus*

circulans CGTase เป็น Extracellular enzyme ซึ่งมีโดเมนสำหรับจับแป้ง (Starch-binding domain: SBD) จึงสามารถใช้แป้งเป็นตัวดูดซับในการทำให้บริสุทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไป SBD มักพบในเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) เช่น เอนไซม์ Amylase และ Glucoamylase ซึ่ง SBD จะช่วยให้เอนไซม์จับกับโมเลกุลแป้งได้ดีขึ้น ในขณะที่ *Thermus* sp. AMase เป็น Intracellular enzyme และไม่มี SBD จึงไม่สามารถใช้แป้งเป็นตัวดูดซับได้ โดยเอนไซม์ AMase แม้จะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 4 รูปแบบ เช่นเดียวกับ CGTase แต่ปฏิกิริยาหลักของ AMase เป็นปฏิกิริยา Disproportionation ทำหน้าที่โอนย้ายกลูแคนสายสั้นจากโมเลกุลหนึ่งไปยังอีกโมเลกุลหนึ่งในขณะที่การเร่งปฏิกิริยา Hydrolysis ใน AMase นั้นอยู่ในระดับต่ำมาก ดังนั้น การเลือกวิธีการทำให้บริสุทธิ์จึงต้องพิจารณาถึงลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ เช่น โครงสร้างโดเมน และรูปแบบเฉพาะในการเร่งปฏิกิริยา (Enzyme catalysis) เป็นต้น [10] และในทางกลับกัน CGTase ไม่สามารถติด His-tag ได้ใน pET19b เนื่องจากข้อจำกัดในการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะในการโคลนยีน ทำให้บริเวณ His-tag site ถูกตัดออกไป จึงไม่สามารถใช้ HisTrap FF™ affinity column ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ ด้วยสาเหตุเหล่านี้คณะผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการที่ดีที่สุดที่เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละตัวในการทำให้บริสุทธิ์

3.2 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.2.1 การวิเคราะห์เอนไซม์ CGTase ด้วยเทคนิค Native PAGE และ SDS-PAGE

นำสารละลายเอนไซม์ชนิดหยาบ และเอนไซม์บริสุทธิ์หลังการดูดซับด้วยแป้ง มาติดตามแถบโปรตีนบนแผ่นเจล (Figure 2A และ 2B) ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Native PAGE พบว่าเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วจะปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว แสดงให้เห็นว่าการดูดซับด้วยแป้งเพียงขั้นตอนเดียวสามารถทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ (Figure 2A)

นอกจากนี้ เมื่อย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายแป้งและไอโอดีน เพื่อตรวจวัดกิจกรรม Dextrinizing activity แสดงให้เห็นแถบใส (Clear band) บนพื้นหลังสีน้ำตาลเข้มในตำแหน่งเดียวกันกับตำแหน่งใน SDS-PAGE (Figure 2B) แสดงให้เห็นว่าเป็นเอนไซม์ CGTase ที่มีความบริสุทธิ์เพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

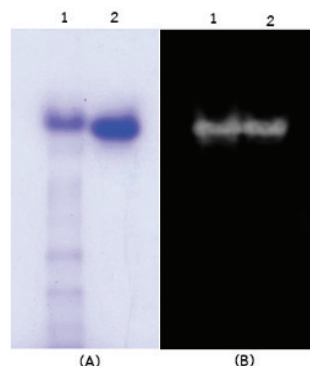


Figure 2 10% non-denaturing PAGE analysis of recombinant CGTase in each purification step

(A.) Coomassie brilliant blue staining Lane 1: Crude enzyme (40 µg) Lane 2: 5% Starch adsorption (40 µg)

(B.) Dextrinizing activity staining Lane 1: Crude enzyme (0.2 U) Lane 2: 5% Starch adsorption (0.2 U)

จาก SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ CGTase ที่ผลิตได้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 72 กิโลดาลตัน (Figure 3) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกันกับเอนไซม์จาก *Paenibacillus* sp. RB01 (66 กิโลดาลตัน) [25], *B. pseudocaliphilus* 8SB (71 กิโลดาลตัน) [26], *P. illinoisensis* ZY-08 (74 กิโลดาลตัน) [29], *Bacillus* sp. T1 (75 กิโลดาลตัน) [30], *B. stearothermophilus* NO2 (66 กิโลดาลตัน) [31] และ *Alkalihalobacillus lehensis* M136 (78.64 กิโลดาลตัน) [32] อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่ามวลโมเลกุลของเอนไซม์ CGTase นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งผลิตของเอนไซม์ [9]

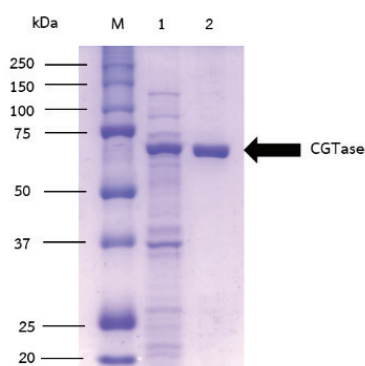


Figure 3 10% SDS-PAGE analysis of recombinant CGTase in each purification step
Lane M: Protein marker (prestained protein standard BIO-RAD) (10 µl)
Lane 1: Crude enzyme (40 µg) Lane 2: 5% Starch adsorption (30 µg). The arrow indicates a molecular weight of CGTase (72 kDa).

3.2.2 การวิเคราะห์เอนไซม์ AMase ด้วยเทคนิค Native PAGE และ SDS-PAGE

หลังนำสารละลายเอนไซม์ชนิดหยาบ และเอนไซม์บริสุทธิ์หลังการแยกด้วยคอลัมน์ HisTrap FFTM มาติดตามแถบโปรตีนบนแผ่นเจล (Figure 4A และ 4B) ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Native PAGE พบว่า เอนไซม์ชนิดหยาบแสดงโปรตีนหลายแถบ ในขณะที่หลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วปรากฏแถบโปรตีนน้อยลง (Figure 4A) และพบแถบโปรตีนของเอนไซม์ AMase ชัดขึ้น เมื่อย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายแป้งและไอโอดีน เพื่อตรวจวัดกิจกรรม Starch transglycosylation แสดงให้เห็นแถบสีตำแหน่งเดียวกันระหว่างเอนไซม์ชนิดหยาบและแถบเอนไซม์บริสุทธิ์ (Figure 4B) เป็นการยืนยันได้ว่า เอนไซม์ AMase ที่ได้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชันและมีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

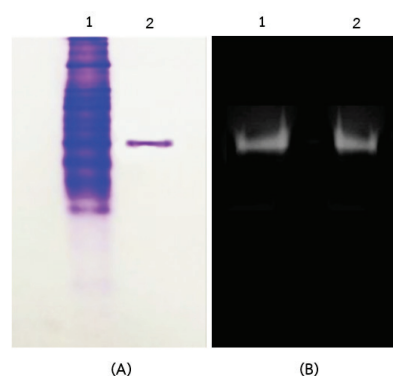


Figure 4 10% non-denaturing PAGE analysis of recombinant AMase in each purification step
(A.) Coomassie brilliant blue staining Lane 1: Crude enzyme (40 µg) Lane 2: Histrap FFTM column chromatography (30 µg)
(B.) Starch transglycosylation activity staining Lane 1: Crude enzyme (2 U) Lane 2: Histrap FFTM column chromatography (2 U)

จาก SDS-PAGE (Figure 5) เลนที่ 1 เป็น crude AMase จัดเป็น Intracellular enzyme ประกอบด้วยโปรตีนภายในเซลล์หลายชนิดในปริมาณมาก ซึ่งโปรตีนส่วนใหญ่มีความเสถียรค่อนข้างต่ำเมื่อถูกคัดแยกออกมาภายนอกเซลล์ [10] อย่างไรก็ตามเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว (เลนที่ 2) พบว่าได้แถบโปรตีน AMase เป็นแถบหลัก และพบโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย (Degraded bands) บางส่วนจากการรัน SDS-PAGE ทั้งนี้อาจเกิดจากโปรตีนเสื่อมสลายระหว่างการทำให้บริสุทธิ์หรือจากขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ซึ่งเมื่อพิจารณาที่ Native PAGE เอนไซม์ AMase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Histrap FFTM column (Figure 4A เลนที่ 2) ไม่พบ Degraded bands ปรากฏอาจเป็นเพราะการรัน Native PAGE โปรตีนยังคงโครงสร้างธรรมชาติ (Native conformation) และเทคนิค Native PAGE ไม่มีการใช้ SDS หรือสารรีดิวซ์ เช่น β -mercaptoethanol หรือ DTT ไปช่วยตัดพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bonds) ที่เชื่อมโครงสร้างโปรตีนไว้

ทำให้โครงสร้างที่ซับซ้อนไม่ถูกทำลายจึงไม่ปรากฏแถบโปรตีนขนาดเล็กหลาย ๆ แถบ สำหรับเอนไซม์ *Thermus* sp. AMase ในการศึกษาหลังจากผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่ามียวโมเลกุลเท่ากับ 60 กิโลดาลตันบน SDS-PAGE ซึ่งสัมพันธ์กับขนาดของยีน AMase จากรายงานก่อนหน้านี้ [17] และมีขนาดใกล้เคียงกันกับเอนไซม์กลูคาโนทรานส์เฟอเรสหรือ AMase จาก *S. agalactiae* (57 กิโลดาลตัน) [28], *Pyrobaculum calidifontis* (60 กิโลดาลตัน) [33] และ D-enzyme ของ *Manihot esculenta* Crantz และ *Arabidopsis* sp. (59 กิโลดาลตัน) [34] ตามลำดับ แต่มีขนาดแตกต่างจากเอนไซม์กลูคาโนทรานส์เฟอเรสจาก *Bifidobacterium longum* (82 กิโลดาลตัน) [35], *C. glutamicum* (84 กิโลดาลตัน) [21] และ *E. coli* IFO 3806 (93 กิโลดาลตัน) [36] ซึ่งขนาดมวโมเลกุลของเอนไซม์ AMase ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นแหล่งผลิตของเอนไซม์ [10]

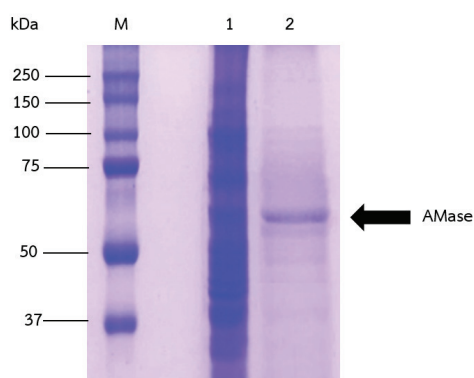


Figure 5 10% SDS-PAGE analysis of recombinant AMase in each purification step

Lane M: Protein marker (prestained protein standard BIO-RAD) (10 μ l) Lane 1: Crude enzyme (40 μ g)

Lane 2: Histrap FF™ column (30 μ g). The arrow indicates a molecular weight of AMase (60 kDa).

3.3 ความจำเพาะของปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์ CGTase และเอนไซม์ AMase ต่อการสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์

เพื่อเปรียบเทียบปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์จากเซลล์รีคอมบิแนนท์ในการสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ ระหว่างปฏิกิริยาของเอนไซม์ CGTase โดยมีเบต้า-ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นสารตั้งต้นตัวให้ และปฏิกิริยาของเอนไซม์ AMase ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นตัวให้ โดยกำหนดปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเท่ากัน (25 μ g CGTase และ AMase) ในการเร่งปฏิกิริยาหลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้น เมื่อวิเคราะห์ผลด้วย TLC (Figure 6 และ 7) พบว่า CGTase สามารถใช้รูตินเป็นสารตั้งต้นตัวรับได้ (Figure 6 เลนที่ 6) โดยพบอนุพันธ์รูตินที่สังเคราะห์ขึ้นได้น้อย 4 ชนิด คือ รูติน-โมโนไกลโคไซด์ (RG1) รูติน-ไดไกลโคไซด์ (RG2) รูติน-ไตรไกลโคไซด์ (RG3) และรูติน-เตตระไกลโคไซด์ (RG4) ตามลำดับ โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Choi et al. [15] และ González-Alfonso et al. [6] ที่สามารถสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ที่

มีโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสมาจับจำนวน 1-5 โมเลกุล โดยอาศัยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์ CGTase ในขณะที่ปฏิกิริยาของเอนไซม์ AMase ไม่สามารถสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ได้ พบเพียงออลิโกแซ็กคาไรด์ (By product) (Figure 7 เลนที่ 5) ทั้งนี้ น่าจะเกิดจากปฏิกิริยาหลักของเอนไซม์ AMase ได้แก่ ปฏิกิริยา Cyclization และ Disproportionation มีความจำเพาะของเอนไซม์ในการเข้าจับกับสารตั้งต้นตัวให้และรับที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น รูติน ทำให้ไม่สามารถใช้เอนไซม์นี้ในการสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ได้ [10] ดังนั้นเอนไซม์ CGTase จึงมีความเหมาะสมสำหรับการใช้สังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์มากกว่า

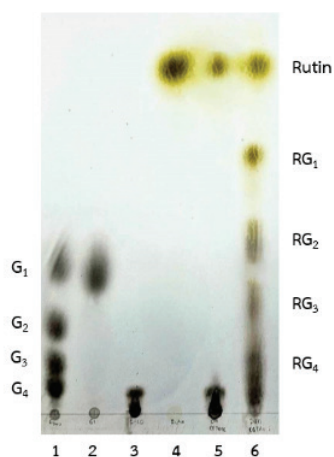


Figure 6 TLC analysis of the rutin glycoside products of CGTase

Reaction mixture incubated with 1% (w/v) β -CD, 2% (w/v) rutin hydrate, and 25 μ g of CGTase (4 U/ μ g protein) in 20 mM phosphate buffer pH 7.0. TLC condition was used as ethyl acetate/acetic acid/water with a 3:1:1 (v/v) ratio. Lane 1: Standard G_1 - G_4 mixture; Lane 2: standard G_1 ; Lane 3: Standard 1% (w/v) β -CD; Lane 4: Standard 2% (w/v) rutin hydrate; Lanes 5, 6: Reaction mixture with 1% β -CD and 2% (w/v) rutin hydrate with CGTase at 0 and 24 hours, respectively.

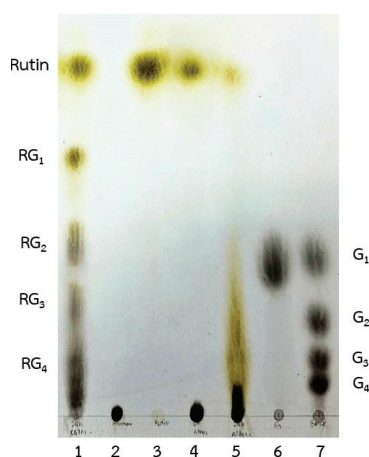


Figure 7 TLC analysis of the rutin glycoside products of AMase

Reaction mixture incubated with 1% (w/v) tapioca starch, 2% (w/v) rutin hydrate, and 25 μ g of AMase (0.4 U/ μ g protein) in 20 mM phosphate buffer pH 7.0. TLC condition was used as ethyl acetate/acetic acid/water with a 3:1:1 (v/v) ratio. Lane 1: RG1-4 products from CGTase-catalyzed reaction; Lane 2: Standard 1% (w/v) tapioca starch; Lane 3: Standard 2% (w/v) rutin hydrate; Lanes 4, 5: Reaction mixture with 1% (w/v) tapioca starch and 2% (w/v) rutin hydrate with AMase at 0 and 24 hours; Lane 6: standard G_1 ; Lane 7: Standard G_1 - G_4 mixture, respectively.

4. สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้สามารถผลิตเอนไซม์ CGTase จากเซลล์รีคอมบิแนนท์ p19bBC ที่มียีน CGTase ของ *B. circulans* A11 ภายใต้การเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ และได้ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีดูดซับด้วยแป้ง โดยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5 เท่า มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 4,530 หน่วยต่อมิลลิกรัม ให้ผลผลิต 73% และมีมวลโมเลกุล 72 กิโลดาลตัน ในขณะที่เอนไซม์ AMase จากเซลล์รีคอมบิแนนท์ p19bAMY ที่มียีน AMase ของ *Thermus* sp. สามารถเหนี่ยวนำด้วย IPTG ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 มิลลิโมลาร์ การทำเอนไซม์ AMase ให้บริสุทธิ์ทำได้ด้วยการใช้คอลัมน์ HisTrap FF™ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 56 เท่า มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อยู่ที่ 391 หน่วยต่อมิลลิกรัม ให้ผลผลิตที่ 51% และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชันของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อการสังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ด้วยเทคนิค TLC พบว่า เอนไซม์ CGTase มีความเหมาะสมมากกว่าเอนไซม์ AMase ในการใช้สังเคราะห์รูตินไกลโคไซด์ขนาดต่าง ๆ ซึ่ง AMase สังเคราะห์ได้เพียงโอลิโกแซ็กคาไรด์เท่านั้น อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ผลผลิตของรูตินไกลโคไซด์ในปริมาณสูงที่สุดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารต้านแบคทีเรีย (Anti-bacterial reagent) การศึกษาตัวแปรและปัจจัยต่าง ๆ ในการผลิตจึงเป็นเรื่องที่ควรสืบค้นต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัยสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา จากกองทุนวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีการศึกษา 2567

6. References

- [1] Kreft, I., Fabjan, N. and Yasumoto, K., 2006, Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products, Food Chem. 98: 508-512.
- [2] Ganeshpurkar, A. and Saluja, A. K., 2017, The pharmacological potential of rutin, Saudi. Pharm. J. 25(2): 149-164.
- [3] Memar, M. Y., Yekani, M., Sharifi, S. and Dizaj, S. M., 2022, Antibacterial and biofilm inhibitory effects of rutin nanocrystals, Biointerface Res. Appl. Chem. 13(2): 132.
- [4] Babazadeh, A., Ghanbarzadeh, B. and Hamishehkar, H., 2016, Novel nanostructured lipid carriers as a promising food grade delivery system for rutin, J. Funct. Foods. 26: 167-175.
- [5] Şamlı, M., Oğuz, B. and Figen, K., 2014, Characterization of silk fibroin based films loaded with rutin- β -cyclodextrin inclusion complexes, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 80: 37-49.
- [6] José, L., González, A., Ana, P., Miguel, A., Yoshihiko, H., María, F., Antonio, O. B., Jesús, JB. and Francisco, J. P., 2021, Polyglucosylation of rutin catalyzed by cyclodextrin glucanotransferase from *Geobacillus* sp.: Optimization and chemical characterization of products, Ind. Eng. Chem. Res. 60(51): 18651-18659.

- [7] Plaza, M., Pozzo, T., Liu, J., Kazi, Z. G., Turner, C. and Karlsson, E. N., 2014, Substituent effects on *in vitro* antioxidizing properties, stability, and solubility in flavonoids, *J. Agric. Food. Chem.* 62(15): 3321-3333.
- [8] Chauhan, V., Kaushal, D., Dhiman, V. K., Kanwar, S. S., Singh, D., Dhiman, V. K. and Pandey, H., 2022, An insight in developing carrier-free immobilized enzymes, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2(10): 794411.
- [9] Lim, C. H., Rasti, B., Sulisty, J. and Hamid, M. A., 2021, Comprehensive study on transglycosylation of CGTase from various sources, *Heliyon.* 7(2): e06305.
- [10] Nakapong, S., Tumhom, S., Kaulpi boon, J. and Pongsawasdi, P., 2022, Heterologous expression of 4 α -glucanotransferase: overproduction and properties for industrial applications, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 38(2): 36.
- [11] Han, R., Ge, B., Jiang, M., Xu, G., Dong, J. and Ni, Y., 2017, High production of genistein diglucoside derivative using cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus macerans*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44(9): 1343-1354.
- [12] Lee, J. Y., Kim, H., Moon, Y., Kwak, S., Kang, C. G., Park, C., Jo, J., Kim, S. W., Pal, K., Kang, D. H. and Kim, D., 2022, Enhancement of the water solubility and antioxidant capacities of mangiferin by transglucosylation using a cyclodextrin glycosyltransferase, *Enzyme Microb. Technol.* 159: 110065.
- [13] Rudeekulthamrong, P. and Kaulpi boon, J., 2020, Optimization of amylomaltase for the synthesis of α -arbutin derivatives as tyrosinase inhibitors, *Carbohydr. Res.* 494: 108078.
- [14] Saehu, S., Srisimarat, W., Prousoontorn, M. H. and Pongsawasdi, P., 2013, Transglucosylation reaction of amylomaltase for the synthesis of anticariogenic oligosaccharides, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 88: 77- 83.
- [15] Choi, S. S., Park, H. R. and Lee, K. A., 2021, A comparative study of rutin and rutin glycoside: Antioxidant activity, anti-inflammatory effect, effect on platelet aggregation and blood coagulation, *Antioxidants.* 10(11): 1696.
- [16] Kaulpi boon, J., Prasong, W., Rimphanitchayakit, V., Murakami, S., Aoki, K. and Pongsawasdi, P., 2020, Expression and characterization of a fusion protein-containing cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. A11, *J. Basic. Microbiol.* 50(5): 427-435.
- [17] Watanasatitarp, S., Rudeekulthamrong, P., Krusong, K., Srisimarat, W., Zimmermann, W., Pongsawasdi, P. and Kaulpi boon, J., 2014, Molecular mutagenesis at Tyr-101 of the amylomaltase transcribed from a gene isolated from soil DNA, *Appl. Biochem. Microbiol.* 50(3): 243-252.

- [18] Charoensapyanan, R., Ito, K., Rudeekulthamrong, P. and Kaulpiboon, J., 2016, Enzymatic synthesis of propyl- α -glycosides and their application as emulsifying and antibacterial agents, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 21: 389-401.
- [19] Fuwa, H., 1954, A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate, *J. Biochem.* 41(5): 583-603.
- [20] 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(1): 248-254.
- [21] Srisimararat, W., Powviriyakul, A., Kaulpiboon, J., Krusong, K., Zimmermann, W. and Pongsawasdi, P., 2011, A novel amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the large-ring cyclodextrin products, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 70(3): 369-375.
- [22] Park, J. H., Kim, H. J., Kim, Y. H., Cha, H. K., Young, W., Kim, T. J., Do, H. and Park, K. H., 2007, The action mode of *Thermus aquaticus* YT-I 4- α -glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin, *Carbohydr. Polym.* 67: 164-173.
- [23] Weber, K. and Osborn, M., 1975, Proteins and sodium dodecyl sulfate: Molecular weight determination on polyacrylamide gels and related procedures, *The Proteins.* 1: 179-223.
- [24] Rajput, K. N., Patel, K. C. and Trivedi, U. B., 2016, A novel cyclodextrin glucanotransferase from an alkaliphile *Microbacterium terrae* KNR 9: Purification and properties, *3 Biotech.* 6(2): 168.
- [25] Lorthongpanich, N., Mahalapbutr, P., Rungrotmongkol, T., Charoenwongpaiboon, T. and Prousoontorn, M. H., 2022, Fisetin glycosides synthesized by cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. RB01: characterization, molecular docking, and antioxidant activity, *Peer J.* 10: e13467.
- [26] Kitayska, T., Petrova, P., Ivanova, V. and Tonkova, A. I., 2011, Purification and properties of a new thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudocaliphilus* 8SB, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165(5-6): 1285-1295.
- [27] Mehboob, S., Ahmad, N., Munir, S., Ali, R., Younas, H. and Rashid, N., 2020, Gene cloning, expression enhancement in *Escherichia coli* and biochemical characterization of a highly thermostable amylomaltase from *Pyrobaculum calidifontis*, *Int. J. Biol. Macromol.* 165: 645-653.
- [28] Tumhom, S., Nimpiboon, P., Wangkanont, K. and Pongsawasdi, P., 2021, *Streptococcus agalactiae* amylomaltase offers insight into the transglycosylation mechanism and the molecular basis of thermostability among amylomaltases, *Sci. Rep.* 11(1): 6740.

- [29] Lee, Y. S., Zhou, Y., Park, D. J., Chang, J. and Choi, Y. L., 2013, β -cyclodextrin production by the cyclodextrin glucanotransferase from *Paenibacillus illinoisensis* ZY-08: cloning, purification, and properties, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29(5): 865–873.
- [30] Liu, Z., Wu, G. and Wu, H., 2022, Molecular cloning, and optimized production and characterization of recombinant cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. T1, *3 Biotech.* 12(3): 58.
- [31] Tao, X., Su, L., Wang, L., Chen, X. and Wu, J., 2020, Improved production of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus stearothermophilus* NO₂ in *Escherichia coli* via directed evolution, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104(1): 173–185.
- [32] Bosito, E. F., Montecillo, A., Franco, R., Ann, S., Noel, B., Aryana, L., Mendoza, B. and Lantican, N., 2023, *Alkalihalobacillus lehensis* M136, a novel alkaliphilic, cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)-producing isolate from Manleluag Hyperalkaline Spring in Pangasinan, Philippines, *Philipp. J. Sci.* 152(1): 109–124.
- [33] Mehboob, S., Ahmad, N., Rashid, N., Imanaka, T. and Akhtar, M., 2016, Pcal_0768, a hyperactive 4- α -glucanotransferase from *Pyrobacculum calidifontis*, *Extremophiles.* 20(4): 559–566.
- [34] Tantanarat, K., O'Neill, E. C., Rejzek, M., Field, R. A. and Limpaseni, T., 2014, Expression and characterization of 4- α -glucanotransferase genes from *Manihot esculenta* Crantz and *Arabidopsis thaliana* and their use for the production of cycloamyloses, *Process Biochem.* 49(1): 84–89.
- [35] Jeong, D. W., Jeong, H. M., Shin, Y. J., Woo, S. H. and Shim, J. H., 2019, Properties of recombinant 4- α -glucanotransferase from *Bifidobacterium longum* subsp. longum JCM 1217 and its application, *Food Sci. Biotechnol.* 29(5): 667–674.
- [36] Kitahata, S., Murakami, H. and Okada, S., 1989, Purification and some properties of amylomaltase from *Escherichia coli* IFO 3806, *Agric. Biol. Chem.* 53(10): 2653–2659.