รายงานวิจัยเรื่อง

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลคอซิเดสจากพืชในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรท

Synthesis of Oligosaccharides Using Glycosidase Enzymes Indigeneous to Thailand

ศ. ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์

ผศ. ฤดี สุราฤทธิ์

ผศ. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย

ดร. จันทรกานต์ พิกพมงคล

Professor Christopher Bucke

b14591017
0 1242723

รายงานวิจัยเรื่อง

การพัฒนาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลคอซิเดสจากพืชในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรท

Synthesis of Oligosaccharides Using Glycosidase Enzymes Indigeneous to Thailand

คณะผู้วิจัย

ศ. ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์

ผศ. ฤดี สุราฤทธิ์

ผศ. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย

ดร. จันทรกานต์ พิภพมงคล

Professor Christopher Bucke

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17083038

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประเภทโครงการความร่วมมือไทย-อังกฤษ ประจำปี 2533-2538

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบบฟอร์มบทคัดย่อ
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การพัฒนาและการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลคอซิเดสจากพืชในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ในการสังเคราะห์สารคาร์โบไฮเดรท (โอลิโกแซคคาไรด์)

(ภาษาอังกฤษ) Synthesis of Oligosaccharides Using Glycosidase Enzymes Indigenous to Thailand

ชื่อผู้วิจัย

ก. ฝ่ายไทย

หัวหน้าโครงการ ศ.ดร.มรว.ชิษณุสรร นามสกุล สวัสดิวัตน์ คุณวุฒิ Ph.D.

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ถ.พระราม ๖ กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐
หมายเลขโทรศัพท์ ๒๔๖๑๓๕๙-๖๗ ต่อ ๔๓๐๕, ๔๓๐๖

ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร. ฤดี นามสกุล สุราฤทธิ์ คุณวุฒิ Ph.D.
ภาควิชาสรีรวิทยาและชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล ถ.โยธี กรุงเทพฯ ๑๐๔๐๐
หมายเลขโทรศัพท์ ๒๔๖๑๒๒๕-๓๑ ต่อ ๑๓๑๑, ๑๓๑๒

ผศ. ดร. เอมอร นามสกุล เบญจวงศ์กุลชัย คุณวุฒิ Ph.D.
ภาควิชาชีวเคมี คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถ.อังรี-ดูนังต์ กรุงเทพฯ ๑๐๓๓๐
หมายเลขโทรศัพท์ ๒๕๒๕๑๕๑ ต่อ ๙๐

นาง จันทรกานต์ นามสกุล พิภพมงคล คุณวุฒิ Ph.D.
สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถนนวิภาวดีรังสิต บางเขน กรุงเทพฯ 10210
หมายเลขโทรศัพท์ ๕๗๔๐๖๒๒ ต่อ ๑๓๐๖

ข. ฝ่ายต่างประเทศ

Professor Christopher นามสกุล Bucke คุณวุฒิ Ph.D.
Division of Biotechnology, Faculty of Engineering and Science, University of Westminster, 115 New Cavendish Street, London W1M 8JS, United Kingdom
หมายเลขโทรศัพท์ ๐๐๑-๔๔-๗๑-๙๑๑-๕๐๐๐

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท โครงการความร่วมมือระหว่างประเทศ (โครงการไทย-อังกฤษ)
ประจำปี 2533-2537 จำนวนเงิน 1,910,420 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 5 ปี ตั้งแต่ กันยายน 2533 ถึง กันยายน 2538

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์จำพวกไกลคอซิเดสที่พบในพืชในประเทศไทย เริ่มจากการค้นหาเอนไซม์จำพวกไกลคอซิเดสที่เหมาะสมโดยการคัดเลือกเอนไซม์จำพวกไกลคอซิเดส 9 ชนิด จากเมล็ดพืชมากกว่า 50 สายพันธ์ จากพืชทั้งหมด 17 ตระกูล พบว่ามีเอนไซม์ที่พบปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญได้แก่ เอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส (α-D-mannosidase) เอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส(β-D-glucosidase) เอนไซม์อัลฟา-ดี-กลูโคซิเดส(α-D-glucosidase) เอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส(β-D-fucosidase) เอนไซม์ เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส(β-D-galactosidase) เอนไซม์เบต้า-ดี-เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามินิเดส (β-D-N-acetyl glucosaminidase)(>0.1 ไมโครโมล/นาที/กรัมเมล็ด) และเมล็ดพืช 38 สายพันธ์ พบว่า มีเอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิด ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า เอนไซม์เหล่านี้สามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ด้วยปฏิกิริยาย้อนกลับในสารละลาย ของน้ำตาลที่เหมาะสมที่ความเข้มข้น 50% โดยน้ำหนักที่พีเอช 5 โดยบ่มที่อุณหภูมิสูง โดยพบการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส ได้ผลผลิต 30-60%, เอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสได้ผลผลิต 15-30% และเมื่อใช้เอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสได้ผลผลิต 10-15%

ไกลคอซิเดสจากเมล็ดพะยูงมีทั้งเบต้า-ดี-กลูโคซิเดสและเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสแอคติวิตี้ สามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตตามด้วยการทำ ไอโซอิเลคทริคโฟกัสซิ่งและคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีโดยใช้เซฟาเดกซ์จี-150เอนไซม์ที่เตรียมได้มีน้ำหนักโมเลกุล 330,000 ในสภาพธรรมชาติ ประกอบด้วยหน่วยย่อย 4-6 หน่วยแต่ละหน่วยย่อยมีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 5.0 และ เดลต้า-กลูโคโนแลคโตน ปรอทคลอไรด์ และ พาราคลอโรเมอคิวไรเบนโซเอทสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ ค่า K_m และ k_{cat} สำหรับ เบต้า-ดี-กลูโคไซด์เป็น 5.4 มิลลิโมลาร์และ 307 วินาที$^{-1}$ตามลำดับและสำหรับเบต้า-ดี-ฟิวโคไซด์เป็น 0.54 มิลลิโมลาร์และ 151 วินาที$^{-1}$ ดังนั้นจึงมีอัตราส่วน k_{cat}/K_m ค่อนข้างสูงมากสำหรับเบต้า-ดี-ฟิวโคไซด์ เอนไซม์สามารถย่อย พี-เอนพี-เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์ พี-เอนพี-เบต้า-ดี-ไซโลไซด์ พี-เอนพี-อัลฟา-แอล-อะราบิโนไซด์ โซโฟโรส ลามินาริไบโอส และเจนติโอไบโอสได้อย่างช้าๆ ย่อยเซลโลไบโอสได้ช้ามาก เอนไซม์ไม่สามารถย่อยไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ลามินาริน และพรูนาซิน แต่ย่อยอะมิกดาลินและสาลิซินได้บ้าง การเปลี่ยนแปลงเอนไซม์โดยใช้คอนดูไรทอล บี อีปอกไซด์ และการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของสับสเตรทผสม แสดงอย่างชัดเจนว่าเอนไซม์นี้มีบริเวณเร่งเพียงแห่งเดียวที่เร่งการสลายสับสเตรททั้งสองได้

เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสเตรียมได้จากเมล็ดบ่อแก้ว โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลซ เซฟาเดกซ์ จี 100 แลคโตซิลเซฟาโรสและดีอีเออี-เซลลูโลสซ้ำอีกครั้งหนึ่ง พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้ 868 เท่า ได้ผลลัพท์ 13 เปอร์เซนต์ ปรากฏเป็นแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวบนเอส ดี เอส เจลอิเลคโตรโฟริซิส มีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 และเมื่อหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธีเจลฟิวเตรชันพบมีน้ำหนักโมเลกุล 55,000 มีค่า K_m ต่อ พี-เอนพี-เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์เป็น 0.80 มิลลิโมลาร์ ค่า K_m ต่อ โอ-เอนพี-เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์เป็น 12.8 มิลลิโมลาร์และต่อ เบต้า แลคโตสเป็น 84.7 มิลลิโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบค่า V_{max} เป็น 100 เปอร์เซนต์สำหรับพี-เอนพี-เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์ จะมีค่าเป็น 26.7 เปอรเซนต์สำหรับ โอ-เอนพี-เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์ และ 9.4 เปอร์เซนต์สำหรับเบต้า แลคโตส การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยสารหลายชนิด รวมทั้ง ดี-กาแลคตัล กาแลคโตโน-1,4-แลคโตน เมทธิล-อัลฟา-ดี-กาแลคโตไซด์ เมทธิล-เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์ เมอคิวริกคลอไรด์ และพาราไฮดรอกซีเมอคิวไรเบนโซเอท

เอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ขึ้นได้จากเมล็ดถ่อน เมล็ดปอแก้ว เมล็ดกระเจี๊ยบ และเมล็ดถั่วนางแดง โดยใช้การแยกด้วยคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีหลายชนิด แต่ยังไม่สามารถเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์ได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่เตรียมได้มีเอนไซม์ไกลคอซิเดสอื่นปนอยู่น้อยกว่า 5 เปอร์เซนต์ และสมควรใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ เอนไซม์ลินามาเรส จากมันสำปะหลัง สามารถเตรียมได้ปรากฏเป็นแถบโปรตีนแถบเดียวบนเอส ดี เอส อิเลคโตรโฟริสิส แต่เมื่อตรวจสอบด้วยการทำอิเลคโตรโฟริสิสแบบไม่เสียสภาพพบว่ามีการรวมตัวกันของเอนไซม์เกิดขึ้น

เมื่อนำเอนไซม์ที่เตรียมได้มาศึกษาคุณสมบัติในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับและตรวจวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วยเครื่องแยกสารความดันสูง พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมจากเมล็ดพะยูงสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้เมื่อบ่มในสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงที่พีเอช 5.0 และใช้อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส และสังเคราะห์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงขึ้น ในสภาวะที่เหมาะสมจะมีการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ขึ้น 30-35 เปอร์เซนต์ของน้ำตาลทั้งหมด โดยมีอัตราส่วนของไตรแซคคาไรด์ต่อไดแซคคาไรด์เป็น 0.2 เมื่อวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยคอลัมน์ไดโอเน็กซ์คาร์โบแพค พีเอ-1 พบว่า มีเจนติโอไบโอสเป็นส่วนใหญ่ การสังเคราะห์โดยใช้น้ำตาลฟิวโคสเกิดขึ้นน้อยมาก แต่เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสผสมกับน้ำตาลฟิวโคส พบว่ามี โอลิโกแซคคาไรด์ชนิดใหม่ที่น่าสนใจเกิดขึ้น และอาจเป็นโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดปนกันอยู่ ซึ่งจะต้องแยกและศึกษาต่อไป

เมื่อใช้เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสเตรียมได้จากเมล็ดปอแก้วสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ในสารละลายน้ำตาลกาแลคโตสพบว่าได้ผลผลิตค่อนข้างต่ำประมาณ 15เปอร์เซนต์ มีพีเอชที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เป็น 3-4 อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 40-80 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นที่เหมาะสมเป็น20-30 เปอร์เซนต์ จากการวิเคราะห์โอลิโกแมนโนไซด์พบว่าสามารถแยกสารไดแซคคาไรด์ที่มีพันธะอัลฟา 1,6 ออกจาก อัลฟา 1,2และ1,3 ได้โดยใช้คอลัมน์อะมิเน็กซ์ในเครื่องแยกสารความดันสูง เอนไซม์จากเมล็ดถ่อน มีพีเอชที่เหมาะสมในการสังเคราะห์เป็น 4.0-5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 50 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของแมนโนสที่เหมาะสมเป็น 50-60 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก เมื่อใช้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวจะได้ผลผลิตเป็นไดแมนโนไซด์พันธะอัลฟา-1,6 16 เปอร์เซนต์ พันธะอัลฟา-1,2 และ อัลฟา 1,3 9 เปอร์เซนต์ มีไตรแมนโนไซด์และโอลิโกแซคคาไรด์สายยาวเกิดขึ้น 9.5 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการแยกแมนโนไบโอสที่มีพันธะต่างกันทั้งสามชนิดออกจากกันได้ด้วย จากการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแมนโนไซด์ด้วยเอนไซม์จากเมล็ดถั่วนางแดงพบว่า ในระยะแรกเอนไซม์จะสังเคราะห์แมนโนไบโอสที่มีพันธะ อัลฟา-1,2 ก่อน แต่เมื่อทิ้งระยะเวลานานขึ้นจะมีพันธะ อัลฟา-1,6 เพิ่มขึ้น แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อพันธะ อัลฟา 1,2 สภาพแวดล้อมต่างๆไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความจำเพาะของเอนไซม์ สภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์คือที่ พี เอช 4.0 อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และ ความเข้มข้นของน้ำตาลแมนโนส 70 เปอ์เซนต์ การศึกษาเอนไซม์แมนโนซิเดสจากเมล็ดปอแก้วและกระเจี๊ยบยังไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามพบว่าเอนไซม์ทั้งสองสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี เอนไซม์จากปอแก้วสังเคราะห์ได้ดีที่สุดที่ พีเอช 4.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์เป็น 40-60 องศาเซลเซียส และต้องใช้แมนโนสความเข้มข้นสูงกว่า 30 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ลินามาเรสจากมันสำปะหลังสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้น้อยมาก(< 5%)

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า มีการพบเอนไซม์ไกลคอซิเดสชนิดใหม่จากเมล็ดพืชพื้นเมืองของไทย เอนไซม์บางชนิดได้มีการเตรียมให้บริสุทธิ์และมีการศึกษาคุณสมบัติต่างๆโดยละเอียดแล้ว ได้แก่เอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสและเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสจากเมล็ดพะยูงและเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้ว เอนไซม์อื่นที่น่าสนใจโดยเฉพาะเอนไซม์พวกอัลฟา

แมนโนซิเดสสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้บางส่วนโดยมีเอนไซม์ไกลคอซิเดสชนิดอื่นเจือปนอยู่น้อยกว่า 5 เปอร์เซนต์ ความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และสภาวะแวดล้อมของปฏิกิริยา ผลผลิตที่ได้พบตั้งแต่ 5 เปอร์เซนต์ถึง 35-40 เปอร์เซนต์ โดยทั่วๆไปผลผลิตที่ได้จะเป็นโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดปนกัน แม้ว่าการแยกโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดออกจากกันจะทำได้ยาก แต่การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จำเป็นต้องแยกโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิดออกจากกันเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารด้วยวิธีทางเคมี เช่น n.m.r. และ g.c./m.s. อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้เราได้พัฒนาวิธีการแยกสารผสมดังกล่าวขึ้นใหม่เพื่อใช้ร่วมกับวิธีการที่มีผู้ใช้อยู่เดิม และยังค้นพบสารโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดใหม่ ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญของการศึกษาในเรื่องของการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์จากเมล็ดพืชไทยต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abstract

The objective of this project was to study the synthesis of oligosaccharides using glycosidase enzymes indigenous to Thailand. Initially, a search was made for indigenous glycosidase enzymes by screening the seeds of more than 50 species of Thai plants from 17 families for nine glycosidase enzymes. The enzymes α-D-mannosidase, β-D-glucosidase, β-D-fucosidase, α-D-galactosidase, β-D-galactosidase, and β-D-N-acetyl-glucosaminidase were found in significant amounts (>0.1 μole/min/ g seed), and 38 species contained one or more of these enzymes. Preliminary tests for reversal of hydrolytic action were made by prolonged incubation with 50% (w/w) monosaccharide at pH 5, at elevated temperature. Oligosaccharide synthesis was observed with α-D-mannosidase (30-60% yield), β-D-glucosidase (15-30% yield), and for β-D-galactosidase (10-15% yield).

A glycosidase enzyme with both β-glucosidase and β-fucosidase activities was purified from the seeds of *Dalbergia cochinchinensis* Pierre (Thai Rosewood) by ammonium sulfate fractionation, preparative isoelectric focusing and Sephadex G-150 chromatography. The enzyme had molecular weights of 330,000 in the native state and 66,000 in the denatured state. Hydrolysis of pNP-β-D-glucoside pNP-β-D-glucoside and pNP-β-D-fucoside showed pH optimum at pH 5.0 and was inhibited by δ-gluconolactone, $HgCl_2$, and p-chloromercuribenzoate. The K_m and k_{cat} values of the purified enzyme were: 5.4 mM and 307 sec^{-1} for p-NP-β-D-glucoside and 0.54 mM and 151 sec^{-1} for p-NP-β-D-fucoside, so that the latter had by far the highest k_{cat}/K_m ratio. p-NP-β-D-galactoside, p-NP-β-D-xyloside and p-NP-α-L-arabinoside were hydrolyzed more slowly. Hydrolysis of the sophorose, laminaribiose and gentiobiose were also rather slow, and hydrolysis of cellobiose was even slower. No hydrolysis of the cyanogenic glucosides linamarin or prunasin, but some hydrolysis of amygdalin and salicin was found. Chemical modification with conduritol B epoxide and mixed kinetic experiments clearly showed the existence of a single common active site for hydrolysis of the two substrates.

β-Galactosidase was purified from the seeds of Thai jute (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*) by ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose column chromatography, Sephadex G-100 column chromatography, Lactosyl-Sepharose chromatography, and a second DEAE-cellulose chromatography step. The final product was purified 868-fold with a yield of 13%, and gave a single major band of molecular weight 66,000 on SDS-PAGE, similar to the native molecular weight of 55,000 determined by gel filtration. The K_m values for various substrates were as follows: 0.80 mM for p-NP-β-D-galactoside, 12.8 mM for o-NP-β-D-galactoside and 84.7 mM for β-lactose, and the relative V_{max} values were 100% for p-NP-β-D-galactoside, 26.7% for o-NP-β-D-galactoside and 9.4% for β-lactose. Hydrolysis of p-NP-β-D-galactoside was strongly inhibited by various substances including D-

galactal, galactono-1,4-lactone, methyl-α-D-galactoside, methyl-β-D-galactoside, $HgCl_2$ and p-hydroxymercuribenzoate.

α-Mannosidases were partially purified from *Albizzia procera* Benth, *Hibiscus sabdariffa* var. sabdariffa, *Hibiscus sabdariffa* var. altissima, and *Vigna umbellata* using various column chromatographic techniques. The final products obtained in each case were still not pure, but they contained less than 5% contamination by other glycosidase enzymes and were considered suitable for use in oligosaccharide synthesis. Linamarase was purified from cassava until homogeneous on SDS-polyacrylamide gel, but showed evidence of aggregation when analysed on non-denaturing gel.

The above preparations of enzymes were used for oligosaccharide synthesis by reversal of their hydrolytic action at high temperature and high monosaccharide concentration, and the products obtained were analysed by h.p.l.c. With purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, high glucose concentration greatly improved enzyme stability. The synthesis reaction with D-glucose showed optimum pH of 5.0, optimum temperature of 60°-65°C, and was enhanced at high glucose concentration and high enzyme concentration. Under suitable conditions, total synthesis reached 30-35% of total sugar, with the ratio of trisaccharide to disaccharide being about 0.2 Analysis of products on a Dionex Carbopac PA-1 column indicated that gentiobiose (glucose β1-6 glucose) was by far the major product. Synthesis with D-fucose was poor, but with mixtures of D-glucose and D-fucose, new products were observed, probably due to hetero-oligosaccharides, which are being purified for further characterisation.

Synthesis by β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima incubated with D-galactose showed rather low maximal yields of 15%. Optimum pH was 3-4, but temperatures from 40°-80°C showed little difference, and 20-30 % galactose appeared to be optimal. With α-mannoside products, man(α1-6)man could be readily resolved from man(α1-2)man and man(α1-3)man on Aminex h.p.l.c. With α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth, optimal pH was 4.0 - 4.5, optimal temperature was 50°C, and optimal mannose concentration was 50 - 60% w/w, so that under suitable conditions, yields were 16% for man(α1-6)man, 9% for man(α1-2) man and man(α1-3)man, and 9.5% for mannotrioses or higher oligosaccharides. Detailed time course studies were performed on the time course of synthesis with *Vigna umbellata* α-mannosidase, using a newly developed analytical method for separation of above three mannobioses. The results showed that the enzyme synthesised more man(α1-2)man at early times and more man(α1-6)man at later times, suggesting that the enzyme showed regiospecificity for man(α1-2)man. Variation of conditions did not affect regiospecificity, and optimal synthesis was observed at pH 4.0, 50°-60°C, and 70% w/v mannose. Studies with α-mannosidases from *Hibiscus sabdariffa* var. altissima and var. sabdariffa are still not complete, but

the former showed maximal synthesis at temperature 40°-60°C, pH 4.0, and mannose concentration greater than 30% w/w. Cassava linamarase showed rather low levels of synthesis of less than 5%.

In conclusion, several new glycosidase enzymes have been discovered by screening Thai plant seeds. Some have been purified and studied in detail in terms of their kinetic properties and inhibition, notably the β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre and β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* var. altissima. Other enzymes, particularly α-mannosidases, were only purified until they contained less than 5% contamination by other glycosidases. Synthesis studies carried out with all these enzymes showed that maximal synthesis depended on enzyme and varied from 5% up to 35%-40%. In general, several products were obtained, and novel hetero-oligosaccharides were also detected. Separation of synthesis products poses a serious problem, but is required so that complete characterisation of products can be achieved by physico-chemical techniques, such as n.m.r. and g.c./m.s. However, novel separation techniques are being developed, and are being used in conjunction with more established approaches for isolation of particularly interesting products. Thus, provides an important basis for future work to be done by our group on oligosaccharide synthesis using enzymes from Thai sources.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

คำนำ

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

บทที่			หน้า
1	บทนำ		1
2	การคัดเลือกเอนไซม์		21
	2.1	บทนำ	21
	2.2	วัสดุและวิธีการ	25
		2.2.1 แหล่งที่มาของเมล็ด	25
		2.2.2 การสกัดเอนไซม์	26
		2.2.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยของเอนไซม์	26
		2.2.4 การตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์	27
	2.3	ผลการทดลอง	28
		2.3.1 การตรวจปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดพืช	28
		2.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์	36
	2.4	บทวิจารณ์	40
3	การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จากเมล็ดพะยูง		44
	3.1	บทนำ	44
	3.2	วัสดุและวิธีการ	47
		3.2.1 เมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre)	47
		3.2.2 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	47
		3.2.3 การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยวิธีมาตรฐาน	49
		3.2.4 การหาปริมาณโปรตีน	50
		3.2.5 การศึกษาทางจลนศาสตร์	50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยไกลโคไซด์อื่นที่พบในธรรมชาติ 50
3.2.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ 51
3.2.8 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 52
3.2.9 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ 52
3.2.10 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ 52
3.2.11 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ 52
3.2.12 การวิเคราะห์ความจำเพาะของการสลายพันธะไกลโคซิดิก 53
3.2.13 การตรวจสอบไอโซเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ 53
3.2.14 การศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ 53
3.3. ผลการทดลอง 54
3.3.1 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 54
3.3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้และการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 57
3.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ 62
3.3.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ 62
3.3.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ 62
3.3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ 66
3.3.7 การตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยไกลโคไซด์อื่นที่พบในธรรมชาติ 66
3.3.8 การศึกษาผลของสารต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ 69
3.3.9 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ 69
3.3.10 การวิเคราะห์ความจำเพาะของการสลายพันธะไกลโคซิดิก 71
3.3.11 การตรวจสอบไอโซเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ 72
3.3.12 การศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ 72
3.4. บทวิจารณ์ 80

4 การเตรียมเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส 85
4.1 บทนำ 85
4.2 วัสดุและวิธีการ 91

4.2.1 เมล็ดพืช 91
4.2.2 วิธีการหาเอนไซม์แอคติวิตี้ 91
4.2.3 การหาเวลาที่มีปริมาณเอนไซม์สูงสุดในเมล็ด 91
4.2.4 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดถั่วนางแดง (*Vigna umbellata*) 92
4.2.5 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth.) 92
4.2.6 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var altissima) 93
4.2.7 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* var sabdariffa) 93
4.2.8 การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์จำพวก อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส 94
4.3 ผลการทดลอง 94
4.3.1 การสกัดและเตรียมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วนางแดง (*Vigna umbellata*) 94
4.3.2 การสกัดและเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์จากปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var altissima) 94
4.3.3 การสกัดและเตรียมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์จากถ่อน (*Albizzia procera* Benth) 94
4.3.4 การสกัดและการเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* var sabdariffa) 96
4.3.5 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส 101
4.3.6 ผลของสารประกอบประเภทสังกะสี ต่อการทำงานของเอนไซม์ 101
4.4 บทวิจารณ์ 102

5 เอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้ว 103
5.1 บทนำ 103
5.2 วัสดุและวิธีการ 107
5.2.1 เมล็ดพืช 107
5.2.2 การวัดเอนไซม์แอคติวิตี้วิธีมาตรฐาน 107
5.2.3 การสกัดและเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 107

5.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 107
5.2.5 การตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดที่กำลังงอก 110
5.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ 110
5.2.7 Heterogeneity ของเอนไซม์ 111
5.3 ผลการทดลอง 112
5.3.1 ผลของการงอกของเมล็ดต่อปริมาณเอนไซม์ 112
5.3.2 ผลของการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 112
5.3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ 116
5.3.4 คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ 120
5.3.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสับสเตรท 120
5.3.4.2 pH ที่เหมาะสมในการย่อยสับสเตรท 120
5.3.4.3 ผลของโลหะ อนุพันธ์ของน้ำตาล และสารอื่นๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ 120
5.3.4.4 ความจำเพาะต่อสับสเตรท 124
5.3.4.5 การหาค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรทต่างๆ 124
5.3.5 การศึกษา Heterogeneity ของเอนไซม์ 124
5.4 บทวิจารณ์ 126

6 เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง 131
6.1 บทนำ 131
6.2 วัสดุและวิธีการ 132
6.2.1 วัสดุ 132
6.2.2 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 132
6.2.3 การตรวจแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลินามาเรส 133
6.2.3.1 การตรวจวัดแอคติวิตี้โดยใช้สับสเตรทธรรมชาติ 133
6.2.3.2 การตรวจแอคติวิตี้โดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ 134
6.2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรส 134
6.2.4.1 ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่เสียสภาพธรรมชาติ 134
6.2.4.2 การศึกษาเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติโดยใช้ Non-denaturing gel electrophoresis 134
6.2.4.3 การตรวจสอบเอนไซม์ไกลโคซิเดสจากมันสำปะหลัง 135
6.3 ผลการทดลอง 135

6.3.1 การเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์ 135
6.3.2 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ด้วยเทคนิคทางอิเลคโตรโฟริสิส 138
6.3.3 การตรวจสอบไกลโคซิเดสอื่นจากมันสำปะหลัง 138
6.4 บทวิจารณ์ 142

7 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ 144
7.1 บทนำ 144
7.2 วัสดุและวิธีการ 149
7.2.1 การเตรียมเอนไซม์ 149
7.2.2 การวัดเอนไซม์แอคติวิตี้ 149
7.2.3 การศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ 149
7.2.4 การตรวจสอบผลิตผลของปฏิกิริยาด้วย h.p.l.c 149
7.2.5 การตรวจสอบผลิตผลด้วย t.l.c 150
7.3 ผลการทดลอง 151
7.3.1 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดส/เบต้า-ฟิวโคซิเดสจากเมล็ดพะยูง 151
7.3.2 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้ว 164
7.3.3 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ อัลฟ่า-แมนโนซิเดส 174
7.4 บทวิจารณ์ 186

8 สรุปและข้อเสนอแนะ 190

เอกสารอ้างอิง 201

ผลงานที่ตีพิมพ์จากโครงการวิจัย 205

สถาบันวิทยบริการ
จุฬา

เลขหมู่ ๑๗๕
ท ๑๕
เลขทะเบียน 009066
วัน,เดือน,ปี ๑ ก.ค ๔๐

สารบัญตาราง

1.1	แสดงตัวอย่างของวัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรทที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรม	2
1.2	แสดงตัวอย่างเอนไซม์ที่ถูกนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม	5
1.3	แสดงตัวอย่างโอลิโกแซคคาไรด์ และความสำคัญ	9
1.4	ตัวอย่างของเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ในการสังเคราะห์ โอลิโกแซคคาไรด์	16
2.1	แสดงการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ acceptor sugars ต่าง ๆ กัน	23
3.1	Relative maximal hydrolytic activities (V_{max}) with different substrates for linamarase from several sources	45
3.2	Purification of β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	58
3.3	Kinetic properties of β-glucosidase/ β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	65
3.4	Hydrolysis of synthetic substrates by β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	67
3.5	Hydrolysis of natural substrates by β-glucosidase/ β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	68
3.6	Effect of various substances on β-glucosidase/ β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	70
4.1	Yields of oligosaccharides synthesised by co-condenation with mannose under equilibrium conditions(% yield by HPLC)	87
4.2	Equilibrium data for the α-mannosidase reversion at 55°C	88
4.3	Purification of α-Mannosidase from *Albizzia procera* Benth.	95
4.4	Extent of contamination of *Albizzia procera* α-mannosidase by other glycosidases	95
4.5	Partial purification of α-Mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var. sabdariffa	97
4.6	Extent of contamination of α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var. sabdariffa by other glycosidases	97
5.1	Sources and properties of β-galactosidase enzymes	104
5.2	Effect of imbibing and germination on the content of β-galactosidase and α-mannosidase from the seeds of	113

Hibiscus sabdariffa L. var. *altissima*

5.3 Purification of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* seeds 114

5.4 Effect of various substances on the activity of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* 123

5.5 Kinetic properties of *Hibiscus sabdariffa* var. *altissima* β-galactosidase 125

6.1 Activity of linamarase, β-glucosidase, β-fucosidase and β-galactosidase and the ratio of β-Fuc/β-Glu and β-Gal/βGlu from the High and Low molecular weight pools from Sepharose 4B chromatography 137

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

1.1	แสดงการสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ด้วยขบวนการทางเคมี	6
1.2	การสังเคราะห์เอนไซม์โดยใช้ปฏิกิริยา Transglycosylation หรือ Transglycosidation	12
1.3	รูปแสดงการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไกลโคซิเดส ร่วมกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส	15
2.1	H.p.l.c analysis of the synthesis products with crude α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth	37
2.2	H.p.l.c analysis of the synthesis products with crude β-glucosidase and β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	38
2.3	H.p.l.c analysis of the synthesis products with partially purified β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*	39
3.1	Examples of young tree and seeds of Thai Rosewood, Payung (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre)	48
3.2	Isoelectric focusing of the dialyzed 35-75 % ammonium sulfate precipitate from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	55
3.3	Sephadex G-150 chromatography of the isoelectric focusing pool from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	56
3.4	Electrophoresis of purified β-glucosidase / β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	59
3.5	Non-denaturing electrophoresis of purified β-glucosidase /β-fucosidase followed by activity staining	61
3.6	pH profile of β-glucosidase and β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre.	63
3.7	Temperature profile of β-glucosidase and β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre for hydrolysis of pNP-β-D-glucoside	64
3.8	G.l.c. analysis of the products of hydrolysis of pNP-β-D-glucoside, showing that the β-anomer of glucoside is the initial product	73
3.9	Inactivation of β-D-glucosidase/β-D-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre by CBE	75

3.10	Relationship between concentration of CBE and k_{obs}, with PNPG and PNPF as substrate	76
3.11	Inhibition of β-D- glucosidase activity by PNPF	78
3.12	Plots of $1/v$ versus $1/s$ for mixtures of PNPG and PNPF substrates	79
3.13	Dependence of V_{max} and K_m on f for the mixed substrate reactions	81
4.1	DEAE-cellulose chromatography of the dialysed ammonium sulphate fraction of *Albizzia procera* Benth.	98
4.2	Sephadex G-150 chromatography of *Albizzia procera* Benth α-mannosidase pool from DEAE-cellulose	99
4.3	Phenyl-Sepharose chromatography of *Albizzia procera* Benth α-mannosidase pool from Sephadex G-150	100
5.1	Pathway for degradation of MGDG, and DGDG to galactose, glycerol, and free fatty acids	106
5.2	Purification of β-D-galactosidase from crude extract	109
5.3	DEAE-cellulose chromatography of the dialyzed 35-70% ammonium sulfate fraction from Thai Jute seeds.	115
5.4	Sephadex G-100 chromatography of the unbound DEAE-cellulose fraction	117
5.5	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* β-galactosidase on a 10 % slab gel	118
5.6	Molecular weight detemination of native β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* on Sephadex G-200 chromatography	119
5.7	Determination of optimum temperature of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima.*	121
5.8	Determination of optimum pH of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima.*	122
5.9	Chromatofocusing profile of partially purified β-galactosidase in the pH range 5.0 to pH 9.0	127
6.1	Sepharose 4B chromatography of 35-65% ammonium sulphate fraction from cassava petiole	136
6.2	Electrophoresis of purified cassava linamarase under denaturing conditions in various gel systems, followed by protein staining. *A:* SDS-polyacrylamide ; *B:* Acid-urea ; *C:* Triton-acid-urea	139
6.3	Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on 5% gels	140

7.1	Equilibrium synthesis of oligosaccharides by glycosidases	146
7.2	H.p.l.c. profile of oligosaccharide synthesis with purified β-glucosidase/β fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre.	152
7.3	Time course of oligosaccharide synthesis (% product) and enzyme activity remaining (% activity) with purified β-glucosidase/ β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	153
7.4	Stability of purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre in the absence of substrate.	155
7.5	Effect of pH on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	156
7.6	Effect of temperature on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	157
7.7	Effect of glucose concentration on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	158
7.8	Effect of varying enzyme concentration on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	159
7.9	H.p.l.c. profile of the synthesis reaction with 50% D-fucose by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	161
7.10	H.p.l.c. profile of the synthesis reaction with a mixture of D-fucose and D-glucose by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	162
7.11	Thin-layer chromatography of the synthesis products with a mixture of D-fucose and D-glucose by purified β-glucosidase/ β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre	163
7.12	Dionex carbopac PA-1 h.p.l.c. profile of synthesis products obtained by incubating purified *Dalbergia cochinchinensis* Pierre β-glucosidase/β-fucosidase with 50% w/w glucose.	165
7.13	Dionex carbopac PA-1 h.p.l.c. profile of synthesis products obtained by incubating purified *Dalbergia cochinchinensis* Pierre β-glucosidase/	166

β-fucosidase with 30% w/w D-glucose plus 20% w/w D-fucose

7.14 Separation of glucose disaccharides and other sugars by thin-layer chromatography using 1-butanol: ethanol: water (5:3:2 by vol.) 167

7.15 Separation of trisaccharide, disaccharide and monosaccharide (in order of elution) on Biogel P-2 superfine chromatography 168

7.16 pH profiles of oligosaccharide synthesis by β-galactosidase and by α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima 170

7.17 Temperature profiles of oligosaccharide synthesis by β-galactosidase and α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima 171

7.18 Effect of monosaccharide concentration on yield of synthesis by β-galactosidase and α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima 172

7.19 Time course of oligosaccharide synthesis by β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima 173

7.20 H.p.l.c. profile of the synthesis products obtained with α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima. 175

7.21 Time course of oligosaccharide synthesis by α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima 176

7.22 HPAEC profiles of various standards analysed on CarboPac PA1 column equipped with PAD using (a) eluent A (0.075 N NaOH), (b) eluent B (0.075 N NaOH + 0.164 mM zinc acetate), and (c) eluent C (0.1 N NaOH + 0.65 mM zinc acetate) as mobile phases 178

7.23 HPAEC profiles of products after synthesis for 1 , 3 , 5 , and 11 days by α-mannnosidase from *Vigna umbellata* 179

7.24 Yield of total mannobioses after synthesis by incubation of *Vigna umbellata* α-mannosidase with mannose under various conditions: (a) temperature from 30°- 80 °C, (b) pH from 4.0-10.0, and (c) concentration of mannose from 10% - 80% w/v 180

7.25 H.p.l.c. profile of oligosaccharide products obtained with partially purified α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth 182

7.26 Effect of varying temperature on the synthesis of oligosaccharides 183

by α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth

7.27 Effect of varying pH on the synthesis of oligosaccharides by α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth 184

7.28 Effect of varying mannose concentration on the synthesis of oligosaccharides by α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth 185

7.29 H.p.l.c. profile of synthesis using purified cassava linamarase 187

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ผลิตผลการเกษตรเคยเป็นสินค้าที่นำรายได้เข้าสู่ประเทศไทยเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาสินค้าส่งออกทั้งหมด สินค้าการเกษตรที่เคยทำรายได้จำนวนมากเข้าสู่ประเทศไทยได้แก่ ข้าว ยางพารา และมันสำปะหลัง ในปัจจุบันประเทศไทยกำลังพัฒนาเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางเศรษฐกิจ จากประเทศเกษตรกรรมมา สู่ประเทศอุตสาหกรรม โดยพยายามนำวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสมัยใหม่มาใช้เพื่อสนับสนุนการปรับเปลี่ยนดังกล่าว

แม้ว่าในปัจจุบันรายได้ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวจะมิได้ครองอันดับหนึ่งอีกต่อไป แต่ก็ยังคงอยู่ในอันดับต้น ๆ แสดงให้เห็นว่าผลผลิตการเกษตรดังกล่าวยังคงเป็นอาชีพที่ได้รับความนิยม และการยอมรับอย่างสูงในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อให้มีการใช้ทรัพยากรของชาติอย่างเหมาะสมและเต็มประสิทธิภาพ การพัฒนาอุตสาหกรรมในประเทศจึงควรเน้นการแปรสภาพวัตถุดิบทางการเกษตรให้มีมูลค่าสูงขึ้น ตัวอย่างเช่น แป้ง ซึ่งในปัจจุบันเป็นส่วนประกอบสำคัญของอุตสาหกรรมหลายชนิดทั่วโลก(1, 2) โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหารและยา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายแป้งสามารถนำไปใช้เป็นสารเพิ่มความหวานและความหนืดของอาหาร เป็นสารแต่งกลิ่นและรสของอาหาร ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายแป้งอย่างสมบูรณ์คือน้ำตาลกลูโคส เป็นสารต้นตอที่สำคัญมากในการผลิตสารอื่น ๆ เช่น ยาปฏิชีวนะ แอลกอฮอร์ น้ำตาลฟรุคโตส ซอร์บิทอล และอื่น ๆ อีกมากมาย นอกจากนี้แป้งยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมกระดาษ และเสื้อผ้า อีกด้วย ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 แสดงตัวอย่างของวัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรทที่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรม (1)

Raw materials

Agricultural

Grains (rice, wheat, maize, etc.) root crops (cassava, potato, sago, etc.) cane sugar, agricultural wastes (straw, bagasse, maize cobs, etc.)

Industrial and household

Molasses, paper and cellulose, wood waste hydrolysate, organic wastewater from starch and other factories, garbage

Products

Food

Food components (amino acids, citric acid, vitamins, flavours, colours), baker's yeast, beverages including alcoholics.

Agriculture

Animal feedstuffs (single cell protein), microbial pesticides, Rhizobium and Mycorrhizae, veterinary vaccines

Drugs

Antibiotics, diagnostic agents, vaccines, steroids

Chemicals

Acetone, butanol, enzymes, polysaccharides

Fuels

Ethanol (gasohol), methane(biogas)

สารคาร์โบไฮเดรทอีกอย่างหนึ่งซึ่งได้รับความสนใจอย่างมากจากวงการวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรมทั่วโลกคือสารจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นสารคาร์โบไฮเดรทสายสั้น ๆ ทั้งนี้เนื่องจากโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดพบได้ในธรรมชาติ โดยเป็นส่วนประกอบของโปรตีน ไขมันหรือสารอื่น ๆ และจากวิทยาการทางวิทยาศาสตร์ที่พัฒนาก้าวหน้าไปมากทำให้พบว่าโปรตีนแทบทุกชนิดในสิ่งชีวิตชั้นสูงจะมีส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์เป็นส่วนประกอบ และเมื่อไม่นานมานี้ นักวิทยาศาสตร์ยิ่งจะเพิ่มความสนใจในสารโอลิโกแซคคาไรด์มากขึ้นเนื่องจากพบว่าส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์นี้เองที่เป็นส่วนสำคัญในการกำหนดหน้าที่ของโปรตีนต่างๆ (3,4) สารโอลิโกแซคคาไรด์ที่อยู่บนผิวของเซลล์ต่างๆ อาจเป็นตัวการในการกำหนดรูปร่างของเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และเป็นตัวการสำคัญในการระบุลักษณะบางอย่างที่สำคัญในมนุษย์ ตัวอย่างเช่น โรคที่มีความผิดปกติของส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรทของโปรตีนบางชนิดจะแสดงออกและสามารถวินิจฉัยจากลักษณะจำเพาะภายนอกของบุคคลนั้นๆ ได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันยังได้พบบทบาทและหน้าที่ของสารโอลิโกแซคคาไรด์อิสระที่พบทั่วไปในสิ่งที่ชีวิตอีกมากมาย ตัวอย่างเช่น สารโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นตัวที่จะทำให้เกิดการสังเคราะห์สารไฟโตอเล็กซิน ในพืช (5) สารโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดสามารถจะส่งเสริมกลไกการป้องกันตัวของสัตว์ต่าง ๆ (6) และเชื้อราบางชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าในคนและสัตว์ต่าง ๆ ที่รับประทานอาหารที่มีโอลิโกแซคคาไรด์ผสมอยู่จะช่วยให้คนและสัตว์เหล่านั้นมีสุขภาพดีมีร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเป็นผลสืบเนื่องมาจากการเพิ่มความแข็งแรงของภูมิคุ้มกันของร่างกายด้วย (7)

ได้มีผู้รายงานถึงความสำคัญของโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ ว่าเป็นส่วนสำคัญที่จะบ่งถึงความจำเพาะทางชีวภาพของโปรตีนหลายชนิด (8) เช่นเป็นสารที่บ่งบอกหมู่เลือด เป็นตัวจับเชื้อโรค หรือแม้กระทั่งเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการก่อให้เกิดเนื้องอกต่าง ๆ ดังแสดงในตาราง

ที่ 2 โอลิโกแซคคาไรด์ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยหลายประเภทเช่น การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ย่อยคาร์โบไฮเดรท ศึกษาโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรท นอกจากนี้ยังมีการนำสารนี้ไปใช้ในการศึกษาพัฒนาเครื่องมือตรวจวินิจฉัยโรคและการพัฒนายาต่าง ๆ การสร้างสารโอลิโกแซคคาไรด์จึงมีประโยชน์สำหรับใช้ในการวิจัยในด้านต่าง ๆ ทั้งทางการแพทย์ และเภสัชศาสตร์

เนื่องจากสารโอลิโกแซคคาไรด์มีความสำคัญในการทำงานต่าง ๆ ของเซลล์ เกี่ยวข้องกับการรับรู้ของเซลล์และควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์และยังมีแนวโน้มที่จะถูกนำไปใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมหลายชนิดโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารและยา ทำให้การศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์เป็นปัญหาที่ท้าทายและจะเป็นประโยชน์เป็นอย่างมาก

ในปัจจุบันโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดถูกผลิตขึ้นโดยบริษัทต่าง ๆ ในรูปของสารเคมีบริสุทธิ์ โดยอาศัยกระบวนการทางเคมี เพื่อให้นักวิจัยสามารถนำไปใช้ในงานวิจัยต่าง ๆ ได้ แต่มีราคาแพงมาก โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากน้ำตาลซูโครส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเท่านั้นที่มีราคาถูกและมีการผลิตในปริมาณมาก โอลิโกแซคคาไรด์อื่น ๆ ยังผลิตได้ปริมาณน้อยและบางชนิดยังไม่มีผู้สามารถผลิตได้เลย

โอลิโกแซคคาไรด์บางตัวอาจแยกได้จากธรรมชาติ หรือได้จากการย่อยโพลีแซคคาไรด์หรือโดยอาศัยกระบวนการทางเคมี (9,10) ต้องอาศัยขั้นตอนของปฏิกิริยาที่ยุ่งยากและซับซ้อน สิ้นเปลืองทั้งเวลาค่าใช้จ่ายและกำลังงานเป็นอย่างมาก (รูปที่ 1.1) อีกวิธีที่อาจทำโดยเตรียมจากส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนที่มีอยู่ในธรรมชาติให้บริสุทธิ์ ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้ยากเนื่องจาก ส่วนใหญ่ปริมาณของโปรตีนต่าง ๆ ที่มีในธรรมชาติก็มีอยู่น้อยเกินกว่าจะนำมาใช้เตรียมให้ได้ในปริมาณที่มากพอ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการตื่นตัวในการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อ

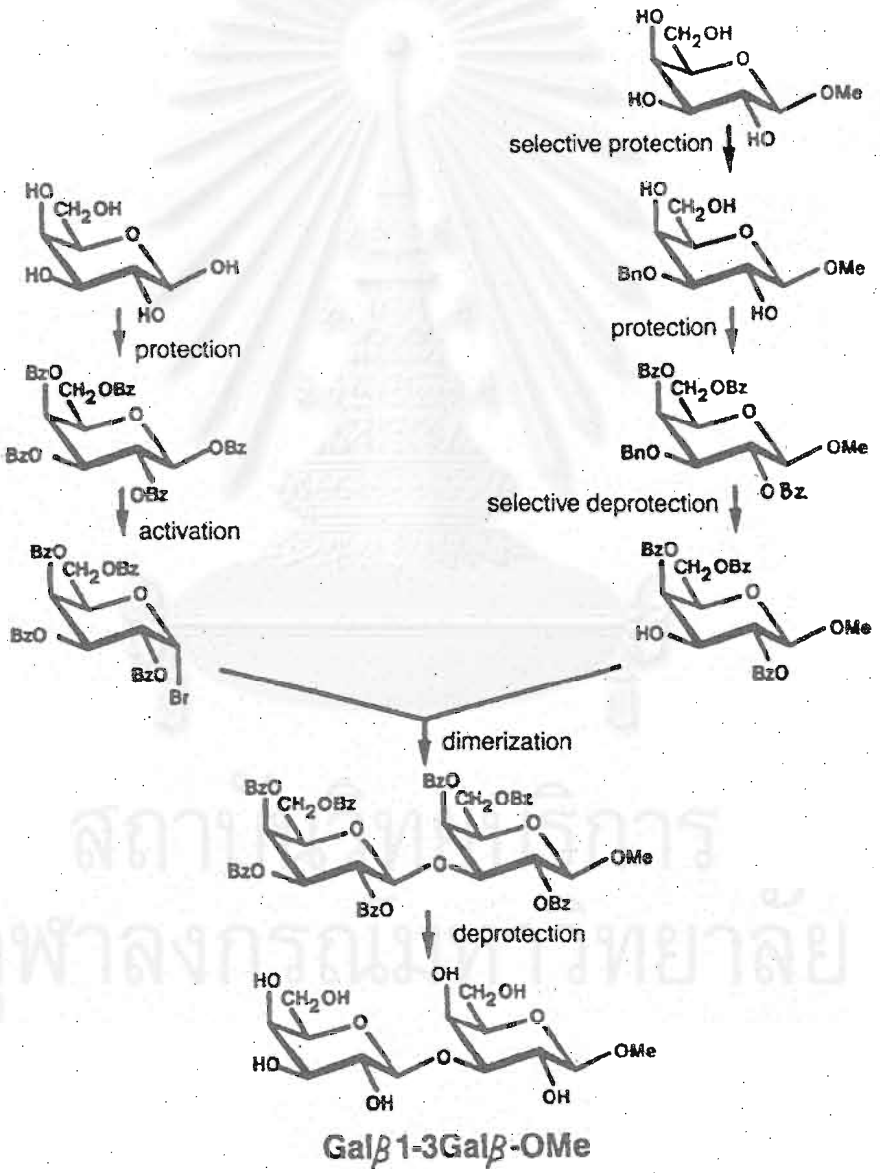
ตารางที่ 1.2 แสดงตัวอย่างเอนไซม์ที่ถูกนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม (1)

Enzymes	Action	Uses
Alpha-amylase and glucoamylase	Cleavage of alpha-1,4 glycosidic links	Production of glucose syrup from starch
Alpha-amylase and other enzymes	Cleavage of alpha-1,4 links, etc.	Removal of starch residues textile and detergent industries
Glucose isomerase	Isomerisation of glucose and fructose	Production of high-fructose syrup from glucose
Lactase	Conversion of lactose to glucose and galactose	Production of low-lactose milk
Pectolytic enzymes	Hydrolysis of pectin	Removal of cloudiness from fruit juices, wine, etc.
Glucose oxidase	Oxidation of glucose to gluconolactone + H_2O_2	Assay of glucose in diagnostics, removal of glucose from foods, etc.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปรับปรุงการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการที่อาศัยเอนไซม์มักจะมีประสิทธิภาพและความจำเพาะสูง จึงน่าจะสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ให้สะดวกและรวดเร็วขึ้นกว่าเดิม

รูปที่ 1.1 แสดงการสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ด้วยขบวนการทางเคมี (11)



ปัญหาที่นักวิทยาศาสตร์ที่ศึกษาในเรื่องของคาร์โบไฮเดรทพบว่าเป็นปัญหาที่ทำให้งานวิจัยในเรื่องของคาร์โบไฮเดรทไม่ก้าวหน้าไปเท่าที่ควร เกิดจากการที่ส่วนประกอบพื้นฐานของสารจำพวกคาร์โบไฮเดรทอันได้แก่น้ำตาลต่าง ๆ เป็นสารที่มีสูตรโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันมาก โดยมีสูตรโครงสร้างเป็นสารจำพวกโพลีไฮดรอกซีอัลดีไฮด์ หรือ โพลีไฮดรอกซีคีโตน ตัวอย่างเช่น น้ำตาล กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส มีสูตรโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่แอลกอฮอล์ปฐมภูมิ 1 หมู่ และหมู่แอลกอฮอล์ทุติยภูมิ 4 หมู่ และหมู่แอลกอฮอล์ทั้งหมดสามารถทำปฏิกิริยาได้เหมือน ๆ กัน นั่นหมายความว่าถ้าจะทำให้เกิดสารไดแซคคาไรด์ หรือการเอาน้ำตาลอีกโมเลกุลมาต่อเข้ากับน้ำตาลตัวแรก จะสามารถสร้างพันธะขึ้นได้ถึง 5 พันธะขึ้นกับว่าจะมีการทำปฏิกิริยากับหมู่แอลกอฮอล์ที่ตำแหน่งใด ดังนั้นการที่จะใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์สารเหล่านี้จึงขึ้นกับโอกาส ว่าจะได้ผลผลิตที่มีการต่อกันของพันธะใดบ้าง และบางครั้งผลผลิตที่ได้ในบางสภาวะของปฏิกิริยาจะเป็นผลผลิตที่เป็นส่วนผสมของน้ำตาลที่มีพันธะต่าง ๆ อยู่ด้วยกัน หรือบางทีจะได้ผลผลิตที่เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างแตกกิ่งก้านสาขาที่ยุ่งยากเกิดขึ้นได้ ดังนั้นการพยายามสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวตามกำหนดและมีส่วนประกอบตามที่กำหนดโดยอาศัยกระบวนการทางเคมีนั้นเป็นเรื่องยุ่งยากมาก และบ่อยครั้งอาจไม่สามารถควบคุมให้เกิดตามความประสงค์ได้ หรือในบางกรณีการสังเคราะห์อาจให้ปริมาณสารที่น้อย จนไม่สามารถนำไปใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากต้นทุนการผลิตจะสูง จนผลผลิตที่ได้ไม่คุ้มทุน การใช้เอนไซม์เป็นทางเลือกที่น่าจะดีที่สุดเนื่องจากเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูงมากและวิทยาการสมัยใหม่น่าจะช่วยให้สามารถพัฒนาเป็นการผลิตสารโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่ขึ้นในปริมาณที่สูงขึ้นจนถึงขั้นที่จะใช้ในอุตสาหกรรมได้

จากผลงานวิจัยในอดีตพบว่าการสังเคราะห์สารจำพวกคาร์โบไฮเดรทและโอลิโกแซคคาไรด์โดยเอนไซม์สามารถทำได้สองวิธีโดยอาศัยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด (11,12,13) คือ โดยการใช้เอนไซม์ไกลโคซิล ทรานสเฟอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเติมน้ำตาลทีละโมเลกุลให้กับสับสเตรท ส่วนอีกวิธีหนึ่งสามารถทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์ไกลโคซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่โดยปกติจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสลายสารโพลีแซคคาไรด์หรือโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งพบว่าเอนไซม์นี้ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสามารถจะเร่งการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ด้วย (ตารางที่ 1.3)

เอนไซม์ไกลโคซิล ทรานสเฟอเรส เป็นเอนไซม์ที่ธรรมชาติใช้สร้างสารจำพวกคาร์โบไฮเดรท โดยการย้ายน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์จากตัวให้ (donor) ที่มักจะเป็นพวกน้ำตาลนิวคลีโอไทด์ เช่น UDPG (Uridyl diphosphate glucose) ไปยังตัวรับ (acceptor) เอนไซม์จำพวกนี้ในสัตว์ชั้นสูงจะพบในปริมาณน้อยและมักจะเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเยื่อเซลล์ ซึ่งจะแยกออกมาด้วยวิธีการแยกทางชีวเคมีได้ยาก แต่เนื่องจากมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ประเภทนี้เป็นจำนวนมากจึงทำให้ในปัจจุบันสามารถแยกเอนไซม์ประเภทนี้จากแหล่งต่าง ๆ หลายแหล่งให้บริสุทธิ์ได้

ปฏิกิริยาที่ใช้ในการสร้างคาร์โบไฮเดรท สามารถเขียนง่าย ๆ ได้เป็น

$$DOR + R'OH \rightleftharpoons DOR' + ROH$$

DOR = glycosyl donor

R′OH = acceptor

ตารางที่ 1.3 แสดงตัวอย่างโอลิโกแซคคาไรด์ และความสำคัญ (11)

Blood group active substances	
Fuc (α 1-2) Gal (β 1-3) GlcNAc...	H structure
GalNAc(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3)GlcNAc....	A structure
Gal(α1-3)[Fuc(α1-2)]Gal(β1-3)GlcNAc...	B structure
Receptors for pathogens	
Gal(α1-4) Gal(β1)-R	P-fimbriated E.coli
Tumor-associated antigens	
NeuNc(α2-8)NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)Glc(β1)-R	melanoma
NeuNc(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1)-R	various cancers
NeuNc(α2-3)Gal(β1-3)[Fuc(α1-4)] GlcNAc(β1)-R	pancreas, colon cancer
Gal (β1-4)[Fuc (α1-3)]GlcNAc(β1) - R	gastrointestinal adenocarcinoma

Some conversions/applications of various oligosaccharide glycosides

Allylglycosides

- Inhibitors
- Temporary anomeric protection
- Polysaccharide copolymers
- Affinity adsorbents
- Neoglycoproteins

Benzylglycosides

- Inhibition studies
- Temporary anomeric protection

2-Bromoethylglycosides

- Neoglycoproteins
- Affinity supports
- Neoglycolipids
- Glycosides for affinity labelling or coupling

Methylglycosides

- Inhibition studies
- Temporary anomeric protection

p-Nitrophenyl glycosides

- Enzyme substrates
- Inhibition studies
- Coupling to proteins, affinity adsorbents

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อย่างไรก็ตามการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์จำพวกไกลโคซิลทรานสเฟอเรสนี้ยังคงมีปัญหาอยู่ เนื่องจากเอนไซม์จำพวกนี้ที่ได้จากธรรมชาติส่วนใหญ่ทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก จะไม่ค่อยคงตัว ถูกทำลายได้ง่าย เอนไซม์มักต้องการสับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์ของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีราคาแพง เอนไซม์ที่พบว่าอาจมีประโยชน์ในการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ตามปฏิกิริยานี้ คือ เอนไซม์ที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสับสเตรทเพราะอาจใช้พลังงานจากการสลายซูโครสใช้เป็นกลูโคสและฟรุคโตสได้โดยตรงในการเกิดปฏิกิริยา ไม่จำเป็นต้องใช้สารพลังงานสูงอื่น ๆ แต่เอนไซม์นี้สร้างน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่ค่อยมีประโยชน์มากนักคือ มักจะสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นโพลีเมอร์ ของน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุคโตสชนิดเดียว ซึ่งเป็นรูปของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เราสามารถเตรียมได้ง่าย ๆ จากการย่อยแป้งหรือโพลีเมอร์ของน้ำตาลดังกล่าวอยู่แล้ว

วิธีการที่สองคือ การสังเคราะห์โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์ที่ปกติจะทำหน้าที่เร่งการสลายสารไปลีแซคคาไรด์หรือโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งได้รับความสนใจมากกว่าเพราะใช้ผลิตผลของการสลายสารโพลีแซคคาไรด์มาเป็นสับสเตรท สารพวกนี้ราคาถูกและหาได้ง่าย และเชื่อว่าถ้าปรับสภาวะของปฏิกิริยาให้เหมาะสมจะสามารถสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีประโยชน์และอยู่ในรูปที่พึงประสงค์ได้ เอนไซม์จำพวกนี้จะมีประโยชน์สำหรับใช้สร้างสารไปลีแซคคาไรด์หรือคาร์โบไฮเดรทสายสั้นๆ มากกว่าโอลิโกแซคคาไรด์สายยาว เอนไซม์จำพวกนี้ได้แก่ เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส ที่มีวางขายในท้องตลาดในราคาไม่แพงนัก สามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้โดยไม่ยากนัก และมักมีความคงตัวสูง สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานานโดยไม่มีการเสียสภาพและคุณสมบัติในการทำงานไป เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามลักษณะของการสลายสับสเตรท คือเอนไซม์จำพวกเอ็กโซไกลโคซิเดส

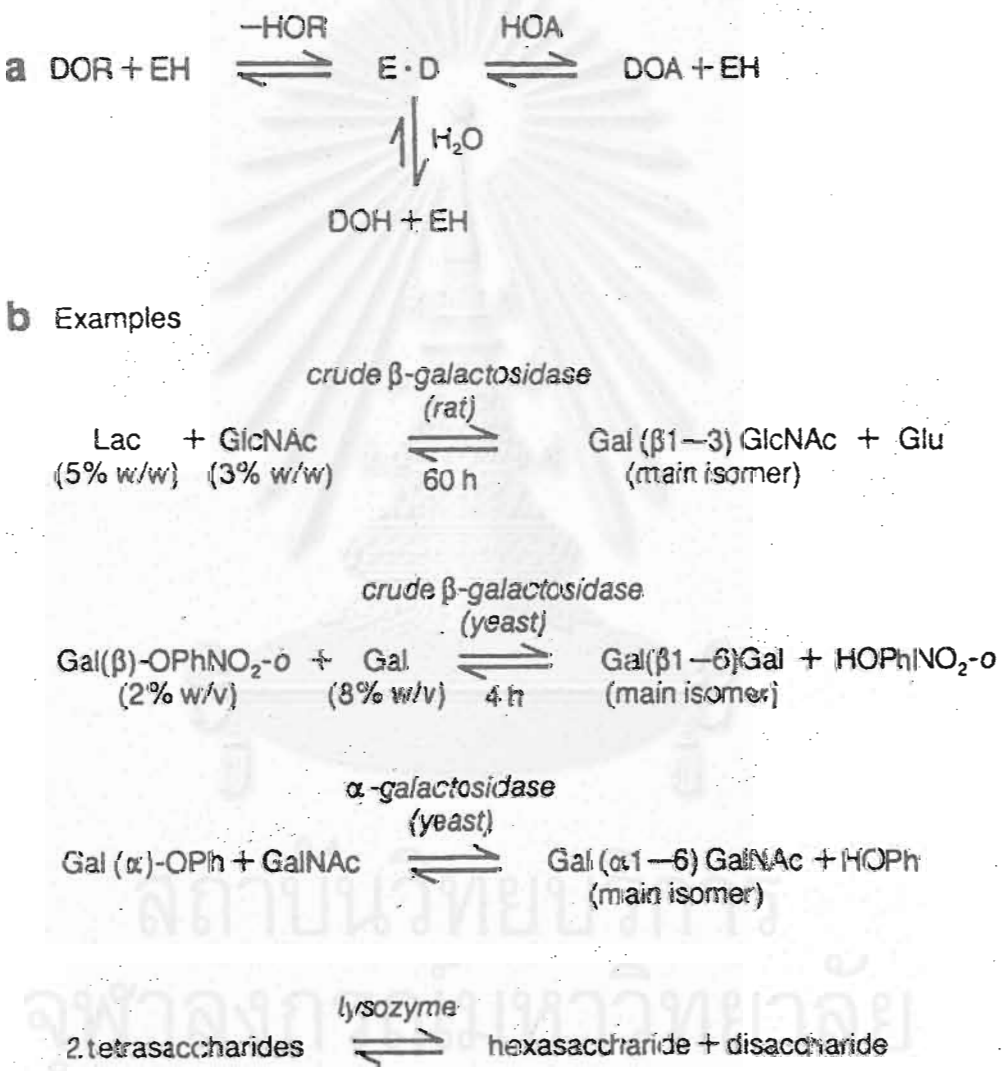
(exoglycosidase) ซึ่งจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่ปลายที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันได้ (non-reducing end)ของคาร์โบไฮเดรทโพลีเมอร์ และ เอนไซม์จำพวกเอ็นโดไกลโคซิเดส (endoglycosidase) ซึ่งจะย่อยพันธะไกลโคซิดิกภายในสายโพลีแซคคาไรด์ เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ แทบทุกชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไวรัส แบคทีเรีย พืช และเซลล์ของสัตว์ มักเร่งปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องใช้โคแฟคเตอร์ สับสเตรทที่ใช้ไม่จำเป็นต้องเป็นสารที่มีพลังงานสูง ไม่ต้องใช้อนุพันธ์ของนิวคลีโอไทด์เป็นสับสเตรท แต่พันธะของโอลิโกแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้นด้วยเอนไซม์จำพวกนี้จะมีความจำเพาะน้อยกว่าพวกที่สร้างขึ้นโดยใช้เอนไซม์ไกลโคซิล ทรานสเฟอเรส และมักจะเกิดพันธะหลาย ๆ พันธะปนกันอยู่ เช่นผลิตผลจากปฏิกิริยาที่ใช้สับสเตรทเป็นกลูโคสอาจเป็นสารที่มีพันธะ 1-6 ,1-4, 1-3 และ 1-2 ปนกันอยู่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์จำพวกนี้น่าจะใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์สารสั้น ๆ ได้ดีกว่าเอนไซม์จำพวกไกลโคซิล ทรานสเฟอเรส

เทคนิคของการใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์เป็นที่ทราบกันดีและใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับเอนไซม์จำพวกไฮโดรเลสและไลเปส ตัวอย่างเช่นการผลิตสารแอสปาเตมซึ่งเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลจากกรดอะมิโน แอสปาติก และฟีนิลอะลานีน ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์เอสเตอเรสใช้สำหรับการทำโกโก้จากวัตถุดิบอื่นที่ราคาถูกกว่าโดยมีคุณภาพใกล้เคียงกับที่ได้จากเมล็ดโกโก้ตามธรรมชาติ กลไกลการเกิดการย้อนกลับของปฏิกิริยาอธิบายได้โดยอาศัยความคล้ายคลึงของปฏิกิริยาของเอนไซม์ทรานสเฟอเรส ซึ่งตามปกติจะมีการย้ายหมู่ของสับสเตรทไปยังตัวรับและในกรณีของเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสตัวรับก็คือน้ำนั่นเอง การเกิดการย้อนกลับของปฏิกิริยาของไกลโคซิเดสที่ศึกษากันมากทำได้ 2 วิธีด้วยกันคือ

วิธีที่ 1 Kinetically controlled synthesis (transglycosidation)

วิธีที่ 2 Equilibrium controlled synthesis

รูปที่ 1.2 การสังเคราะห์เอนไซม์โดยใช้ปฏิกิริยา Transglycosylation หรือ Transglycosidation (11)



ผู้ใช้ปฏิกิริยานี้คนแรกคือ Rabate (14) อาศัยสับสเตรทที่มีหมู่ที่สามารถจะถูกไฮโดรไลส์ได้ง่ายทำให้เกิดของผลิตผลของปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว สามารถใช้เอนไซม์ปริมาณน้อย ๆ ได้โดยการควบคุมจลนศาสตร์ของเอนไซม์ดังกล่าว ปฏิกิริยาเรียกว่าทรานสไกลโคซิเดชัน (transglycosidation) ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้โดยใช้ตัวรับที่ความเข้มข้นสูง ๆ เนื่องจากเมื่อมีการเกิดผลิตผลขึ้นก็จะมีการสลายผลิตผลที่เกิดขึ้นนั้นด้วย และในที่สุดเมื่ออัตราการสลายของผลิตผลมากกว่าอัตราการสร้าง ก็จะมีการสูญเสียผลิตผลที่เกิดขึ้นไป ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลิตผลตามต้องการ ปฏิกิริยานี้จะต้องหยุดปฏิกิริยาเมื่อได้ผลิตผลสูงสุด ซึ่งถ้าสามารถใช้ตัวให้ (donor) ที่มีประสิทธิภาพสูงและมีตัวรับ (acceptor) ปริมาณมากเกินพอ อาจจะสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้จนกระทั่งตัวให้ถูกใช้หมดไป (ดังแสดงในรูปที่ 1.2) ตัวให้ที่นิยมใช้กันมากคือไกลโคไซด์บางตัวที่ราคาถูกเช่น มอลโตส แลคโตส แรฟฟิโนส ก็สามารถใช้เป็นตัวให้สำหรับปฏิกิริยานี้ได้ (11,12,13) ตัวอย่างการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธีนี้แสดงในตารางที่ 1.4

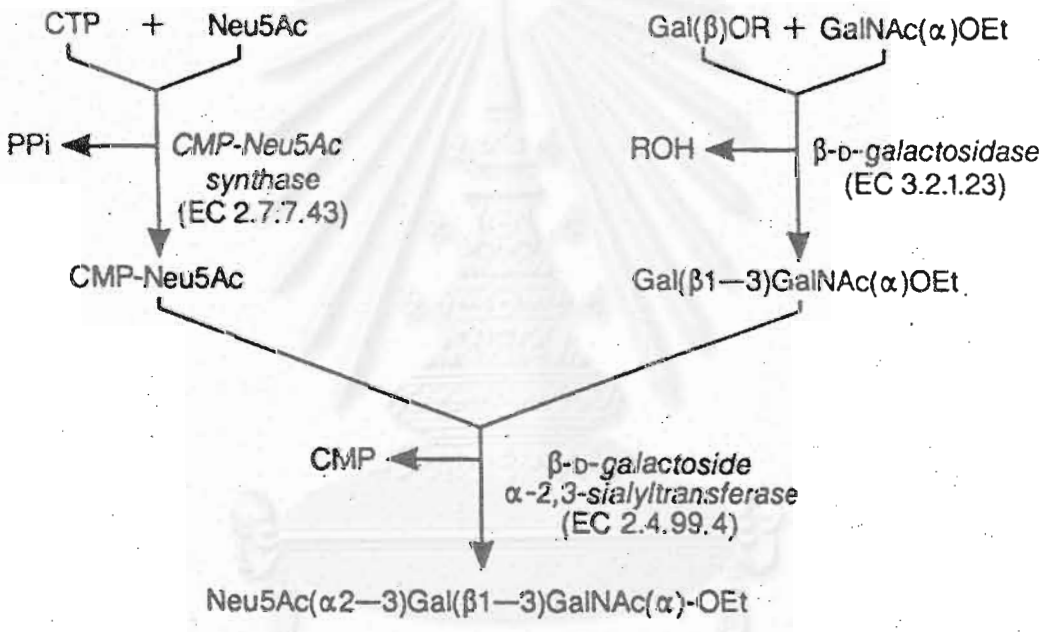
วิธีที่ 2 เป็นการสังเคราะห์โดยการควบคุมสภาวะสมดุลย์ของปฏิกิริยา (Equilibrium controlled synthesis) Bourquelot and Bridel ได้เสนอวิธีการนี้ในปี 1912 (15) โดยใช้สภาวะที่มีน้ำน้อย ใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง (อาจมากถึง 90% w/v)และใช้อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง เพื่อเร่งอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้อาจควบคุมการเกิดสมดุลย์ของปฏิกิริยา โดยมีการนำผลผลิตของปฏิกิริยาออกไปจากปฏิกิริยาซึ่งอาจ ทำได้โดยใช้ตัวทำละลายที่ไม่ปนกับน้ำเพื่อจะนำผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกไปจากปฏิกิริยาที่อยู่ในน้ำ ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาและปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นได้อย่างต่อเนื่องจนกว่าสับสเตรทหรือตัวให้ที่มีอยู่จะหมดไปจากปฏิกิริยา

การใช้ตัวทำละลายที่ไม่ปนกับน้ำที่เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปฏิกิริยาของการสร้างไขมัน แต่จะมีประโยชน์น้อยสำหรับการสังเคราะห์สารจำพวกคาร์โบไฮเดรท เนื่องจากสารจำพวกนี้ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตาม ได้มีการพัฒนาใช้ Aqueous two phase system ของเด็กซแทรน และโพลีเอธิลีนไกลคอล ซึ่งจะทำให้สามารถแยกเอนไซม์และผลผลิตซึ่งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ออกจากกันได้(12)

จากที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าเอนไซม์จำพวกกลูโคซิล ทรานสเฟอเรสเหมาะสำหรับใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์สายยาวหรือไปลีแซคคาไรด์ ในขณะที่เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสเหมาะสำหรับสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ดังนั้นจึงมีผู้นำเอนไซม์ทั้งสองมาใช้ร่วมกัน โดยจะใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสสังเคราะห์สายโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ๆ ก่อนแล้วใช้เอนไซม์ไกลโคซิล ทรานสเฟอเรสในขั้นตอนสุดท้ายเพื่อให้ได้สายโพลีแซคคาไรด์ ตัวอย่างเช่น การสังเคราะห์ Neu 5 Ac(α 2-3) Gal (β 1-3) Gal Nac (α)-OEt ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของแอนติเจนที่ทำให้เกิดเนื้องอกสามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสก่อน แล้วตามด้วยเอนไซม์ เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์ อัลฟา-2,3-ไซอะลิล ทรานสเฟอเรส จะสามารถใช้เพียง 2 ขั้นตอนในการสังเคราะห์สารดังกล่าว (11) ในขณะที่ถ้าใช้วิธีการทางเคมีจะต้องใช้ขั้นตอนที่ยุ่งยากมากถึง 10 ขั้นตอน (16)

ทั้งไกลโคซิลทรานสเฟอเรสและไกลโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่นอกจากจะใช้สับสเตรทตามธรรมชาติแล้ว ยังสามารถเกิดปฏิกิริยาได้โดยใช้ตัวรับหรือสับสเตรทที่ต่างออกไปได้อีกด้วย ทั้งนี้เนื่องจากว่าโครงสร้างโดยทั่วไปของน้ำตาลจำพวกโมโนแซคคาไรด์มีความคล้ายคลึงกันมาก น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติมักจะมีคาร์บอน 6 ตัวเป็นส่วนประกอบและมีหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่อัลดีไฮน์หรือคีโตนเป็นหมู่ที่ทำปฏิกิริยาต่าง ๆ ด้วยโครงสร้างและหมู่ที่ทำ

รูปที่ 1.3 รูปแสดงการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิเดสร่วมกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (11)



Sequential use of glycosidase and glycosyltransferase in the synthesis of an oligosaccharide.

ตารางที่1.4 ตัวอย่างของเอนไซม์ที่มีการนำมาใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ (12)

Enzyme	Donor	Acceptor	Products
Glucosidase (yeast)	Maltose	Glucose	Nigerose, isomaltose kojibiose, maltotriose
β-Glucosidase	Cellobiose	Glucose	Gentiobiose, laminaribiose trisaccharides
	Gentiobiose	Glucose	Trace of laminaribiose
	Laminaribiose	Glucose	Gentiobiose
Transglucosylase	Cellobiose	Lactose	Glcβ-1 - 6 Gal
Mannosidase	p-Nitrophenyl	Mannose	Manα-1-2 Man
(jack bean)	α-Mannoside		Manα-1-6 Man
α- Glucosidase	Phenyl α-glucoside	Galactose	Glcα-1 - 6 Gal
(Tetrahymena)		Mannose	Glcα-1 - 6 Man
		Xylose	Glcα-1 - 4 Xyl
		Ribose	Glcα-1 - 1 Rib
		Erythritol	Glcα-1 - 6 Ery-ol
		Mannitol	Glcα-1 - 1 Man-ol
		Glucitol	Glcα-1 - 1 Glc-ol
			Glcα-1 - 6 Glc-ol
α-Glucosidase	Starch	Glucose	Nigerose, maltose, kojibiose,
(buckwheat)			isomaltose, 2-nigerosylglucose nigerotriose, 3-maltosylglucose maltotriose
α-Glucosidase	Phenyl α-glucoside	Fructose	Turanose, maltulose, 1-α-glucosyl
(yeast)			fructose,plus three unidentified glucosyl fructoses
β-Galactosidase	Lactose	N-Acetyl	Gal β-1-6 Gal Nac
(*E.coli*)		galactosamine	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยาที่ใกล้เคียงกันนี้เองทำให้เอนไซม์อาจสามารถใช้น้ำตาลที่ไม่ใช่สับสเตรทหรือตัวให้ตัวรับตามธรรมชาติได้ด้วย ซึ่งเหตุผลดังกล่าวนี้เป็นปัญหาที่ขัดขวางความก้าวหน้าทางวิทยาการเกี่ยวกับคาร์โบไฮเดรทมาเป็นเวลาช้านาน แต่ด้วยเทคโนโลยีที่ทันสมัยในปัจจุบันทำให้สามารถศึกษาเรื่องของคาร์โบไฮเดรทได้ดีขึ้น นักวิทยาศาสตร์ปัจจุบันจึงเพิ่มความสนใจในการศึกษาค้นคว้าวิจัยในเรื่องนี้เพิ่มขึ้น

เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสมักจะมีชื่อเรียกตามสับสเตรท เป็นต้นว่าเอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลแมนโนสจะมีชื่อเรียกว่าแมนโนซิเดส เอนไซม์ที่สามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลกลูโคสจะเรียกว่ากลูโคซิเดส เป็นต้น เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสหลายชนิดได้ถูกนำมาใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ เชื่อว่าเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสทุกชนิดสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับได้ แต่อาจมีคุณสมบัติต่างกันไปตลอดจนผลผลิตที่ได้จะมากน้อยต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ด้วย ได้มีการศึกษาวิจัยการสังเคราะห์โอลิแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์หลายชนิดอย่างกว้างขวาง เอนไซม์ที่พบว่าสามารถใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยปฏิกิริยาย้อนกลับได้ดีมีหลายชนิด ที่ศึกษากันมากคือ เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส แหล่งของเอนไซม์นี้ที่ศึกษากันมากในปัจจุบันคือเอนไซม์ที่ได้จากถั่วแจ็ค (jack bean) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ชนิดนี้สามารถเตรียมได้ในปริมาณมาก และมีผู้ผลิตขายในท้องตลาด แม้ว่าราคาจะค่อนข้างสูงแต่ก็สามารถหาซื้อได้ง่าย จากการศึกษาของ Bucke และคณะพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ อัลฟา-แมนโนซิเดสจากถั่วแจ็คในปฏิกิริยาที่มีน้ำตาลแมนโนส : น้ำตาลตัวรับอื่นเป็น 50:50 (โดยน้ำหนัก) จะมีการสร้างน้ำตาลไดแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ขึ้น ซึ่งผลิตผลที่เกิดขึ้นเกิดได้มากถึง 72 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก (17)ในขณะที่ Johansson และคณะสามารถสร้างผลิตผลได้ 37 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก เมื่อใช้น้ำตาลแมนโนสความเข้มข้น 85 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักและทำปฏิกิริยาที่ 85°ซ (18,19) นอกจากเอน

ไซม์อัลฟาแมนโนซิเดส เอนไซม์อื่นที่มีผู้ศึกษาเรื่องปฏิกิริยาย้อนกลับ คือ เอนไซม์ เบต้า-กลูคาเนส จากเชื้อรา *Penicillium emersonii* (20) สามารถย้อนกลับสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้โดยได้ผลผลิตประมาณ 16.5 เปอร์เซนต์ เมื่อสังเคราะห์โดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 60 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 60° ซ เป็นเวลา 80 ชั่วโมง เอนไซม์กลูโคอะมิเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* จะสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ ได้เช่นกันเมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 60° ซ (21) เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส จาก *Escherichia coli* สามารถใช้สร้างโอลิโกแซคคาไรด์ได้เช่นกัน (22) เอนไซม์เบต้า-ไซโลซิเดสจาก *Aspergillus niger* ก็มีการศึกษาในเรื่องนี้เช่นกัน (23) เอนไซม์ทั้งหมดที่กล่าวมานี้นอกจากจะสามารถสังเคราะห์ โฮโม-โอลิโกแซคคาไรด์ (homo-oligosaccharide) ได้จากน้ำตาลที่เป็นสับสเตรทในธรรมชาติแล้ว ยังสามารถสังเคราะห์เฮทเทอโร-โอลิโกแซคคาไรด์ (hetero-oligosaccharide) ได้เมื่อใช้สับสเตรทร่วมกับน้ำตาลตัวอื่นด้วย (17,20,21) อย่างไรก็ตามการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมของการสังเคราะห์และแหล่งที่มาของเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการสังเคราะห์สูงยังไม่ได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยกันอย่างลึกซึ้ง

สำหรับเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส นอกจากจะใช้สร้างสารคาร์โบไฮเดรท ทั้งโอลิโกแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์แล้ว ยังได้มีความพยายามใช้ประโยชน์จากเอนไซม์จำพวกนี้ในการเชื่อมต่อโมเลกุลของสายโพลีแซคคาไรด์กับโมเลกุลของสารอื่น เช่นโมเลกุลของไขมันหรือโปรตีน ซึ่งทำให้ได้สารจำพวกไกลโคลิปิดและไกลโคโปรตีน ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาการวิจัยในเรื่องของสารดังกล่าวทั้งในเรื่องของหน้าที่ และกลไกทางทำงาน กลไกการก่อให้เกิดโรค ตลอดจนอาจพัฒนาไปใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจและวินิจฉัยโรคบางชนิดหรือนำไปใช้ในการพัฒนาปรับปรุงยาและอาหารต่าง ๆ ได้ต่อไปอีกด้วย

จากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ประเทศไทยในฐานะประเทศเกษตรกรรม อุดมสมบูรณ์ด้วยทรัพยากรทางการเกษตร ควรจะมีการศึกษาวิจัยในเรื่องของการพัฒนาปรับปรุงและประยุกต์ใช้เอนไซม์เทคโนโลยีเพื่อสังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งควรใช้เอนไซม์ที่พบในวัตถุการเกษตรที่มีอยู่มากในประเทศไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด รวมถึงการศึกษาถึงคุณสมบัติของสารใหม่ที่สังเคราะห์ได้เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เนื่องจากประโยชน์ของการใช้เอนไซม์ไกลโคซิล ทรานสเฟอเรสมีขอบเขตจำกัด และมีผู้ศึกษากับอย่างกว้างขวางแล้ว ตลอดจนสับสเตรทที่ใช้ในปัจจุบันมักเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลที่มีราคาแพง การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นการสังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์ไกลโคซิเดส ที่ได้จากพืชพื้นเมืองของประเทศไทยโดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเพิ่มพูนความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธีใช้เอนไซม์ พัฒนาเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์ เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณการผลิตสารต่าง ๆ ทางอุตสาหกรรม เพื่อให้สามารถนำความรู้ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ไปปรับปรุงและพัฒนาเทคโนโลยีในประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับชนิดและปริมาณเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส ที่มีอยู่ในเมล็ดพืชต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย ที่สามารถใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์สารจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับได้ตลอดจนศึกษาถึงวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพของการสังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ให้สามารถสังเคราะห์สารที่พึงประสงค์ได้

ด้วยประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อให้สามารถนำผลิตผลที่ได้ไปใช้ในงานต่าง ๆ ได้ต่อไปในอนาคต และเป็นแนวทางการเพิ่มกำลังการผลิตให้ไปสู่ภาคอุตสาหกรรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การคัดเลือกเอนไซม์

2.1 บทนำ

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถทำได้ 2 วิธีคือ โดยการใช้เอนไซม์จำพวกไกลโคซิลทรานสเฟอเรส และการใช้เอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลส (E C. 3.2) แต่เนื่องจากการใช้เอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส ได้มีผู้ศึกษากันอย่างกว้างขวาง และพบว่าเอนไซม์จำพวกนี้มีแนวโน้มที่จะสร้างสารโปลีแซคคาไรด์สายยาวที่ประกอบด้วยพันธะใดพันธะหนึ่งอย่างเดียว นอกจากนี้เอนไซม์จำพวกนี้มักจะใช้สับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์นิวคลีโอไทด์ของน้ำตาล ซึ่งมีราคาแพง เอนไซม์ที่มีผู้ศึกษากันมากคือเอนไซม์ กลูโคซิลทรานสเฟอเรส และฟรุคโตซิล ทรานสเฟอเรส โดยมีการเตรียมเอนไซม์ขึ้นจากแบคทีเรีย แต่วิธีเตรียมยุ่งยากมาก เอนไซม์ที่เตรียมได้และวางขายในท้องตลาดมีราคาสูงมาก จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตสารโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาณมาก อย่างไรก็ตามมีนักวิทยาศาสตร์จำนวนมากได้นำเอนไซม์ดังกล่าวไปใช้ผลิตน้ำตาล โอลิโกแซคคาไรด์ของฟรุคโตส โดยมุ่งหวังจะพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต ทั้งนี้เนื่องจากปัจจุบันนี้เทคโนโลยีทางอณูชีววิทยา และวิศวกรรมพันธุศาสตร์มีความเจริญรุดหน้าไปมาก ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาแบคทีเรียให้สร้างเอนไซม์ ดังกล่าวในปริมาณที่สูงขึ้น แต่ข้อเสียของการสังเคราะห์ด้วยวิธีนี้ก็ยังคงมีอยู่ คือ มักจะได้ผลิตผลที่เป็นโปลีเมอร์ของน้ำตาลชนิดเดียวกัน และมักจะเกิดเป็นโปลีเมอร์สายยาวมากกว่า โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ ด้วยเหตุผลดังกล่าวการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาการสังเคราะห์โอ

ลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสจากพืชในประเทศไทยและตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ของเอนไซม์เหล่านั้นเป็นอันดับแรก เนื่องจากการศึกษาค้นคว้าในเรื่องดังกล่าวยังไม่เคยมีผู้วิจัยมาก่อนในประเทศไทยและผลการวิจัยนี้จะให้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับปริมาณและชนิดของเอนไซม์ประเภทนี้ในพืชนี้ที่พบในประเทศไทยอีกด้วย เป็นที่ทราบกันดีว่าในเมล็ดพืชจะต้องมีอาหารสะสมไว้สำหรับเป็นแหล่งพลังงานให้กับต้นอ่อนในเวลาที่กำลังจะงอกเป็นต้นใหม่ และโดยที่เมล็ดพืชหลายชนิดที่มีอยู่ในประเทศไทยเป็นส่วนที่เหลือทิ้งของผลิตผลทางอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เมล็ดผลไม้ ตัวอย่างเช่น เมล็ดเงาะ เมล็ดมะขาม เป็นต้น ซึ่งยังไม่เคยมีผู้ศึกษาถึงปริมาณของเอนไซม์จำพวก ไกลโคซิเดส หรือไกลโคไฮโดรเลสในเมล็ดพืชเหล่านี้มาก่อนเลย ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งหวังจะใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีอยู่มากมายภายในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ได้มีผู้รายงานว่าเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสหรือไกลโคไฮโดรเลส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกในสารจำพวกไกลโคไซด์ โอลิโกแซคคาไรด์ และโปลีแซคคาไรด์ได้ดี และยังสามารถย่อยสารคาร์โบไฮเดรทเชิงซ้อนต่างๆ เช่น ไกลโคโปรตีน ไกลโคไลปิด เป็นต้น ได้อีกด้วย มีผู้รายงานว่าเอนไซม์จำพวกนี้ทุกชนิดสามารถจะใช้ในการสังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ได้ด้วยการใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับ การสังเคราะห์จะเกิดขึ้นได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับการปรับปรุงสภาวะของปฏิกิริยาให้เหมาะสม นอกจากนั้นยังมีความเป็นไปได้สูงที่จะมีการเปลี่ยนน้ำตาลที่เป็นตัวรับ (acceptor) เป็นน้ำตาลชนิดอื่นที่มีสารโครงสร้าง ใกล้เคียงกับสับสเตรทหรือผลิตผลของปฏิกิริยา (12) ซึ่งในกรณีดังกล่าวอาจทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะได้โอลิโกแซคคาไรด์ใหม่ๆ เกิดขึ้น และปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีความจำเพาะสูงมากในเรื่องของการสร้างพันธะระหว่างโมเลกุล คุณสมบัตินี้อาจนำมาใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่พึงประสงค์ ต่อไปได้อีกด้วย ตัวอย่างการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ acceptor ต่างๆ ดังแสดงในตารางข้างล่าง

ตารางที่ 2.1 แสดงการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ acceptor sugars ต่าง ๆ กัน (13)

Donor	Acceptor	Main Product	Yield (%)
α-Fucosidase			
Fucα*O*-*p*-NO_2Ph	GalβOMe	Fucα1,6GalβOMe	10
		Fucα1,6GalβOMe	6
FucαF	GalβOMe	Fucα1,6GalβOMe	5
		Fucα1,2GalβOMe	5
α-Galactosidase			
Galα*O*-*p*-NO_2Ph	GalαOMe	Galα1,3GalαOMe	27
Galα*O*-*p*-NO_2Ph	GalβOMe	Galα1,6GalβOMe	18
Galα*O*-*p*-NO_2Ph	Galα*O*-*p*-NO_2Ph	Galα1,3Galα*O*-*p*-NO_2Ph	14
Galα*O*-*o*-NO_2Ph	Galα*O*-*p*-NO_2Ph	Galα1,2Galα*O*-*o*-NO_2Ph	6
Galα*O*-*p*-NO_2P	Galα$OCH_2CH{=}CH_2$	Galα1,3Galα$OCH_2CH{=}CH_2$	27
Galα1,6Glc	GalNAc	Galα1,6GalNAc	9
Galα1,6Glc	GlcNAc	Galα1,6GlcNAc	18
β-Galactosidase			
Galβ*O*-*p*-NO_2Ph	5-thioGlc	Galβ1,6(5-thioGlc)	30
Galβ*O*-*o*-NO_2Ph	GalαOMe	Galβ1,6GalαOMe	14
Galβ*O*-*o*-NO_2Ph	GalβOMe	Galβ1,3GalβOMe	22
Galβ*O*-*o*-NO_2Ph	Gal	Galβ1,6Gal	7
		Galβ1,3Gal	2
Galβ*O*-*o*-NO_2Ph	Ara	Galβ1,3Ara	4
		Galβ1,5Ara	12
Galβ*O*-*p*-NO_2Ph	Glcα1,2Fru	Galβ1,6Glcα1,2Fru	*
lactose	Glcα1,2Fru	Galβ1,6Glcα1,2Fru	17
lactose	GalNAc	Galβ1,6GalNAc	25
lactose	GlcNAc	Galβ1,4GlcNAc	5
lactose	GlcNAc	Galβ1,3GlcNAc	2
lactose	GlcNAc	Galβ1,3GlcNAc	12
lactose	GlcNAcβSEt	Galβ1,3GlcNAcβSEt	17
lactose	GlcNAcβSEt	Galβ1,6GlcNAcβSEt	28
Gal	GalNAc	Galβ1,6GalNAc	3
Gal	Fru	Galβ1,1Fru	8
Gal	GlcNAc	Galβ1,6GlcNAc	32
Glucoamylase			
Glc	Glc	Glcα1,4Glc	2
Glc	Glc	Glcα1,6Glc	24
α-Glucosidase			
Glc	Fru	Glcα1,4Fru	5
		Glc1,1Fru	3
Glc	Fru	Glcα1,1Fru	27
		Glcα1,4Fru	14

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Donor	Acceptor	Main Product	Yield (%)
Glc	Glc	Glcα1,3Glc	3
		Glcα1,4Glc	2
Glc	Glc	Glcα1,6Glc	24
β-Glucosidase			
Glc	Glc	Glcβ1,6Glc	3
		Glcβ1,3Glc	2
Glc	Glc	Glcβ1,6Glc	26
Glc	Glc	Glcβ1,6Glc	19
		Glcβ1,4Glc	6
Glcβ1,4Glc	Glcβ1,4Glc	Glcβ1,4Glcβ1,4Glc	11
Glucal	Glucal	2-deoxy-Glcβ1,3Glucal	9
α-Mannosidase			
ManαO*p*-NO_2Ph	ManαOMe	Manα1,2ManαOMe	18
ManαO*p*-NO_2Ph	ManαO*p*-NO_2Ph	Manα1,2ManαO*p*-NO_2Ph	8
β-*N*-Acetylglucoaminidase			
GlcNAcβO*p*-NO_2Ph	GalβOMe	GlcNAcβ1,6GalβOMe	9
GlcNAcβO*p*-NO_2Ph	ManαOMe	GlcNAcβ1,6ManαOMe	10
***N*-Acetylhexosaminidase**			
GlcNAcβO*p*-NO_2Ph	ManαOMe	GlcNAcβ1,6ManαOMe	10
GlcNAcβO*p*-NO_2Ph	GalαOMe	GlcNAcβ1,6GalαOMe	26
GlcNAcβO*p*-NO_2Ph	GalβOMe	GlcNAcβ1,3GalβOMe	4
GalNAcβO*p*-NO_2Ph	GalαOMe	GalNAcβ1,3GalαOMe	6
GlcNAcαO*p*-NO_2Ph	GalαOMe	GlcNAcα1,3GalαOMe	6
Cyclodextrin-glucosyl transferase			
GlcαF	GlcαF	α-cyclodextrin	30
		β-cyclodextrin	38
		maltooligomers	32
α-cyclodextrin	1-deoxynojirimicin (DNJ)	Glcα1,4DNJ	25
starch	DNJ[s]	Glcα1,4DNJ	18-34
Cellulase			
Glcβ1,4GlcβF	Glcβ1,4GlcβF	$(Glc\beta1,4Glc)_n$ $n\geq22$	77[u]
β-Fructofuranosidase (Invertase)			
Sucrose	Sucrose	Fruβ2,6Fruβ2,1Glc	*
Trehalase			
GlcβF	Xyl	Glcα1,1Xyl	24

ขอบเขตของการคัดเลือกเอนไซม์ที่จะนำมาศึกษาคือ เอนไซม์จะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ

1. พบในปริมาณมากในแหล่งที่ตรวจสอบ เพื่อให้สามารถแยกสกัดและเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้โดยไม่ยากนัก
2. หากไม่พบในปริมาณที่สูงมากนัก แหล่งที่มาของเอนไซม์ดังกล่าวควรจะหาได้ง่าย
3. มีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่แตกต่างกัน และมีความจำเพาะต่อพันธะที่ย่อยสูงมาก
4. ต้องมีความสามารถที่จะใช้สังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับ
5. ควรมีความคงตัวสูง เก็บไว้ได้นานโดยไม่มีการเสียสภาพไป

2.2 วัสดุและวิธีการ

2.2.1 แหล่งที่มาของเมล็ด

แหล่งที่มาของเมล็ดมีหลายแหล่ง ที่ง่ายๆ ก็คือซื้อจากที่มีวางขายในท้องตลาดแต่เมล็ดที่วางขายทั่วไปมักจะมีการเคลือบด้วยยาฆ่าเชื้อรา หรือบางครั้งมีการเก็บรักษาเมล็ดที่ไม่ถูกต้องเหมาะสมทำให้เมล็ดมีการเสียสภาพไปบางส่วนอาจมีการขึ้นราหรือมีแมลงเจาะ ดังนั้นส่วนใหญ่จะใช้เมล็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยพืชสวน สถาบันวิจัยพืชไร่ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน่วยบริการเมล็ดพันธุ์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าอาเซียน-คานาดา อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี การเลือกพืชที่นำมาใช้ศึกษาจะให้ความสำคัญของการเลือกจากพืชที่หาได้ง่ายและมีปริมาณมากเป็นอันดับแรก

2.2.2 การสกัดเอนไซม์

สกัดเอนไซม์จากเมล็ดพืชโดย ทำความสะอาดเมล็ดให้สะอาดปราศจากเชื้อโรคโดยการแช่ในน้ำยา 5 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮโปคลอไรต์เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำเมล็ดมาแช่น้ำกลั่นที่บริสุทธิ์ ทิ้งไว้ค้างคืน นำไปบดและปั่นให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทที่มีพีเอช 5.0 (ใช้ปริมาณของสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 2 เท่าของปริมาณของเมล็ด ที่มีสารละลาย ฟีนิลเมทธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethyl-sulphonylfluoride, PMSF) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ของสารละลายโปลีไวนิล- โปลีไพรโรลิโดน ผสมอยู่ เพื่อป้องกันการสูญเสียเอนไซม์จากการทำลายโดยเอนไซม์จำพวกโปรตีเอส และเพื่อกำจัดสารจำพวกโปลีฟีนอลที่มักมีอยู่มากในเมล็ด จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้ากรอง นำสารละลายที่สกัดได้มาปั่นที่ 12,000 g เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาเติม 25% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) Dowex 2-X8 กวนให้เข้ากัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g เป็นเวลา 30 นาที อีกครั้งหนึ่งเทตะกอนทิ้ง ส่วนน้ำใสที่ได้เรียกว่า crude extract หรือสารสกัดหยาบ นำมาเก็บไว้ที่ 4°ซ เพื่อใช้ในการทดลองตรวจสอบหาเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสต่อไป

2.2.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยของเอนไซม์

ตรวจหาแอคติวิตี้หรือความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โดยใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนิล ไกลโคไซด์เป็นสับสเตรท ปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 ไมโครลิตรของเอนไซม์ที่เจือจางจนมีความเข้มข้นเหมาะสมในการตรวจสอบ, 100 ไมโครลิตรของ 0.01 โมลาร์ พาราไนโตรฟีนิล ไกลโคไซด์, 850 ไมโครลิตรของ 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ทำปฏิกิริยาโดยการบ่มที่ 30° ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 เท่าของปริมาตร

ของสารละลาย 2 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต วัดปริมาณพาราไนโตรฟีนิลที่ถูกปล่อยออกมาจากสับสเตรทด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโนเมตรกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสับสเตรทแล้วปล่อยพาราไนโตรฟีนอลออกมาได้ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาทีที่ 30° ซ

2.2.4 การตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

เนื่องจากเอนไซม์ที่สกัดได้จากวิธีการดังกล่าวข้างต้นมักจะมีความเข้มข้นต่ำเกินไป ไม่เหมาะสมที่จะใช้ตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ดังนั้นจึงนำ crude extract ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัว 35-65 % ปั่นแยกเอาส่วนตะกอนของเอนไซม์ออกมาเพื่อนำไปใช้ทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาย้อนกลับต่อไป นำเอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 2-10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยาในสารละลายน้ำตาล ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ 30-80 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5 แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-14 วัน จากนั้นนำสารละลายปฏิกิริยาดังกล่าวมาตรวจหา โอลิโกแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ขึ้นด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (Waters 625 LC) โดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87C ที่อุณหภูมิ 85° เซลเซียส ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและตัวชะ วัดปริมาณของน้ำตาลและสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยาโดยอาศัยค่าดัชนีหักเหของแสง (refractive index) โดยใช้ refractive index detector Waters 410

2.3 ผลการทดลอง

2.3.1 การตรวจปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดพืช

ผลการตรวจหาปริมาณเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส 9 ชนิด ในเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆ โดยใช้สับสเตรทที่เป็นอนุพันธ์ของพาราไนโตรฟีนิล และตรวจวัดปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ถูกย่อยออกจากโมเลกุลของสับสเตรทด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เอนไซม์ที่ตรวจหาทั้ง 9 ชนิดได้แก่

1. เอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส (α-D-mannosidase)
2. เอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส (β-D-glucosidase)
3. เอนไซม์อัลฟา-ดี-กลูโคซิเดส (α-D-glucosidase)
4. เอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส (β-D-fucosidase)
5. เอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส (β-D-galactosidase)
6. เอนไซม์อัลฟา-ดี-กาแลคโตซิเดส (α-D-galactosidase)
7. เอนไซม์อัลฟา-ดี-อะราบิโนซิเดส (α-L-arabinosidase)
8. เอนไซม์เบต้า-ดี-เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามินิเดส (β-D-N-acetyl glucosaminidase)
9. เอนไซม์อัลฟา-แอล-ฟิวโคซิเดส (α-L-fucosidase)

โดยตรวจหาเอนไซม์ ทั้ง 9 ชนิดในเมล็ดพืชต่าง ๆ ในประเทศไทยกว่า 60 ชนิดจากตระกูลต่าง ๆ 17 ตระกูล ตารางที่ 2.2 แสดงถึงแอคติวิตี้ของเอนไซม์ 6 ชนิดที่พบมากในเมล็ดพืชที่มีระดับเอนไซม์สูงกว่า 0.1 ไมโครโมลต่อนาที ต่อกรัมเมล็ด ซึ่งผลการศึกษาพบว่ามีเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส 6 ชนิดที่พบได้มากในเมล็ดคืออัลฟา-ดี -แมนโน

ซิเดส เบต้า-ดี-เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามินิเดส อัลฟา-ดี-กาแลคโตซิเดส เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส และเบต้า-ดี-กลูโคซิเดส โดยพบปริมาณที่สูงกว่า 0.1 ไมโครโมลต่อนาทีต่อกรัมเมล็ดในเมล็ดพืช 38 species เอนไซม์ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสพบในปริมาณที่ค่อนข้างสูงในพืชตระกูลถั่ว ตัวอย่างเช่นในถั่วเหลือง ถั่วเขียว (*Glycine max, Vigna radiata* L. Wilzcek และยังพบในพืชอื่น ๆ อีกเช่นในเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth) ในเมล็ดปอและกระเจี๊ยบ พบว่ามีเอนไซม์ไกลโคซิเดสคือ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส เบต้า-ดี-กาแลคโคซิเดส เบต้า-ดี-เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส อัลฟา-ดี-กาแลคโตซิเดส และเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส และเมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) พบปริมาณเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเอนไซม์ เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส สูงมาก โดยสูงกว่าที่พบในเมล็ดพืชชนิดอื่น ๆ มากกว่าถึง 10 เท่า ในเมล็ดฉนวน พบว่ามีเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสและเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส สูงเช่นเดียวกันแต่ไม่มากเท่ากับที่พบในเมล็ดพะยูง และในเมล็ดแคฝรั่ง (*Gliricidia sepium* Steud) พบเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสสูงเช่นกันแต่ไม่พบเอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส พบว่าเอนไซม์ที่พบมากในเมล็ดพืชส่วนใหญ่คือเอนไซม์จำพวกอัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส

นอกจากการตรวจสอบเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสหลายชนิดในพืชชนิดต่างๆ แล้ว ในบางกรณียังได้สำรวจเอนไซม์ในเมล็ดพืชชนิดเดียวกันแต่สายพันธุ์ต่าง ๆ กันด้วย ตัวอย่างเช่น การศึกษาถั่วพุ่ม 3 สายพันธ์ คือ IT 1131, TVX O1F และ 81D-1007 พบว่าทั้งสามสายพันธุ์นี้จะมีระดับของ อัลฟา-และเบต้า-กาแลคโตซิเดส สูงกว่าระดับของอัลฟา-แมนโนซิเดส และ 81D-1007 มีระดับเอนไซม์ทั้งหมดต่ำกว่าสายพันธุอื่น ๆ นอกจากนั้นใน TVX 01F ยังพบเอนไซม์เบต้า-ดี-เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามินิเดสด้วย ขณะที่

TABLE 2.2 Glycosidase enzymes activities in seeds (micromol/min/g dry seeds)

BOTANICAL NAME	COMMON NAME	Alpha-D-mannosidase	Beta-D-N-acetyl glucosaminidase	Alpha-D-galactosidase	Beta-D-galactosidase	Beta-D-fucosidase	Beta-D-glucosidase
F.Araceae							
Amorphophallus campanulatus Blume	บุก	0.110	NS	0.106	NS	NS	NS
F.Caesalpinaceae (Leguminoceae)							
Afzelia xylocarpa Craib.	มะค่าโมง	NS	NS	ND	NS	NS	NS
Cassia angustifolia Vahl.	มะขามแขก	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cassia bakeriana Craib.	กัลปพฤกษ์/Pink shower	NS	NS	ND	NS	NS	NS
Cassia fistula Linn.	คูน/Golden shower	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cassia floubunda Cav.	ขี้เหล็กอเมริกา	NS	NS	ND	NS	NS	NS
Cassia garrettiana Craib.	แสมสาร	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cassia surattensis	ทรงบาดาล	0.134	NS	NS	NS	NS	NS
Delonix regia Rafin	หางนกยูงฝรั่ง/Flame Tree	NS	NS	NS	0.153	NS	NS
Deltophorum inerme Llanos.	นนทรีทอง/Yellow Flame	NS	NS	ND	NS	NS	NS
Peltophorum dasyrachis Kurz.	นนทรีป่า/Jungle Flame	0.197	NS	0.164	NS	NS	NS
Sindora siamensis Teijsm.	มะค่าแต้	NS	NS	ND	NS	NS	NS
F.Caricaceae							
Carica papaya Linn.	มะละกอ/Papaya	NS	NS	ND	NS	NS	ND

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BOTANICAL NAME	COMMON NAME	Alpha-D-mannosidase	Beta-D-N-acetyl glucosaminidase	Alpha-D-galactosidase	Beta-D-galactosidase	Beta-D-fucosidase	Beta-D-glucosidase
F.Casuarinaceae							
Casuarina equisetifolia Linn.	สนทะเล/Ironwood	NS	NS	ND	NS	NS	NS
Casuarina junghuhniana Mig.	สนประดิพัทธ์/Pine Tree	NS	NS	ND	NS	NS	0.104
F.Compositae							
Helianthus annus	ทานตะวัน/Sunflower	0.195	0.101	0.237	NS	NS	NS
F.Cucurbitaceae							
Cucumis sativus Linn.	แตงกวา/Cucumber	0.105	NS	NS	0.350	NS	NS
Cucurbita moschata (Duch.) Poir.	ฟักทอง/Pumpkin	0.149	NS	NS	0.295	NS	NS
Luffa acutangula (L.) Roxb.	บวบเหลี่ยม/Gourd	NS	NS	NS	0.168	NS	NS
Momordica charantia Linn.	มะระ/Bitter melon	NS	0.122	NS	0.226	NS	NS
F.Faboceae (Leguminoceae)							
Arachis hypogaea L.	ถั่วลิสง/Peanut	0.139	NS	NS	NS	NS	NS
Glycine max	ถั่วเหลือง/Soybean	0.529	NS	0.208	0.173	NS	NS
Vigna radiata (L.) Wilzcek	ถั่วเขียว/Mung Bean	0.425	0.106	0.150	0.178	NS	NS
Vigna sinensis L. Savlex Hassk	ถั่วพุ่ม/Cow Pea	0.333	NS	0.124	0.280	NS	NS
Vigna sinensis Saviex	ถั่วดำ/Black Bean	0.111	NS	0.192	NS	NS	NS
F.Gramineae							
Sesamum indicum L.	งาดำ/Black sesame	0.312	NS	0.267	0.120	NS	NS
Sesamum sp.	งาขาว/White sesame	0.273	NS	0.485	0.200	NS	NS

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BOTANICAL NAME	COMMON NAME	Alpha-D-mannosidase	Beta-D-N-acetyl glucosaminidase	Alpha-D-galactosidase	Beta-D-galactosidase	Beta-D-fucosidase	Beta-D-glucosidase
F.Malvaceae							
Gossypium arborium L.	ฝ้าย A-25/Cotton	0.141	NS	0.130	0.172	NS	NS
Gossypium hirsutum L.	ฝ้ายศรีสำโรง/Cotton	0.283	NS	0.229	0.277	NS	0.131
Hibiscus cannabinus L.	ปอคิวบา/Kenaf	0.488	0.153	0.266	0.318	NS	NS
Hibiscus sabdariffa L.var altissima	ปอแก้ว/Thai jute	0.822	0.353	0.388	0.922	0.170	0.213
Hibiscus sabdariffa L.var sabdariffa	กระเจี๊ยบแดง/Red sorrele	1.150	0.398	0.399	0.634	0.105	NS
F.Meliaceae							
Malia azedarach Linn.	เลี่ยน/Chinaberry	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Swietenia mahogani L.	มะฮอกกานี/Mahogany	0.276	NS	NS	0.117	0.122	0.120
F.Mimosaceae							
Acacia auriculaeformis Cunn.	กระถินณรงค์/ Wattle	0.937	0.626	0.323	0.153	NS	1.060
Acacia catechu	สีเสียดแก่น	0.557	0.555	0.612	NS	NS	NS
Acacia farnesiana Willd.	กระถินบ้าน	NS	NS	0.163	NS	NS	NS
Albizzia procera Benth.	ก่อน	1.240	0.142	NS	NS	NS	NS
Parkia speciosa Hassk.	สะตอ	NS	NS	NS	NS	NS	NS
F.Papilionaceae (Leguminoceae.)							
Dalbergia cochinchinensis Pierre	พะยูง/Blackwood	0.312	0.287	0.165	0.317	26.260	17.400
Dalbergia nigrescen Kurz.	ฉนวน	0.424	NS	NS	NS	2.279	1.183
Gliricidia sepium Steud.	แคฝรั่ง/Madre de Cocoa	0.500	0.162	0.611	0.278	1.061	NS
Sesbania grandiflora	แคบ้าน	0.370	NS	0.197	0.147	ND	NS

BOTANICAL NAME	COMMON NAME	Alpha-D-mannosidase	Beta-D-N-acetyl glucosaminidase	Alpha-D-galactosidase	Beta-D-galactosidase	Beta-D-fucosidase	Beta-D-glucosidase
F.Pinaceae							
Pinus Khasya Royle.	สนสามใบ/Pine	NS	NS	0.148	0.148	NS	NS
F.Rutaceae							
Acronychia laurifolia Blume.	ยมป่า/Indian Mahogany	0.170	0.245	NS	NS	0.201	0.137
F.Solanaceae							
Capsicum annuum L.	พริกห้วยสีทน/Chilli	0.132	0.106	NS	NS	NS	NS
F.Tiliaceae							
Corcorus capsularis L.	ปอกระเจาฝักกลม/Tossa jute	0.501	0.478	0.196	0.740	0.466	0.301
Corcorus olitrorius L.	ปอกระเจาฝักยาว/Tossa jute	0.304	0.330	0.179	0.534	0.196	0.118
F.Verbenaceae							
Gmelima arborea Roxb.	ซ้อ	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Tectona grandis Linn.f.	สัก/Teak	NS	NS	NS	NS	NS	0.220

* ND = NOT DETERMINED

** NS = NOT SIGNIFICANT (<0.100)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายพันธุ์ 81D-1007 จะมีระดับของเบต้า-กลูโคซิเดสสูงพอสมควร อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีความแตกต่างกันพอสมควรในพืชแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้น ควรที่จะหาแหล่งของเอนไซม์ในแต่ละสายพันธุ์ด้วย นอกจากนี้ยังเป็นไปได้ว่าในพืชชนิดเดียวกันอาจเป็นแหล่งที่ดีสำหรับเอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิด

นอกจากเมล็ดพืชที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ยังได้ทำการตรวจสอบหาเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสในเมล็ดผลไม้หลายชนิด ได้แก่ เมล็ดเงาะ เมล็ดทุเรียน เมล็ดมังคุด เมล็ดมะขาม เมล็ดขนุน เมล็ดน้อยหน่า แต่ไม่พบว่ามีเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสใดสูงในเมล็ดผลไม้ดังกล่าว

ในขณะที่ผลการตรวจสอบไกลโคซิเดสจากเมล็ดพืชจำพวก citrous fruits พบว่าในเมล็ดส้มเขียวหวานมีเอนไซม์ เอ็น-อะซิติล-เบต้า-กลูโคซามินิเดสในปริมาณที่สูงพอสมควรเมื่อให้พาราไนโตรฟินิลไกลโคไซด์ (p-nitrophenylglycosides) เป็นสับสเตรทในการตรวจสอบ นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสในพืชตระกูลเดียวกัน คือ ในส้มเช้ง (Sweet orange) ส้มโอ (pomelo) และมะนาว (lime) เปรียบเทียบกับในส้มเขียวหวาน (mandarin) ผลที่ได้ (ตารางที่ 2.3) ยืนยันว่าในส้มเขียวหวานมีเอนไซม์เอ็น-อะซิติล-เบต้า-กลูโคซามินิเดสสูงที่สุด แต่ระดับแอคติวิตี้ยังคงต่ำเกินกว่าที่จะนำมาแยกให้บริสุทธิ์ได้ และยังพบอัลฟา-แมนโนซิเดส และเบต้า-กลูโคซิเดสในระดับต่ำในเมล็ดพืชจำพวกนี้ด้วย จึงยังคงต้องตรวจหาแหล่งเอนไซม์เอ็น-อะซิติล-เบต้า-กลูโคซามินิเดสในพืชชนิดอื่นต่อไป

ตารางที่ 2.3 Glycosidase activities in citrous fruits

Source / Enzymes	Total activity (IU/g seeds)	Specific activity (IU/mg protein)
1. Mandarin orange		
1.1 Beta-D-N-Acetylgluco Saminidase	0.119	0.038
1.2 Alpha-D-Mannosidase	0.043	0.014
1.3 Beta-D-Galactosidase	0.015	0.005
2. Sweet orange		
2.1 Alpha-D-Mannosidase	0.083	0.048
2.2 Alpha-D-Galactosidase	0.023	0.013
2.3 Beta-D-N-Acetylgluco saminidase	0.018	0.011
2.4 Beta-D-Galactosidase	0.17	0.010
3. Pomelo		
3.1 Alpha-D-Galactosidase	0.037	0.014
3.2 Alpha-D-Mannosidase	0.034	0.013
3.3 Beta-D-Galactosidase	0.030	0.011
4. Lime		
4.1 Beta-D-Galactosidase	0.028	0.028
4.2 Alpha-D-Mannosidase	0.016	0.016
4.3 Beta-D-Mannosidase	0.011	0.011

I17997038X

2.3.2 การตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

จากการตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้ส่วนที่ตกตะกอนได้ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70 % จาก crude extract ที่สกัดได้จากเมล็ดพืชชนิดต่างๆ โดยเลือกจากเมล็ดพืชที่มีปริมาณเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งค่อนข้างสูง พบว่าเอนไซม์จาก crude extract ในเมล็ดทุกชนิดสามารถจะสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้เมื่อทำปฏิกิริยาย้อนกลับและใช้ผลิตผลที่ได้จากการสลายเป็นสับเสตรทสำหรับการสังเคราะห์ แต่ผลิตผลที่เกิดขึ้นไม่เท่ากัน แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและแหล่งที่มาของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้ตัวอย่างจากเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth) ซึ่งพบว่ามีปริมาณเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสสูงมาบ่มในปฏิกิริยาที่มีน้ำตาลแมนโนส 50 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันแล้วตรวจผลิตผลที่สังเคราะห์ได้โดยใช้เครื่องมือ High performance liquid chromatography และวัดสารที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าดัชนีการหักเหของแสงด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง (Refractive index detector) โดยใช้คอลัมน์สำหรับแยกสารที่เกิดขึ้นเป็น อะมิเน็กซ์ คอลัมน์ พบว่ามีการสังเคราะห์ ไดแซคคาไรด์ และไตรแซคคาไรด์ขึ้นดังแสดงในรูปที่ 2.1

เมื่อทดสอบเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส จากปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* L.var. altissima) โดยบ่มกับน้ำตาลดี-กาแลคโตส ที่มีความเข้มข้น 30-80 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-14 วันพบว่ามีการสร้างไดแซคคาไรด์ เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ได้จากเมล็ดถ่อน แต่ปริมาณของผลิตผลที่เกิดขึ้นจะน้อยกว่ามาก ดังแสดงในรูปที่ 2.2

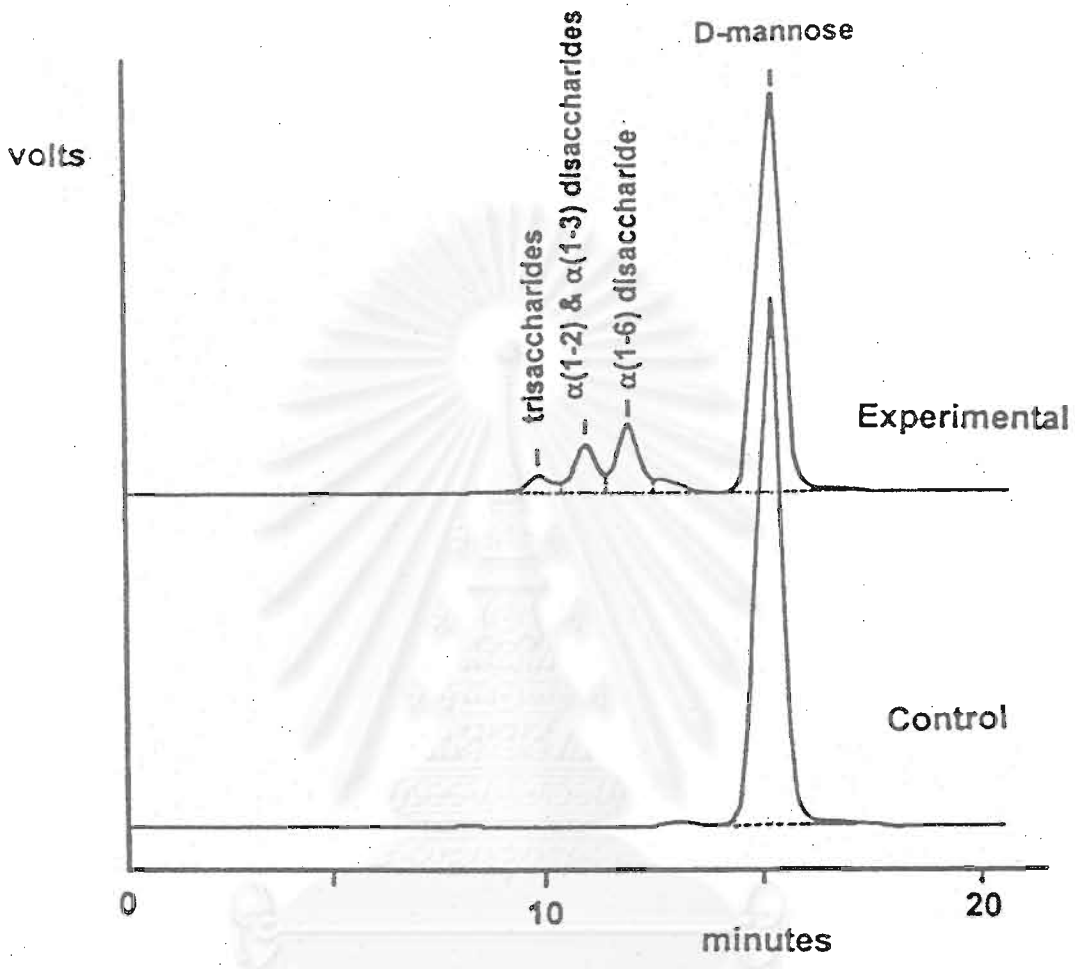


Figure 2.1 H.p.l.c analysis of the synthesis products with crude α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth. The ammonium sulfate fraction containing α-mannosidase was incubated with 50% (w/w) D-mannose at pH 5, 50 ^{o}C for 7 days. *Experimental* and *Control* show reaction mixtures incubated with and without enzyme respectively.

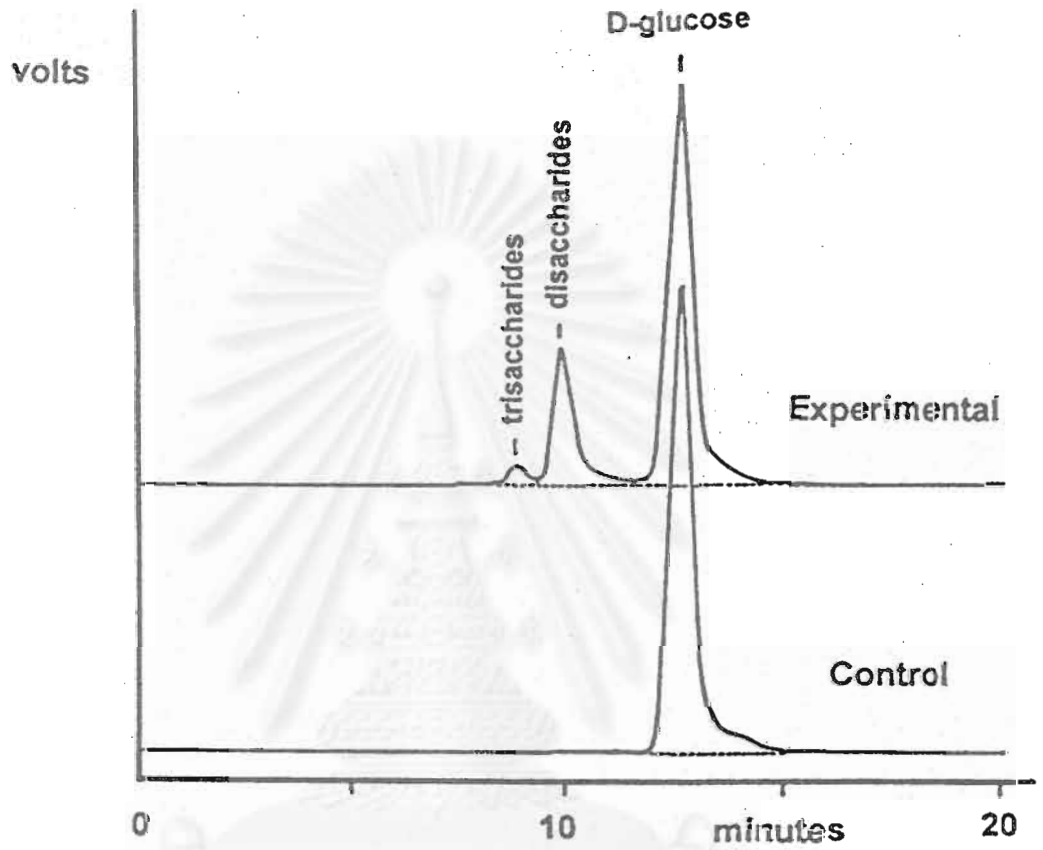


Figure 2.2 H.p.l.c analysis of the synthesis products with crude β-glucosidase and β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. The crude extract containing β-glucosidase and β-fucosidase was incubated with 50% (w/w) D-glucose at pH 5, 50°C for 7 days. *Experimental* and *Control* show reaction mixtures incubated with and without enzyme respectively.

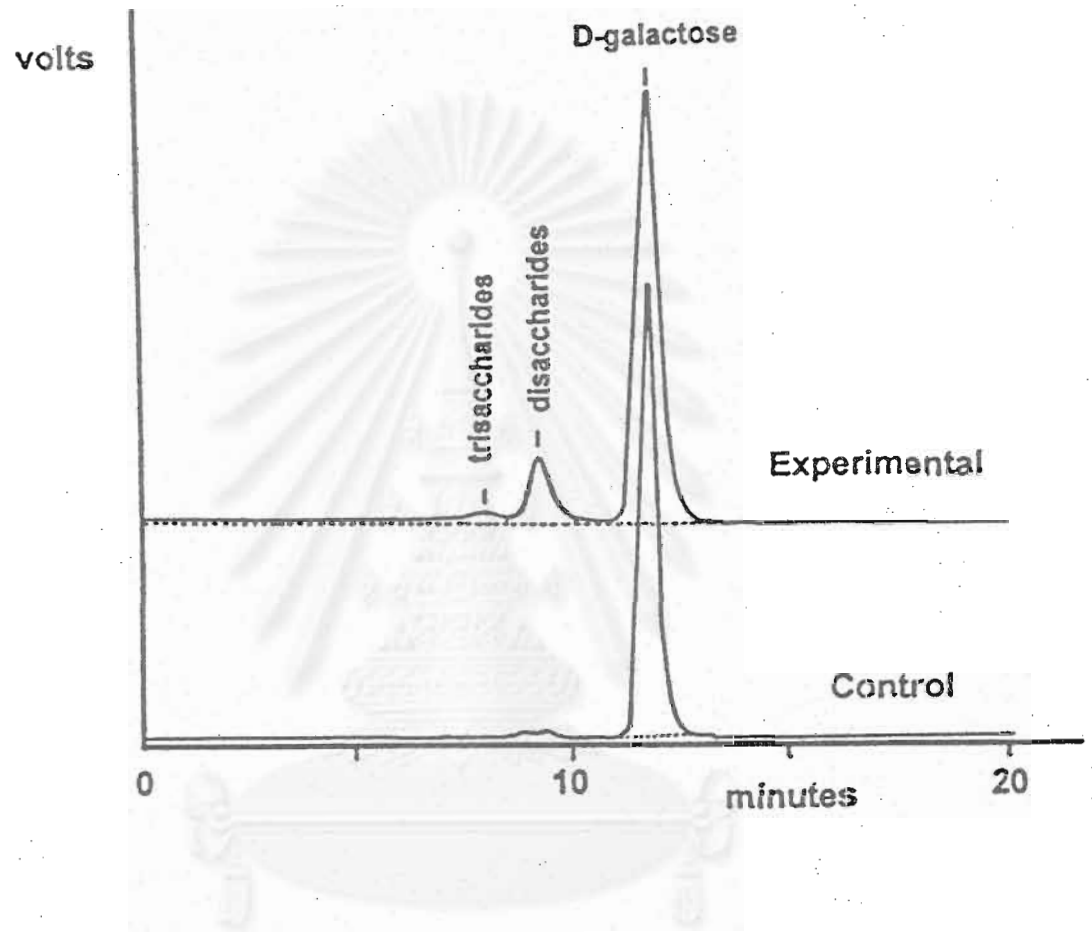


Figure 2.3 H.p.l.c analysis of the synthesis products with partially purified β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* var. *altissima*. The DEAE-celluslose fraction was incubated with 50% D-galactose at pH 5, 50°C for 7 days. *Experimental* and *Control* show reaction mixtures incubated with and without enzyme respectively.

เอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสและเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส จากเมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) จะสามารถสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์และไตรแซคคาไรด์ได้ปานกลาง เมื่อบ่มกับน้ำตาล ดี-กลูโคสที่ความเข้มข้น 30-60 เปอร์เซนต์ เป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ปริมาณผลิตผลที่เกิดขึ้นสามารถหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากเครื่อง High performance liquid chromatography จากผลการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะพบว่าโดยทั่วไปแล้ว เอนไซม์ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสจะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ได้ดีกว่าเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และดีกว่าเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส(30-60 เปอร์เซนต์ ,15-30 เปอร์เซนต์และ 10-15 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ)

2.4 บทวิจารณ์

เทคนิคการใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับเพื่อสร้างสารที่มีประโยชน์ได้มีการศึกษากันมาเป็นเวลานานแล้วโดยส่วนใหญ่จะมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการใช้เอนไซม์จำพวกไฮโดรเลส (Hydrolase) และไลเปส (lipase) เอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลสที่เป็นเอนไซม์ที่สลายสารจำพวกคาร์โบไฮเดรทก็สามารถจะทำปฏิกิริยาแบบย้อนกลับได้เช่นกัน และจากการศึกษานี้พบว่าเอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลสจากเมล็ดพืชที่พบในประเทศไทยหลายชนิด สามารถจะนำไปใช้สังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยปฏิกิริยาย้อนกลับได้ สาเหตุที่เลือกใช้เมล็ดพืชแทนที่จะใช้ส่วนอื่น ๆ ของพืชเนื่องจากเมล็ดพืชส่วนใหญ่จะต้องมีการสะสมอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรทไว้ในเมล็ดเพื่อที่จะได้เก็บไว้และเอาไปใช้เมื่อเวลาที่เมล็ดจะงอก โดยในเวลาที่เมล็ดจะงอกจะต้องมีการย่อยเอาคาร์โบไฮเดรทที่เก็บสะสมไว้ในเมล็ดนี้ไปใช้ให้พลังงานเพื่อให้เกิดการงอกของเมล็ด ดังนั้นในเมล็ดจึงควรจะเป็นแหล่งที่ดีของเอนไซม์ที่จะย่อยสารจำพวกคาร์โบไฮเดรท นอกจากนี้

การศึกษาเกี่ยวกับการตรวจสอบปริมาณของเอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลสดังกล่าวนี้ในเมล็ดพืชต่าง ๆ ยังไม่เคยมีผู้ศึกษาหรือรายงานมาก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งพืชที่พบในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษานี้ก่อนที่จะศึกษารายละเอียดของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อไป อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าปริมาณของเอนไซม์ในเมล็ดพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณต่างกันไป และแม้ในเมล็ดพืชชนิดเดียวกันก็ยังพบว่ามีปริมาณที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นกับหลายปัจจัยด้วยกันได้แก่ เวลาที่เก็บเมล็ดจากต้น เวลาที่เก็บรักษาเมล็ดไว้ ลักษณะการเก็บเมล็ดพืช สภาวะแวดล้อมของเมล็ดที่เก็บไว้ ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนคือเมล็ดพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันก็จะมีปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดมากน้อยต่างกันไปด้วย นอกจากนี้ความสามารถในการงอกของเมล็ดจะกำหนดปริมาณของเอนไซม์ในเมล็ดให้แตกต่างกันด้วย และถ้าศึกษาระดับของเอนไซม์ในระยะเวลาที่เมล็ดงอกจะพบว่าระดับของเอนไซม์จะมีการเปลี่ยนแปลงไปในขณะที่เมล็ดกำลังงอก ในการทดลองพบว่าพีเอชของสารละลายที่เหมาะสมสำหรับตรวจหาเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสในพืช จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ระหว่าง 3.5 ถึง 6.5 ถึงแม้ว่าการตรวจหาเอนไซม์ไกลโคไฮโดรเลสจะมีข้อจำกัดมากมายดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จากการศึกษานี้พบว่ามีเมล็ดพืชหลายชนิดที่มีเอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลสชนิดใดชนิดหนึ่งหรือบางทีมีถึง 2 ชนิดในเอนไซม์ที่ตรวจสอบทั้งหมด 6 ชนิด คือ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส อัลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส เบต้า-ดี-เอ็นอะซิติลกลูโคซามินิเดส สูงถึง 38 species จาก 50 species ที่ตรวจสอบทั้งหมด และพบว่าเมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) เป็นแหล่งของเอนไซม์ เบต้า-ดีกลูโคซิเดสและเบต้า -ดี-ฟิวโคซิเดสที่สูงมากเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสสามารถพบได้สูงในเมล็ดพืชหลายชนิดโดยเฉพาะในเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth) เมล็ดกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L. var sabdariffa) ส่วนเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสพบในปริมาณที่ค่อนข้างสูงในเมล็ดปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* L. var altissima) และพืชตระกูลอื่นที่ใกล้เคียง

กัน ดังนั้นพืชที่พบเอนไซม์ปริมาณสูงมากจะเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่สามารถจะนำไปแยกสกัดและศึกษาต่อไปได้ ส่วนพืชที่มีเอนไซม์ปริมาณสูงปานกลาง แต่ถ้าเป็นเมล็ดพืชที่หาง่าย สะดวก ราคาถูก มีขายในท้องตลาดทั่วไปในปริมาณมาก ก็อาจจะมีประโยชน์ในการเป็นแหล่งสกัดเอนไซม์และศึกษาคุณสมบัติต่อไปเช่นกัน เช่นเมล็ดพืชจำพวกถั่ว จะมีเอนไซม์จำพวกอัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส ปริมาณสูงพอสมควร นอกจากนี้เอนไซม์จากพืชต่างชนิดกันยังอาจมีความจำเพาะต่อพันธะ ของสารคาร์โบไฮเดรทที่ต่างกันได้ด้วย ซึ่งอาจจะมีประโยชน์ในการสังเคราะห์พันธะต่าง ๆ กันต่อไป (regiospecificity)

สำหรับการตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์สารของเอนไซม์ที่ได้พบว่ามีความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ไม่เท่ากันเมื่อศึกษาโดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับ โดยเอนไซม์จำพวกอัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสจะสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือเอนไซม์จำพวก เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และรองลงมาอีกคือเอนไซม์จำพวกเบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิดอาจช่วยเพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์ของเอนไซม์แต่ละชนิดก็ได้ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาเอนไซม์แต่ละชนิดในรายละเอียดต่อไป ซึ่งอาจรวมทั้งการพยายามทำ immobilization ของเอนไซม์ การพยายามกำจัดผลิตผลที่เกิดขึ้นใหม่ออกจากปฏิกิริยา เป็นต้น นอกจากนี้ยังควรต้องมีการศึกษาในเรื่องของการใช้น้ำตาลอื่นมาเป็นตัวรับ เพื่อสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ให้แตกต่างกัน

โดยสรุปอาจกล่าวได้ว่าจากผลการทดลองที่พบว่าสามารถใช้เมล็ดพืชที่มีอยู่ในประเทศไทยเป็นแหล่งของเอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลสได้ มีเมล็ดพืชหลายชนิดที่น่าจะทำการศึกษาในรายละเอียดต่อไป ในเรื่องของการแยก สกัด การศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของ

เอนไซม์ และปรับสภาวะของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ให้เหมาะสมในการสังเคราะห์และอาจค้นพบ
วิธีการกำหนดการสังเคราะห์ทั้งในเรื่องของคุณสมบัติของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้น เวลาที่ใช้
ในการสังเคราะห์ และปริมาณของผลผลิตที่เกิดขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเรื่องนี้ต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การเตรียมและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จากเมล็ดพะยูง

3.1 บทนำ

เอนไซม์จำพวกเบต้า-ดี-กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายพันธะไกลโคซิดิกชนิดเบต้าแล้วได้น้ำตาลกลูโคส เอนไซม์จำพวกนี้ในธรรมชาติมีหน้าที่ต่าง ๆ กันหลายอย่างด้วยกัน(25) ตัวอย่างเช่น ทำหน้าที่ย่อยสลายไซยาโนจินิกไกลโคไซด์ ได้แก่เอนไซม์ลินามาเรส(26-29) เอนไซม์ที่ย่อยเซลโลไบโอส (30) เอนไซม์ที่ย่อยเจนติโอไบโอส (31) หรือย่อยสารจำพวกฟีโนลิกไกลโคไซด์ (32) เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษาในรายละเอียดของเอนไซม์ต่าง ๆ ทำให้แยกกลุ่มออกได้อีกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ที่มีคุณสมบัติเหมือนกัน เช่น amygdalin β-glucosidase [EC 3.2.1.117](33), prunasin β- glucosidase (EC 3.2.1.118) (34) และ thioglucosidase (EC 3.2.3.1)(35)

เอนไซม์ที่ย่อยไซยาโนจีนิกไกลโคไซด์ที่เรียกว่า amygdalin พบได้ในสารสกัดจากเมล็ดอัลมอนด์ (*Prunus amygdalis*) เดิมเรียกรวม ๆ กันว่า almond emulsin พบครั้งแรกในปี 1837 ซึ่งต่อมาได้มีผู้เสนอว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วยเอนไซม์สองชนิดคือ amygdalin hydrolase และ prunasin hydrolase (36) เอนไซม์ชนิดนี้ยังพบได้ในเมล็ดของ black cherry (*Prunus perolira* L.) เอนไซม์จำพวกนี้อีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมศึกษากันมากคือ linamarase จากมันสำปะหลัง, จากเมล็ดของต้น flax, butter bean หรือ lima bean, ใบของ *Hevea brasiliensis*

เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่นคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 Relative Maximal Hydrolytic Activities (V_{max}) with Different Substrates for Linamarase from Several Sources (36)

	Linum usitatissimum seed[a]	*Manihot esculenta* petiole	*Phaseolus lunatus* seed	*Hevea brasiliensis* leaves
Linamarin	100	100	100	100
Linustatin	1.3	--	--	10^{-4}
Prunasin	140	0	51	0.25
Amygdalin	0	0	0.6[b]	$3x10^{-5}$
Dhurrin	10	--	--	$5x10^{-3}$
p-Nitrophenyl-β-D-Glc	184	441	112	36
p-Nitrophenyl--β-D-Gal	83	0	75	2

[a]Relative activities measured at 6.25 mM. [b]Activity relative to linamarin, both measured at 10 mM.

เอนไซม์จำพวก thioglycosidase ได้แก่เอนไซม์จากเมล็ดของ Cress (*Lepidium sativum* L.) ที่ชื่อว่า myrosinase สามารถจะย่อย glucosinolates (mustard oil glucosides) เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงมาก โดยเอนไซม์นี้ไม่สามารถย่อย R-amygdalin, R-prunasin, salicin, methyl-β-D-glucoside, phenyl-β-D-glucoside, gentiobiose, cellobiose, sucrose, lactose, maltose, p-aminophenyl-1-thio-β-D-glucoside, pNP-thio-β-D glucoside, pNP-β-D-galactoside, xyloside และ mannoside; N-acetylglucosaminide และ N-acetyl-galactosaminide; pNP-α-D-glucoside, galactoside และmannoside; oNP- β-D-galactoside และ xyloside เป็นต้น

เอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส (EC 3.2.1.38) ไม่พบในธรรมชาติมากเท่าเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และยังไม่มีรายงานถึงหน้าที่ที่แน่ชัด (37,38) และยังพบว่าเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส บางชนิดยังสามารถย่อยเบต้า-ดี-ฟิวโคไซด์ได้ด้วย และเอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโดซิเดสบางชนิดสามารถย่อยเบต้า-ดี-กลูโคซิเดสได้ด้วย (28) ขณะเดียวกันเอนไซม์บางชนิดจะสามารถย่อยได้แต่เฉพาะพันธะเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสได้อย่างเดียว(37)

จากการตรวจสอบหาเอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลสในเมล็ดพืชที่พบในประเทศไทยจากมากกว่า 50 species พบว่าในเมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) จะพบว่า มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และ เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสสูงมาก จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อในเรื่องของการเตรียมเอนไซม์ชนิดนี้ให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ชนิดนี้ต่อไป

3.2. วัสดุและวิธีการ

3.2.1 เมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) (รูปที่ 3.1) ได้รับความเอื้อเฟื้อจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าอาเซียน-คานาดา อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี สารเคมีที่สำคัญอื่น ๆ ได้แก่

pNP-glycosides, 4-MU-glycosides, gentobiose, cellobiose, glucono-1,5-lactone, linamarin, amygdalin, prunasin, laminarin, phloridzin, arbutin, sinigrin, p-chloromercuri benzoate, molecular weight standards สำหรับ acrylamide gel,molecular weight standards สำหรับ gel filtration chromatography, polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)และ phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) ได้จากบริษัท Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA. Sophorose ได้จากบริษัท Dextra Laboratories (Reading,UK.) และ Laminaribiose ได้จาก Seikagaku (Japan)

3.2.2 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

นำเมล็ดพะยูงมาทำความสะอาดผิวภายนอกด้วยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นทิ้งไว้ 1 คืน เมล็ดที่แช่น้ำแล้วนำมาเติม 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์พีนิลเมธิลซัลโฟนิล ฟลูออไรด์ และ 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โปลีไวนิลโปลีไพรโรลิโดน โดยใช้ปริมาตรเป็น 2 เท่าของปริมาตรเมล็ดแช่น้ำที่มีอยู่ นำไปบดให้ละเอียดในเครื่อง homogenizer นำสารละลายที่ได้จากการบดเมล็ดไปปั่นแยกตะกอนออกที่ 12,000 xg นำน้ำใสมาเติม 25 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) Dowex 2-X8 คนเบาๆ ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วดูดส่วนน้ำใสออก ส่วนน้ำใสที่ได้นี้จะเรียกว่า สารสกัดหยาบ หรือ crude extract นำสารสกัดที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนโดยใช้สารละลายอิ่มตัวของเกลือ

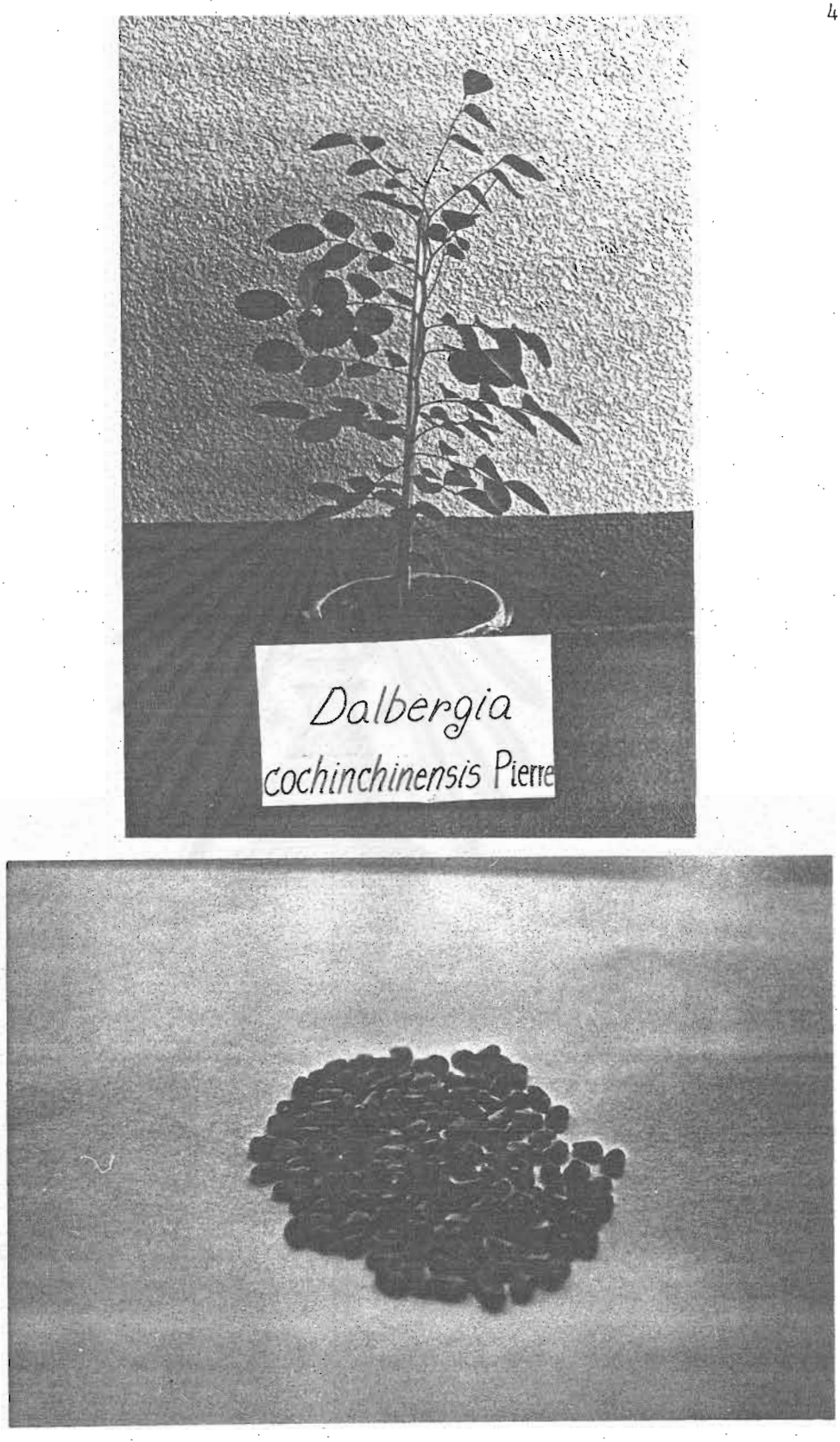


Figure 3.1 Examples of young tree and seeds of Thai Rosewood, Payung (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre)

แอมโมเนียมซัลเฟตที่ 35 เปอร์เซนต์ ปั่นแยกตะกอนทิ้งไป นำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนออกจากส่วนน้ำใส เทน้ำใสทิ้งไป นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์, พีเอช 5.0 และนำไป dialyse ค้างคืนกับน้ำกลั่นเพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกไป เปลี่ยนน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จากนั้นนำไปแยกต่อโดยใช้วิธี preparative isoelectric focusing โดยใช้เครื่อง Rotofor apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A) ใช้ 2 เปอร์เซนต์ แอมโฟไลต์ (ที่มี อัตราส่วนพีเอช 4-6 : พีเอช 3-10 เป็น 5:1) แยกด้วยกระแสไฟฟ้า 12 วัตต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บส่วนที่แยกได้มาตรวจสอบหาปริมาณโปรตีน และแอคติวิตี้ของเอนไซม์ นำส่วนที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสมารวมกันแล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธี ultrafiltration จากนั้นนำไปแยกต่อโดยใช้วิธีเจล-โครมาโตกราฟฟี ในคอลัมม์ขนาด 2.5 ซม.x 80 ซม. โดยใช้ตัวแยกเป็น Sephadex G-150 ที่อยู่ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ที่มี 0.1 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ใช้อัตราการไหลของสารละลาย 21 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากคอลัมน์ไปตรวจสอบปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส นำส่วนที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสและเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสมารวมกันแล้วนำไป dialyse กับน้ำกลั่น นำไปทำให้แห้ง (lyophilize) จะได้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่สามารถเก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อ ๆ ไป

3.2.3 การวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยวิธีมาตรฐาน

ตรวจวัดปริมาณของเอนไซม์ โดยตรวจสอบความสามารถในการย่อยสารพาราไนโตรฟีนิลไกลโคไซด์ ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์, พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 10 นาที (ใช้ pNP-β-D-glucoside เป็นสับสเตรทสำหรับตรวจวัดเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และใช้ pNP-β-D-fucoside เป็นสับสเตรทสำหรับวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ฟิวโคซิ

เดส) ตรวจวัดผลิตผลของการย่อยคือ พาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้น โดยการวัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร (24) คำนวณปริมาณผลิตผลที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐานของสารละลายไนโตรฟีนอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

3.2.4 การหาปริมาณโปรตีน

หาปริมาณโปรตีนใช้วิธี Coomassie Blue dye binding โดยใช้น้ำยาของบริษัท Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A ส่วนการหาปริมาณโปรตีนในส่วนต่าง ๆ ที่แยกได้จากคอลัมน์จะตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยการวัดปริมาณการดูดแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร

3.2.5 การศึกษาทางจลนศาสตร์

ทำการศึกษาจลนศาสตร์ ตรวจสอบหาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ต่อสารพาราไนโตรฟีนิลไกลโคไซด์ ชนิดต่าง ๆ กันโดยใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทต่าง ๆ กัน วัดผลิตผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโมเมตร วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้ด้วยคอมพิวเตอร์โปรแกรม เอนซ์ฟิตเตอร์ (Enzfitter) ของ Elsevier Biosoft (Cambridge, U.K) ใช้ทั้งวิธีสมการถดถอยแบบไม่เป็นเส้นตรง (non-linear regression) และสมการถดถอยแบบเส้นตรง (linear regression)

3.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยไกลโคไซด์อื่นที่พบในธรรมชาติ

การตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์บริสุทธิ์ต่อสับสเตรทที่พบในธรรมชาติที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทำโดยตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยได้ โดยใช้ชุดตรวจปริมาณน้ำตาลกลูโคส (glucose oxidase kit, BM Laboratories, Bangkok, Thailand) ส่วนการตรวจสอบความสามารถ

ของเอนไซม์บริสุทธิ์ในการย่อยไซยาโนจีนิก ไกลโคไซด์ทำโดยการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นและตรวจวัดปริมาณไฮโดรเจนไซยาไนด์ที่เกิดขึ้น โดยจับไฮโดรเจนไซยาไนด์ที่เกิดขึ้นด้วยกรดพิคริก (28) การวัดความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรทสายยาวที่พบในธรรมชาติคือ Laminarin และ Pustulan ทำโดยการวัดน้ำตาลรีดิวส์ที่เกิดขึ้นด้วยสารพาราไฮดรอกซีเบนโซอิกไฮดราไซด์ (p-hydroxy benzoic hydrazide) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับน้ำตาลรีดิวส์ให้สีเหลืองแล้ววัดด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร (39)

3.2.7 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้โดยใช้ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีของ Laemmli (40) ใช้ 3 เปอร์เซนต์ acrylamide stacking gel และ 7.5 เปอร์เซนต์ acrylamide separating gel (7.5 x5.0 ซม.) น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์ในสภาพเสียสภาพธรรมชาติ (denatured state) คำนวณจากการแยกด้วย เจลอิเลคโตรโฟริสิสนี้ โดยใช้สารมาตรฐาน คือ rabbit muscle myosin (205 kD) , E coli β-galactosidase (116 kD), rabbit muscle phosphorylase b (97.4 kD) bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD) และcarbonic anhydrase (29 kD) นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติ (non-denaturation) โดยการใช้วิธีอิเลคโตรโฟริสิสใน 5 เปอร์เซนต์ polyacrylamide slab gel (41) แล้วย้อมสีด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R-250 และย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์ด้วย 4-MU-glycosides ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์, พีเอช 5.0

3.2.8 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

หาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยใช้วิธีเจล-ฟิลเตรชั่นโครมาโตกราฟฟี ในคอลัมน์ของ Sephacryl S-200 ขนาด 1.8x 90 ซม. ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟต พีเอช 7.0 ที่มี 0.2 โมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ สารมาตรฐานที่ใช้ในการหาค่าน้ำหนักโมเลกุลคือ เอนไซม์ เบต้า-อะมิเลส (200 kD) โบไวน์ ซีรัม อัลบูมิน (66 kD) โอวัลบูมิน (45 kD) และไซโตโครมซี (12.4 kD)

3.2.9 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์มาตรวจสอบแอคติวิตี้ในการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ คือ p-NP-β-D-กลูโคไซด์ และ pNP-β-D-ฟิวโคไซด์ ในสารละลาย McIlvaine บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ที่ พีเอชต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 10 นาที ตรวจวัดพาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร

3.2.10 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาตรวจสอบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยใช้การตรวจสอบแอคติวิตี้ ตามวิธีการมาตรฐานที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 30°ซ 37°ซ 40°ซ 50°ซ 55°ซ 60°ซ และ 70°ซ ตามลำดับ ตรวจวัดพาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตร- โฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

3.2.11 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้มาเก็บไว้ในลักษณะต่าง ๆ กัน คือเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30-35°ซ) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ เก็บด้วยวิธีทำให้แห้ง (lyophilization)

เก็บในสารละลายอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, เก็บในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 และเก็บไว้ที่ -20°ซ เก็บในน้ำกลั่น และเก็บไว้ที่ -20°ซ ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 แล้วนำมาตรวจสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ในเวลาต่าง ๆ กันโดยตรวจวัดแอคติวิตี้ด้วยวิธีมาตรฐาน

3.2.12 การวิเคราะห์ความจำเพาะของการสลายพันธะไกลโคซิดิก

นำเอนไซม์บริสุทธิ์มาทำปฏิกิริยาในการสลายพันธะไกลโคซิดิกต่าง ๆ ทั้งพันธะเบต้า 1,2 เบต้า 1,3 เบต้า 1,4 และเบต้า 1,6 แล้วตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (Waters 625 LC) โดยใช้คอลัมน์เป็น Aminex HPX-87 C ที่ 85° ซ โดยใช้น้ำเป็นตัวชะและตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นโดยการวัดดัชนีการหักเหของแสง (refractive index detector, Waters 410) คำนวณปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากพื้นที่ใต้กราฟ

3.2.13 การตรวจสอบไอโซเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์มาย่อยสับสเตรทคือ 5 มิลลิโมลาร์ pNP-β-D-glucoside ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 3 วินาที หยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยการแช่เอนไซม์ให้แข็งทันทีในไนโตรเจนเหลว นำไปตรวจสอบน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยการทำเป็นอนุพันธ์ของกลูโคส วิเคราะห์ผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง gas-liquid chromatograply เทียบผลิตผลที่เกิดขึ้นกับสารละลายมาตรฐาน

3.2.14 การศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์

ศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วยวิธีทางจลนศาสตร์ และการใช้ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คือ Conduritol B epoxide กับเอนไซม์บริสุทธิ์ ทำโดยความร่วมมือกับ Professor Seiya Chiba, Department of Applied Bioscience และ Associate Professor Hirokazu Matsui, Department of Bioscience and Biochemistry, Faculty of Agriculture, University of Hokkaido, ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้โครงการความช่วยเหลือ NRCT-JSPS

3.3. ผลการทดลอง

3.3.1 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

จากผลการตรวจสอบเอนไซม์จากเมล็ดพืชชนิดต่าง ๆที่พบในประเทศไทย เมล็ดพะยูง เป็นเมล็ดพืชยืนต้นที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย พบว่าเมล็ดพืชชนิดนี้มีเอนไซม์ เบต้า-ดี- กลูโคซิเดส และเอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสในปริมาณที่สูงมาก (17.4 และ 26.3 หน่วยเอนไซม์ต่อกรัมเมล็ด ตามลำดับ) และแอคติวิตี้ของทั้งสองเอนไซม์นี้จะพบคู่กันเช่นนี้เสมอตลอดการทดลองทั้งหมด จากการแยกเอนไซม์ออกจากสารสกัดหยาบหรือcrude extractด้วยการตกตะกอน โดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวพบว่า เอนไซม์นี้สามารถแยกได้โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75 % ผลการแยกเอนไซม์โดยวิธีการ Preparative isoelectric focusing ด้วยเครื่อง Rotofor ดังแสดงในรูปที่ 3.2 เอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้ต่อสับสเตรททั้ง pNP-glucoside และ pNP-fucoside จะออกมาที่ตำแหน่งเดียวกัน คือที่ตำแหน่งของค่าไอโซอิเลคตริกพีเอช (pI) เป็น 5.6 ลักษณะของแถบโปรตีนที่แยกได้ค่อนข้างสูงและกว้างไม่เห็นตำแหน่งโปรตีนชัดเจน เนื่องจากใช้วิธีการตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งนอกจากจะอ่านค่าโปรตีนแล้วยังอ่านค่าของวัตถุอื่นที่มีเจือปนอยู่ได้ด้วย ทำให้มีการรบกวนจากรงควัตถุที่มีสี จากรูปที่ 3.3 จะเห็นว่าหลอดที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเบต้า-ดี-ฟิว

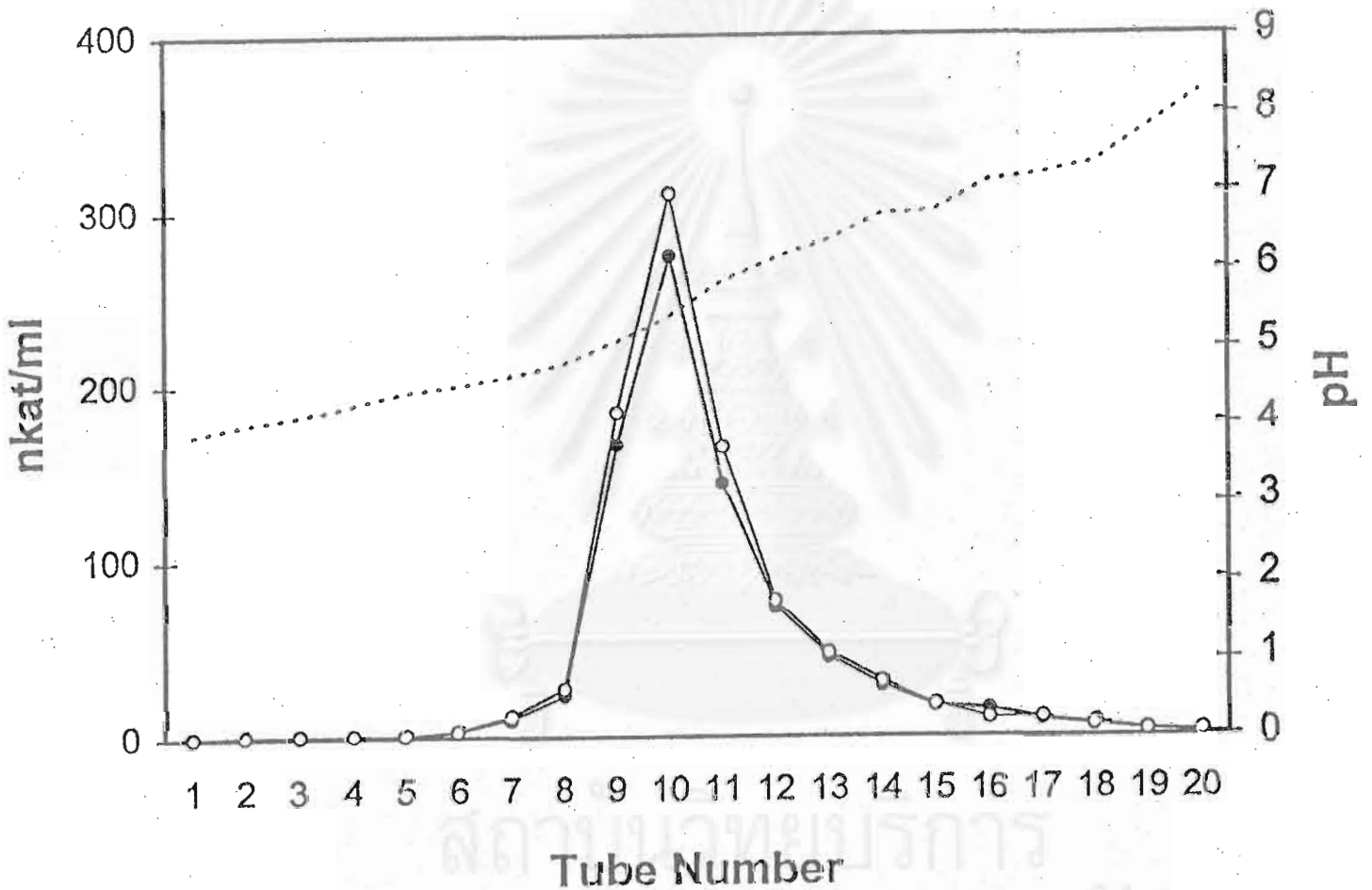


Figure 3.2 Isoelectric focusing of the dialyzed 35-75 % ammonium sulfate precipitate from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Isoelectric focusing was performed in a Rotofor apparatus using 2% ampholyte (with ratio pH 4-6: pH 3-10 of 5:1) for 4 h at 12 W. Tubes 8-14 were pooled for further purification. ●—● β-Glucosidase activity (nkat/ml); ○—○ β-fucosidase activity (nkat/ml); ----- pH.

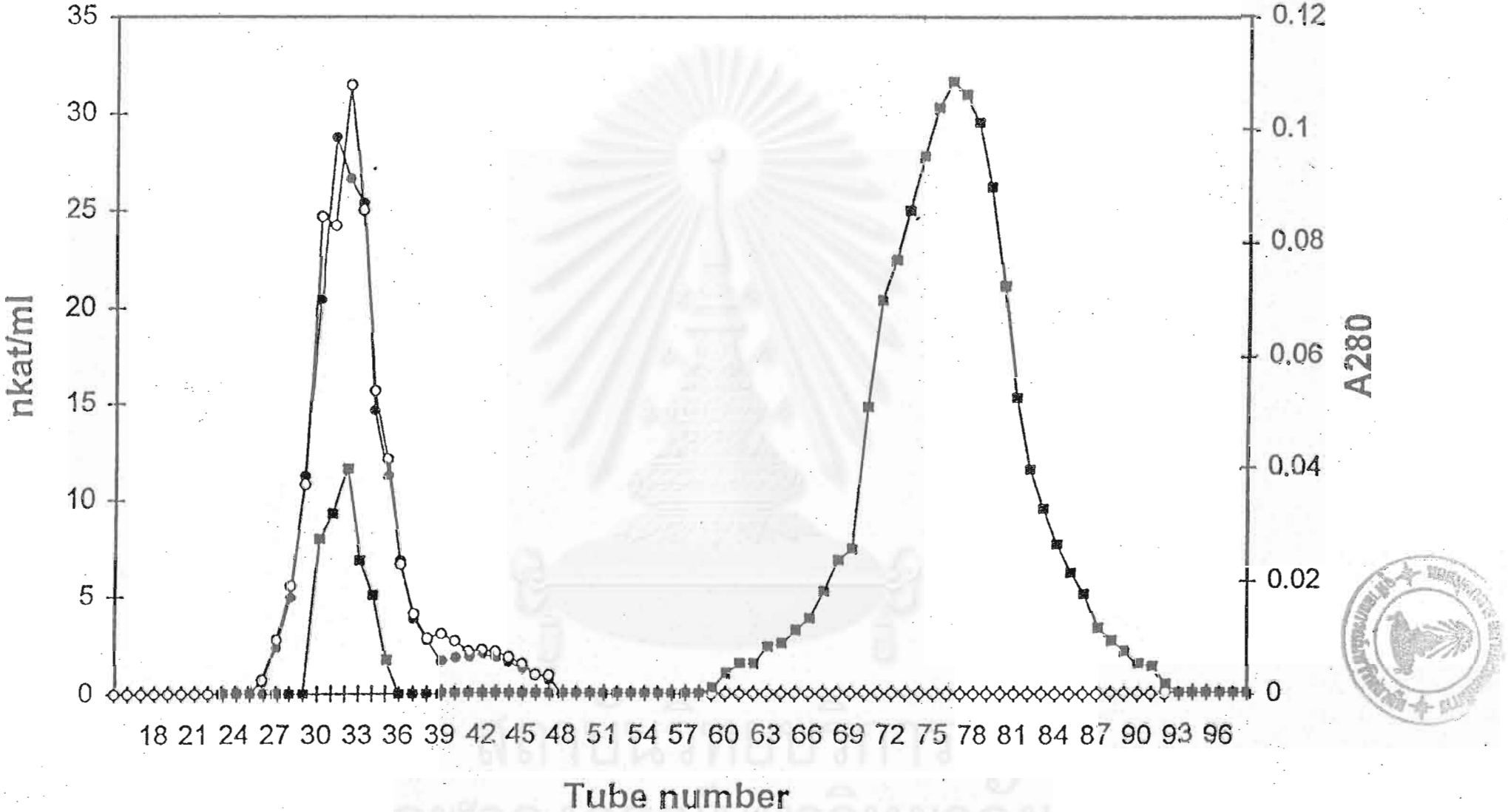


Figure 3.3 Sephadex G-150 chromatography of the isoelectric focusing pool from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme containing fractions from isoelectric focusing (Figure 3.2) were concentrated by ultrafiltration and subjected to chromatography in a Sephadex G-150 column (2.5 cm x 80 cm), equilibrated with 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 0.1 M NaCl at a flow rate of 21 ml/h. Tubes 26-38 pooled, dialyzed, and lyophilized. ●—● β-Glucosidase activity (nkat/ml); ○—○ β-fucosidase activity (nkat/ml); ■—■ A_{280}.

โคซิเดสอยู่ที่ตำแหน่งของหลอดที่ 8-14 จึงนำสารละลายจากหลอดที่ 8 ถึง 14 มารวมกัน นำไปเพิ่มความเข้มข้นและลดปริมาตรด้วยวิธี ultrafiltration ให้เหลือปริมาตรของสารละลายประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแยกต่อด้วยวิธี เจล ฟิวเตรชั่น โครมาโตกราฟฟีในคอลัมน์ที่มี Sephadex G-150 บรรจุอยู่ ทั้งเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสยังคงออกมาจากคอลัมน์ที่ตำแหน่งเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.3 โดยเอนไซม์ที่ต้องการแยกจะออกมาก่อนใกล้เคียงกับปริมาตรของ void volume และห่างจากโปรตีนส่วนใหญ่ชนิดอื่น ๆที่จะออกมาภายหลังจึงนำสารละลายจากหลอดที่ 26-38 (จากรูปที่ 3.3) มารวมกัน นำไปทำ dialysis กับน้ำกลั่น แล้วเก็บด้วยการทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization ผลการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 3.2 จะเห็นได้ว่าค่าความสามารถในการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (fold of purification) และค่า % yield ของทั้งเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส มีค่าเท่ากันในทุกขั้นตอนของการแยกโดยจะพบว่ามี % yield เป็น 30 เปอร์เซนต์ ซึ่งจากการที่ในเมล็ดพะยูงมีแอคติวิตี้ของทั้งเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส สูงมากคิดเป็น 250-350 nkats ต่อกรัมเมล็ด ทำให้สามารถแยกสกัดเอนไซม์ได้ประมาณ 1 มิลลิกรัมของเอนไซม์โปรตีนทั้งหมดจากเมล็ดพะยูง 1 กรัม

3.3.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้และการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

จากการนำเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าเมื่อย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R จะพบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวบนแผ่นเจล โดยมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66,000 ดาลตัน ดังแสดงในรูปที่ 3.4a แต่เมื่อนำโปรตีนชนิดนี้ไปตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลโดยการแยกด้วยเจล โครมาโตกราฟฟีบนคอลัมน์ Sephacryl S-200 เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของสภาพธรรมชาติของเอนไซม์พบว่าจะมีน้ำหนักโมเลกุล

Table 3.2 **Purification of β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre**

Fraction	Total activity (nkat)	Total protein (mg)	Specific activity (nkat/mg)	Purification fold	Yield %
Crude Extract					
β-Glucosidase	2,633	40.5	65.0	1.00	100
β-Fucosidase	3,167	40.5	78.2	1.00	100
35-75% Ammonium sulfate					
β-D-Glucosidase	1,750	17.5	100.0	1.54	66.5
β-D-Fucosidase	2,017	17.5	115.3	1.47	63.7
Rotofor isoelectric focusing					
β-D-Glucosidase	1,117	11.4	98.0	1.51	42.4
β-D-Fucosidase	1,333	11.4	116.9	1.49	42.1
Amicon ultrafiltration					
β-D-Glucosidase	1,183	9.45	125.2	1.93	44.9
β-D-Fucosidase	1,383	9.45	146.3	1.87	43.7
Sephadex G-150					
β-D-Glucosidase	800	1.00	800	12.3	30.4
β-D-Fucosidase	1,033	1.00	1,033	13.2	32.6

Ten g of seeds were used for purification , and assays were performed with 1 mM p-NP-β-D-glucoside or 1mM p-NP-β-D-fucoside at pH 5.0 and 30°C.

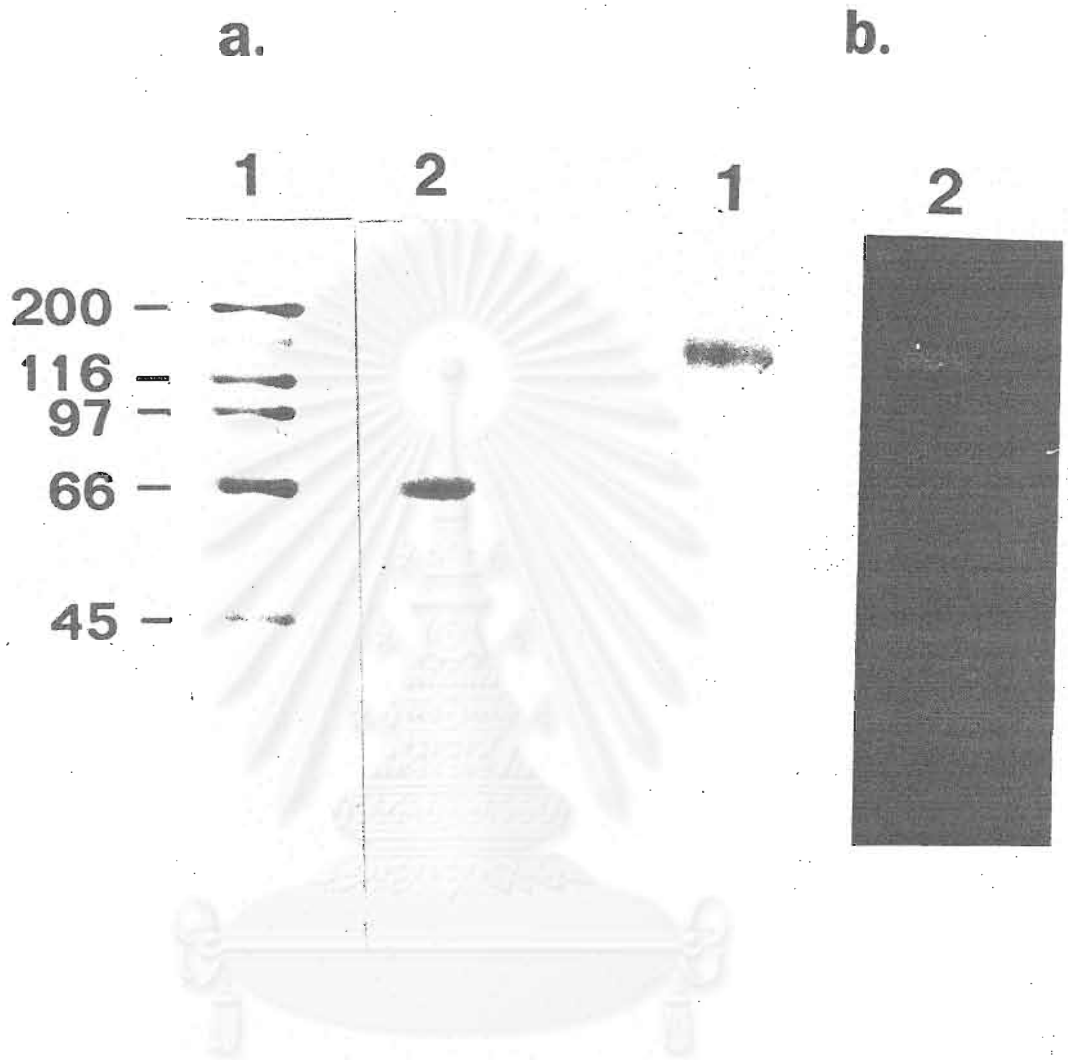


Figure 3.4 Electrophoresis of purified β-glucosidase / β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. *a.* SDS-PAGE with protein stain: *1*: molecular weight markers; *2*: purified enzyme (10 μg); *b.* Non-denaturing gel of purified enzyme: *1*: 2.4 μg enzyme stained for protein; *2*: 2.4 μg enzyme stained for β-glucosidase activity.

ประมาณ 330,000 ดาลตัน ดังนั้นจึงเชื่อว่าในสภาพธรรมชาติ เอนไซม์จะประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 4-6 หน่วยโดยมีน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยเป็น 66,000 ดาลตัน ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยนี้มีค่าใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสที่ย่อยไซยาโนจีนิก ไกลโคไซด์ เช่นเอนไซม์ลินามาเลสในหัวมันสำปะหลังมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเป็น 59,000 ถึง 65,000 ดาลตัน (26-29) แต่ในสภาพธรรมชาติลินามาเรสมีหน่วยย่อยในพืชแต่ละชนิดต่าง ๆ กันไป เช่นใน butter bean ประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย ในเมล็ด flax ประกอบด้วยหน่วยย่อย 10 หน่วย และในมันสำปะหลังเองพบทั้ง 4,6,8,10 และมากกว่า 10 หน่วยย่อยของเอนไซม์ที่พบในสภาพธรรมชาติ (42)

เมื่อนำเอนไซม์ที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ด้วยการแยกด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริสิสในสภาพธรรมชาติ (non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis) ดังแสดงในรูปที่ 3.4b พบว่าเมื่อย้อมโปรตีนด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R 250 แสดงเป็นแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวบนแผ่นเจล และเมื่อย้อมด้วย 4-MU-β-D-glucoside ก็ยังพบเป็นแถบสว่างแถบเดียวบนแผ่นเจลที่ตำแหน่งเดียวกับที่ย้อมโปรตีน แสดงว่ามีเอนไซม์อยู่ชนิดเดียว นอกจากนี้เมื่อย้อมด้วย 4-MU-β-D-fucoside ตรวจพบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส อยู่ร่วมกับแอคติวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดสเสมอ แสดงว่าอาจเป็นเอนไซม์ตัวเดียวกันที่สามารถย่อยได้ทั้งสองสับสเตรท นอกจากนี้เมื่อย้อมด้วย 4-MU-β-D-galactoside และ 4-MU-α-L-arabinoside ก็พบแถบสว่างอยู่ที่ตำแหน่งเดิมบนแผ่นเจลทั้งสิ้น ดังนั้นแสดงว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์มากและมีเอนไซม์โมเลกุลชนิดเดียวซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ทั้ง 4-MU-β-D-glucoside, 4 MU-β-D-fucoside, 4-MU-β-D-galactoside และ 4-MU-α-L-arabinoside (ดังแสดงในรูปที่ 3.5)

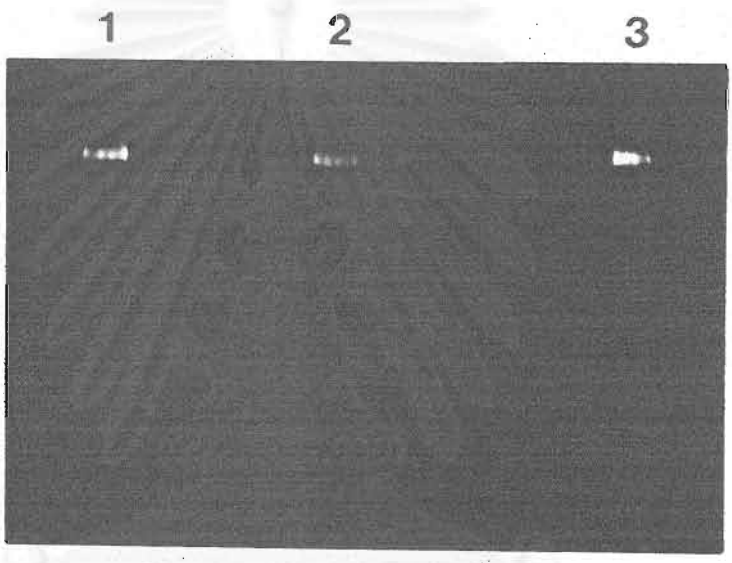


Fig. 3.5 Non-denaturing electrophoresis of purified β-glucosidase / β-fucosidase followed by activity staining. *1*: 1.2 μg enzyme stained with 4-MU-β-D-fucoside; *2*: 36 μg enzyme stained for 4-MU-β-D-galactoside; *3*: 36 μg enzyme stained for 4-MU-α-L-arabinoside.

3.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์

จากการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสและ เอนไซม์เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส ที่เตรียมได้บริสุทธิ์พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีค่า pH ที่เหมาะสมกับการทำงานที่เท่ากันคือ ที่ pH 5.0 และมี pH profile เหมือนกันอีกด้วย ดังแสดงในรูปที่ 3.6

3.3.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อย pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside ที่อุณหภูมิเดียวกันคือที่อุณหภูมิ 60°ซ และมี temperature profile เหมือนกันดังแสดงในรูปที่ 3.7

3.3.5 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

จากการศึกษาทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่า มีค่าทางจลนศาสตร์ต่อสับสเตรทต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3.3 โดยค่า k_{cat} ในตารางคิดต่อหน่วยย่อยของเอนไซม์ ถ้าคิดจากสภาพเอนไซม์โมเลกุลในธรรมชาติควรมีค่าเพิ่มขึ้น 5 เท่า จะพบว่าเอนไซม์มีค่า K_m และ k_{cat} สำหรับ pNP-β-D-glucoside สูงกว่าค่า K_m และ k_{cat} สำหรับ pNP-β-D-fucoside แต่ pNP-β-fucoside มีค่า k_{cat}/K_m สูงกว่าสับเสตรทที่เป็น pNP-glycoside อื่น ค่า k_{cat}/K_m สำหรับ pNP-β-D-fucoside ที่สูงนั้นเกิดจากการที่เอนไซม์นี้มีค่า K_m ต่อสับสเตรทที่เป็น pNP-β-D-fucoside ต่ำกว่าค่า K_m ต่อ pNP-β-D-glucoside 10 เท่า คือ K_m = 0.54 มิลลิโมลาร์เมื่อเทียบกับ K_m= 5.37 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า K_m สำหรับ pNP-β-D-xyloside และ pNP-α-L-arabinoside มีค่าประมาณ 1-2.5 มิลลิ

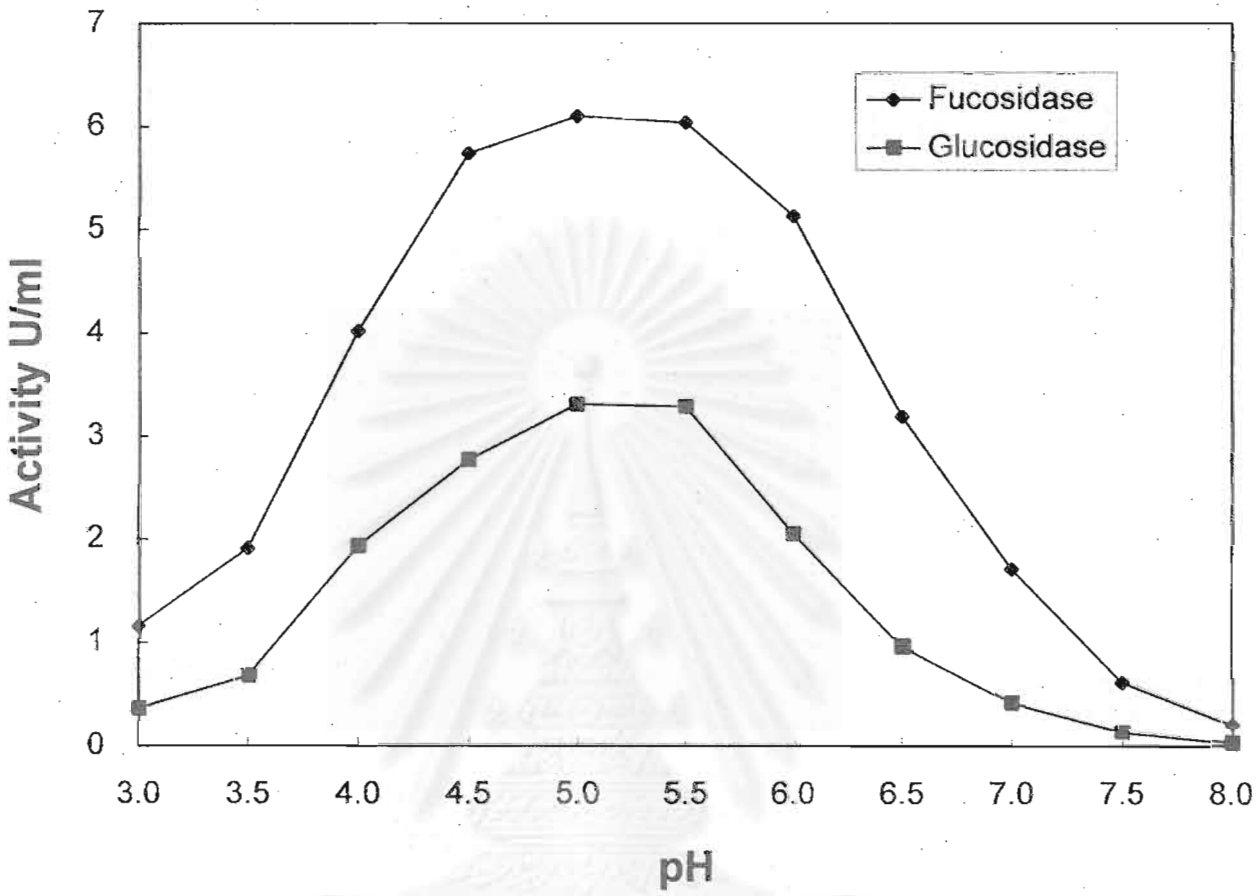


Figure 3.6 pH profile of β-glucosidase (■) and β-fucosidase (◆) from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

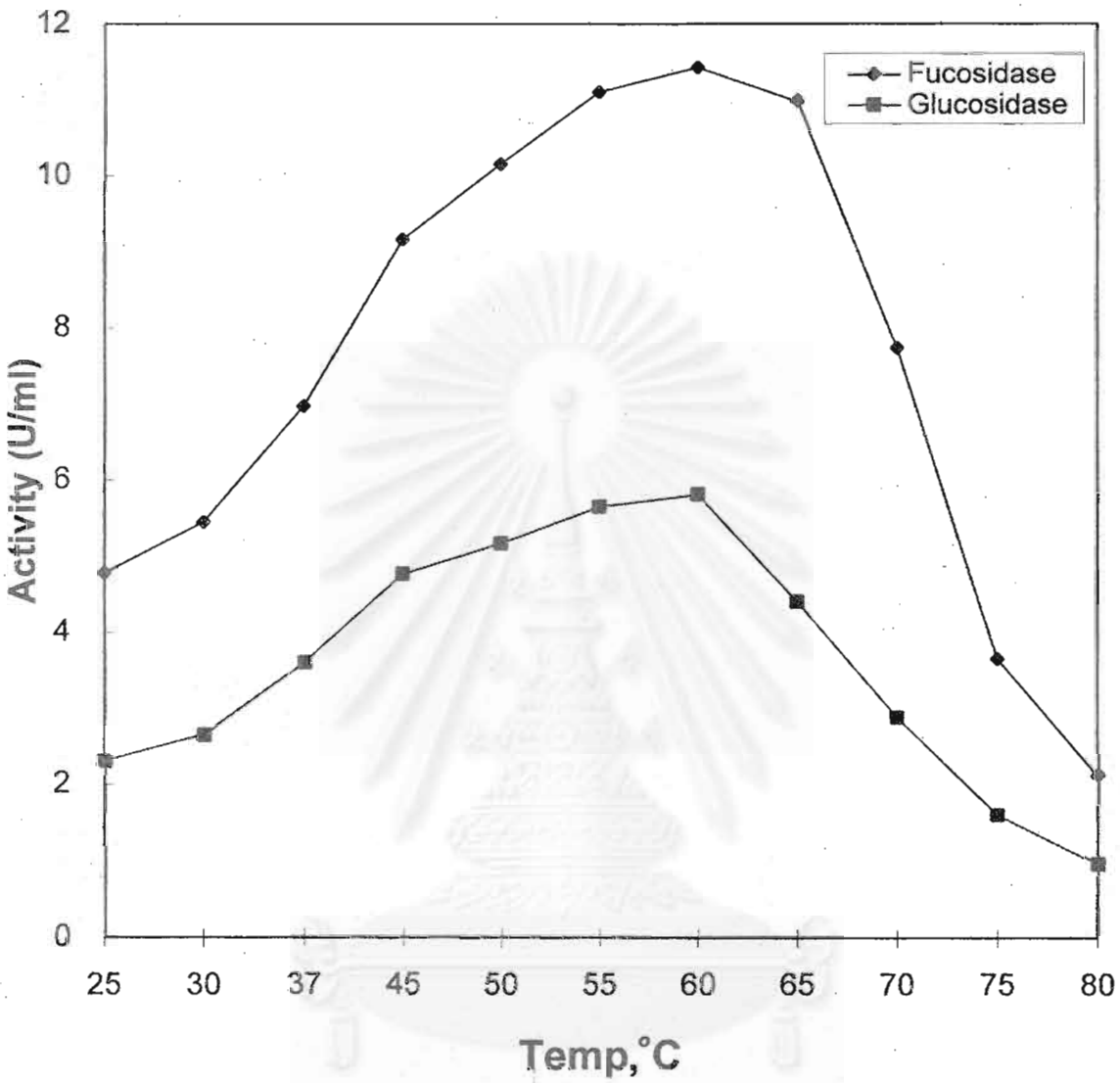


Figure 3.7 Temperature profile of β-glucosidase (■) and β-fucosidase (◆) from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre for hydrolysis of pNP-β-D-glucoside.

Table 3.3 **Kinetic properties of β-glucosidase/ β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre**

Substrate	K_m mM	k_{cat} sec^{-1}	k_{cat}/K_m $M^{-1}.sec^{-1}$
p-NP-β-D-glucoside	5.37 ± 0.09	307 ± 4.6	57,300
p-NP-β-D-fucoside	0.54 ± 0.04	151 ± 3.0	283,100
p-NP-β-D-galactoside	14.58 ± 0.71	44 ± 0.8	3,000
p-NP-α-L-arabinoside	1.00 ± 0.03	6.8 ± 0.04	6,900
p-NP-β-D-xyloside	2.45 ± 0.14	1.8 ± 0.04	730

Assays were performed in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 at 30°C. k_{cat} was estimated assuming a subunit molecular weight of 66,000 daltons.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โมลาร์ คือเป็นค่าที่อยู่ระหว่างค่า Km สำหรับ pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside และเอนไซม์มีค่า K_m สำหรับ pNP-β-D-galactoside สูงที่สุดคือ 14.58 มิลลิโมลาร์

3.3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยของเอนไซม์บริสุทธิ์ โดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ตรวจสอบความสามารถในการย่อยด้วยวิธีมาตรฐาน โดยใช้สับสเตรทต่าง ๆ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3.4 จากผลการศึกษาพบว่าถ้าให้แอคติวิตี้ของเอนไซม์ในการย่อย pNP-β-D-glucoside เป็น 100 เปอร์เซนต์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตี้ต่อ pNP-β-D-fucoside ดีกว่าต่อ pNP-β-D-glucoside ในความเข้มข้นที่ใช้ เอนไซม์บริสุทธิ์นี้สามารถย่อย pNP-β-D-galactoside, pNP-β-D-xyloside, pNP-α-L-arabinoside และ pheny l-β-D-glucoside ได้บ้าง คิดเป็น 8.95, 3.91, 4.89, และ 5.00 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ส่วนสับสเตรทอื่นได้แก่ pNP-β-D-mannoside, pNP-β-L-fucoside, pNP-α-D-glucoside, pNP-α-D-galactoside, pNP-α-D-mannoside, pNP-α-L- fucoside, pNP-β-D-maltoside, pNP-β-D-thioglucoside, pNP-β-D-thiofucoside และ methyl-β-D-glucoside ถูกย่อยด้วยเอนไซม์นี้ได้น้อยมากคือ น้อยกว่า 1 เปอร์เซนต์

3.3.7 การตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยไกลโคไซด์อื่นที่พบในธรรมชาติ

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยไกลโคไซด์อื่นที่พบในธรรมชาติ โดยการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ย่อยได้แสดงในตารางที่ 3.5 พบว่าสามารถย่อยไกลโคไซด์อื่นที่พบในธรรมชาติได้บ้าง แต่อัตราการย่อยต่ำมากเมื่อเทียบกับการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์ของสารพาราไนโตรฟีนอล เอนไซม์สลายไดแซคคาไรด์ที่เป็นเซลโลไบโอสได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไดแซคคาไรด์อื่น คือ โซโฟโรส ลามินาริไบโอส และเจนติโอไบโอส เอนไซม์สามารถย่อยสลายสารจำพวกไซนาโนจีนิกไกลโคไซด์ เช่น ลินามาริน (linamarin) และพรูนาซิน (prunasin) ได้น้อยมากหรือแทบจะไม่มี

Table 3.4 **Hydrolysis of synthetic substrates by β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre**

Substrate	Relative activity
p-NP-β-D-glucoside	100.0
p-NP-β-D-fucoside	124.1
p-NP-β-D-galactoside	8.95
p-NP-β-D-mannoside	0.26
p-NP-β-D-xyloside	3.91
p-NP-β-L-fucoside	0.05
p-NP-α-D-glucoside	0.18
p-NP-α-D-galactoside	0.03
p-NP-α-D-mannoside	0.36
p-NP-α-L-arabinoside	4.89
p-NP-α-L-fucoside	0.08
p-NP-β-D-maltoside	0.21
p-NP-β-D-thioglucoside	0.02
p-NP-β-D-thiofucoside	0.03
methyl-β-D-glucoside	0.18
phenyl-β-D-glucoside	5.00

Reactions employed 5 mM glycosides in 0.1 M sodium acetate, pH 5.0 at 30°C. p-Nitrophenol was quantitated, except with the methyl- and phenyl-glucosides, where glucose was measured.

Table 3.5 **Hydrolysis of Natural Substrates by β-Glucosidase/ β-Fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre**

Substrate	**Relative activity***
p-NP-β-D-glucoside (control)	100.0
sophorose [β1-2]	0.39
laminaribiose [β1-3]	0.34
cellobiose [β1-4]	0.06
gentiobiose [β1-6]	0.29
linamarin	<0.05
prunasin	<0.1
amygdalin	4.55
salicin	3.75
phloridzin	<0.05
arbutin	1.15
sinigrin	0.86
laminarin	<0.05

Reactions employed 5 mM substrates in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 at 30°C for 30 min, and glucose release was measured. With laminarin (5mg/ml), reducing equivalents were measured

การสลายเลย แต่สามารถสลายอะมิกดาลิน(amygdalin)ได้บ้าง อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบการสลายอะมิกดาลิน ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography พบว่า ผลิตผลจากการสลายเป็นกลูโคสและพรูนาซิน และเมื่อวัดไฮโดรเจนไซยาไนด์ไม่พบว่ามีการให้ไฮโดรเจนไซยาไนด์จากการสลายสารดังกล่าว เอนไซม์ไม่สามารถย่อยฟลอริดซิน(phloridzin) ได้แต่ย่อยสาลิซิน (salicin) ได้บ้างเล็กน้อย

3.3.8 การศึกษาผลของสารต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์

ได้ตรวจสอบผลของสารต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์เมื่อใช้ pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside ภายใต้สภาวะมาตรฐาน ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 3.6 ไอโอโดอะซิเตท (iodoacetate) EDTA และอิออนของโลหะต่างๆยกเว้นปรอทมีผลน้อยมากต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ ในขณะที่ เดลต้า-กลูโคโนแลคโตน(δ-gluconolactone) จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 10^{-3} กับ10^{-4} โมลาร์ โดยที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ถึง 90 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ที่ดีที่สุดคือ สารประกอบของปรอท โดยพบว่าเมอคิวริกคลอไรด์ ($HgCl_2$) ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ยังคงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 90 เปอร์เซนต์และที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ยับยั้งได้เกือบ 100 % และพารา-คลอโรเมอคิวไรเบนโซเอท (p-chloromercuribenzoate) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ถึง 90 เปอร์เซนต์

3.3.9 การศึกษาความคงตัวของเอนไซม์

จากการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์แล้วเก็บเอนไซม์ดังกล่าวไว้ในลักษณะต่างๆกัน พบว่าถ้าทิ้งเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30-35° ซ) เป็นเวลา 2 วัน แอคติวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสอง

Table 3.6 **Effect of various substances on β-glucosidase/ β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre**

Substance	Final conc	% Activity remaining	
		β-D-Glucosidase	β-D-Fucosidase
Control	-	100.0	100.0
$FeSO_4$	1 mM	112.9	99.9
$FeCl_3$	1 mM	104.2	113.6
$CaCl_2$	1 mM	102.1	93.8
$MnCl_2$	1 mM	94.8	91.5
KCN	1 mM	106.7	104.5
$ZnSO_4$	1 mM	111.2	107.6
$MgCl_2$	1 mM	111.3	112.1
NaF	1 mM	104.4	91.8
$HgCl_2$	1mM	0.3	3.1
$HgCl_2$	10 μM	9.2	10.8
$HgCl_2$	0.1 μM	10.7	9.4
p-Chloromercuribenzoate	1 mM	11.7	10.2
p-Chloromercuribenzoate	10 μM	15.2	13.2
p-Chloromercuribenzoate	1 μM	25.2	23.7
EDTA	1 mM	93.9	99.3
Iodoacetate	1 mM	84.2	98.3
δ-Gluconolactone	1mM	8.8	6.8
δ-Gluconolactone	0.1 mM	50.3	69.8

Substances were tested on the hydrolytic activity towards pNP-β-D-glucoside (2mM) or pNP-β-D-fucoside (1mM) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 at 30°C.

ชนิดจะลดลงประมาณ 20-30 เปอร์เซนต์ ขณะที่แอคติวิตี้ของเอนไซม์จะลดลงประมาณ 0.3 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° ซ เป็นเวลา 5 วัน แอคติวิตี้ของเอนไซม์ลดลงประมาณ 1 เปอร์เซนต์เมื่อเก็บไว้ที่ 4° ซ เป็นเวลา 5 วัน และลดลงประมาณ 1.6 เปอร์เซนต์ถ้านำไปเก็บด้วยวิธี lyophilization นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บเอนไซม์ไว้เป็นเวลา 4 เดือนในน้ำกลั่นแล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20° ซ จะทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตี้ลดลงประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ทั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ต่อ pNP-β-D-glucoside และต่อ pNP-β-D-fucoside จะลดลงเท่าๆ กันคือประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20° ซ เป็นเวลา 4 เดือนเช่นเดียวกัน จะพบว่าเอนไซม์แอคติวิตี้ต่อ pNP-β-D-glucoside ลดลงประมาณ 20 เปอร์เซนต์ ในขณะที่แอคติวิตี้ต่อ pNP-β-D-fucoside ลดลงประมาณ 12 เปอร์เซนต์เท่านั้น การทำ freeze-thaw ไม่มีผลต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-ดี- ฟิวโคซิเดสเลย (freeze-thaw ทุกชั่วโมงเป็นเวลา 8 ครั้ง) แต่มีผลต่อแอคติวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสบ้าง คือแอคติวิตี้ลดลงประมาณ 19 เปอร์เซนต์ถ้าเก็บเอนไซม์ไว้ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 แต่ถ้าเก็บเอนไซม์ไว้ในน้ำกลั่น แล้วนำมา freeze-thaw ในทำนองเดียวกัน จะพบว่าเอนไซม์แอคติวิตี้จะลดลงประมาณ 10-20 เปอร์เซนต์ ดังนั้นโดยสรุปคือถ้าจะเก็บเอนไซม์ควรเก็บไว้ในที่เย็นจะดีกว่าเก็บที่อุณหภูมิห้อง และถ้าต้องการเก็บเอนไซม์ไว้ใช้เป็นเวลานานควรนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization จากการทดลองทั้งหมดนี้พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกสกัดจากเมล็ดพะยูง เป็นเอนไซม์ที่มีความคงทนต่อสภาวะต่างๆ ได้ค่อนข้างดี และแอคติวิตี้ของเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดสจะสูญเสียไปได้ง่ายกว่าเอนไซม์ เบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส

3.3.10 การวิเคราะห์ความจำเพาะของการสลายพันธะไกลโคซิดิก

จากการวิเคราะห์ความจำเพาะของการสลายพันธะไกลโคซิดิกด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography พบว่าได้ผลเช่นเดียวกันกับการตรวจสอบความสามารถในการย่อยด้วยวิธี

การทางสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ คือสามารถย่อยพันธะ β1,2 และ β1,3 ได้พอๆ กัน และสามารถย่อยพันธะβ1,6 ได้น้อยกว่าพันธะ β1,2 และ β1,3 ภายใต้สภาวะมาตรฐานที่กำหนดในเวลาที่เท่ากัน และจะย่อยพันธะβ1,4 ได้น้อยที่สุดหรือแทบไม่ย่อยเลย นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายพันธะอัลฟา-ไกลโคซิดิก ได้เลย

3.3.11 การตรวจสอบไอโซเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์

จากการตรวจสอบไอโซเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการสลาย pNP-β-D-glucoside ด้วยเครื่อง gas liquid chromatography พบว่า ผลิตผลแรกที่เกิดขึ้นเป็นน้ำตาลกลูโคสชนิดที่เป็น β-ไอโซเมอร์ ดังแสดงในรูปที่ 3.8

3.3.12 การศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์

จากการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ทำโดยความร่วมมือกับ Professor Seiya Chiba และ Associate Professor Hirokazu Matsui แห่งคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยฮอกไกโด ประเทศญี่ปุ่น ภายใต้โครงการความช่วยเหลือจาก NRCT -JSPS โดย ดร.ฤดี สุราฤทธิ์ เดินทางไปปฏิบัติงานวิจัยนี้ ณ ประเทศญี่ปุ่น

การศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์โดยใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ชื่อว่า conduritol B epoxide ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จำพวกกลูโคซิเดส และสามารถยับยั้งได้ทั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและเอนไซม์อัลฟา-กลูโคซิ

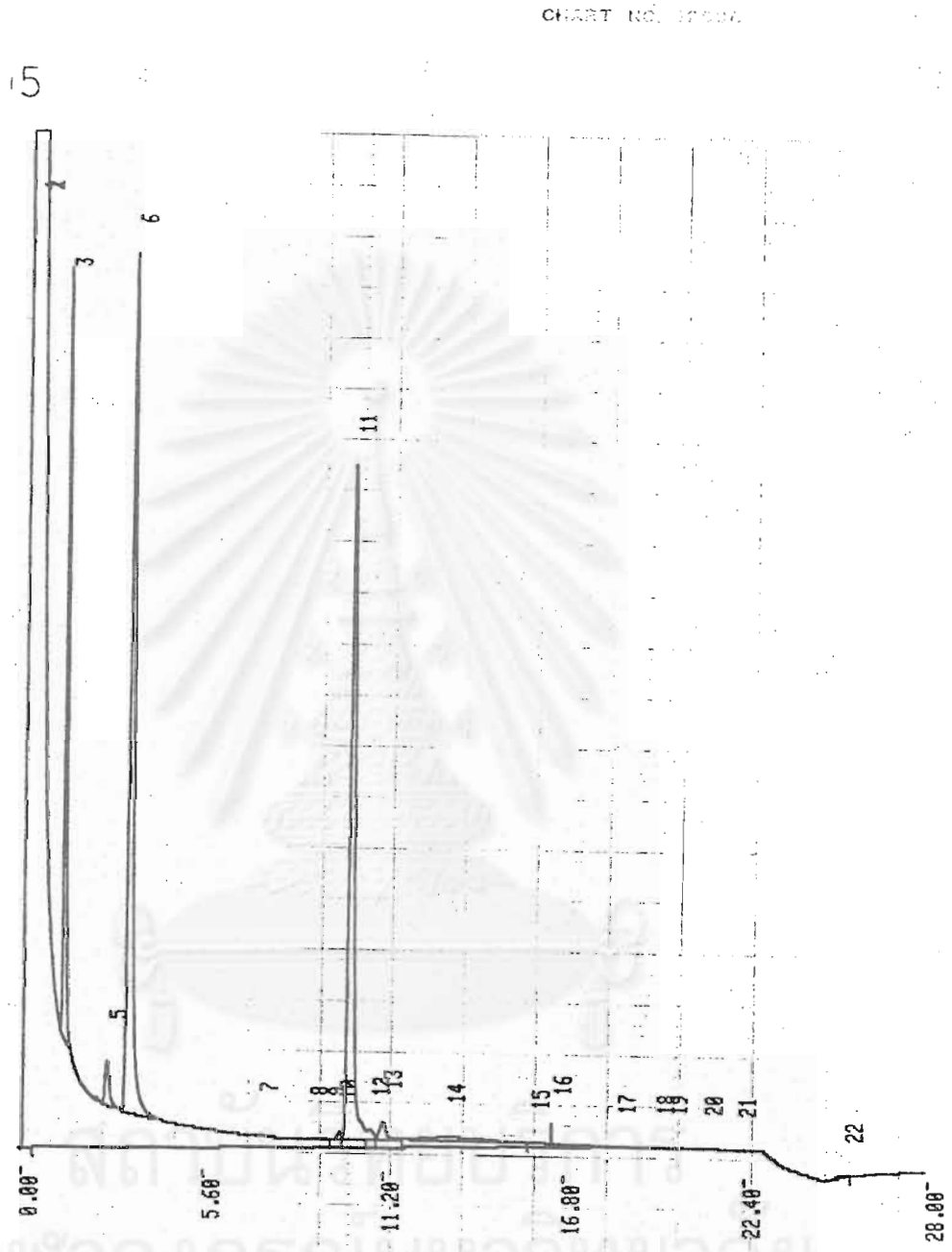


Figure 3.8 G.l.c. analysis of the products of hydrolysis pNP-β-D-glucoside, showing that the β-anomer of glucoside is the initial product of hydrolysis. Peak 6 is β-D-glucopyranose and peak 5 is α-D-glucopyranose.

เดส โดยconduritol B epoxide จะจับกับหมู่คาร์บอกซิลิกของกรดอะมิโนที่เป็น acidic amino acid ได้มีผู้รายงานว่าสารนี้จะสามารถจับกับบริเวณเร่ง (43-46) ซึ่งจากการศึกษาผลของ conduritol B epoxide ต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส/ เบต้า-ฟิวโคซิเดสจากเมล็ดพะยูงพบว่าเอนไซม์จะจับกับสาร conduritol B epoxide ได้ มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี้ต่อสับสเตรททั้ง pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside ไปในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 3.9 ซึ่งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีจลนศาสตร์เป็น pseudo-first order นั่นคือเมื่อ plot semilogarithm ของแอคติวิตี้ที่เหลืออยู่กับเวลา ที่ความเข้มข้นของ conduritol B epoxide ต่างๆ กัน จะได้กราฟเส้นตรง และการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ conduritol B epoxide ความเข้มข้นสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.9 ซึ่งการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วย conduritol B epoxide สามารถอธิบายได้ด้วยสมการข้างล่าง คือ

$$E + CBE \overset{K_R}{\leftrightarrow} E^*CBE \overset{k_2}{\leftrightarrow} E\text{-}CBE \qquad \text{.....1}$$

ถ้า $[CBE] >> k_{obs}[E]$, $1/k_{obs} = (K_R/[CBE])/k_2 + 1/k_2$ 2

จากการทดลองนี้ค่า k_{obs} ได้ = 5.56×10^{-3} sec^{-1} และ K_R =6.7 mM และพบว่าเมื่อ plot log k_{obs} กับ log [CBE] จะได้กราฟเป็นเส้นตรงมีค่า slope = 0.9 ที่แปลว่า 1 โมลของ conduritol B epoxide จับกับ 1 โมล subunit ของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 3.10

จากผลการทดลองนี้ยืนยันว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นเอนไซม์โมเลกุลเดียวแต่สามารถเร่งปฏิกิริยาการสลายสับสเตรทได้ทั้ง pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside และอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์นี้มีบริเวณเร่งแห่งเดียวเท่านั้น นอกจากนี้ในบริเวณเร่งดังกล่าวยังมีกรดอะมิโนชนิด acidic amino acid อยู่โดยจะมีหมู่คาร์บอกซิลอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

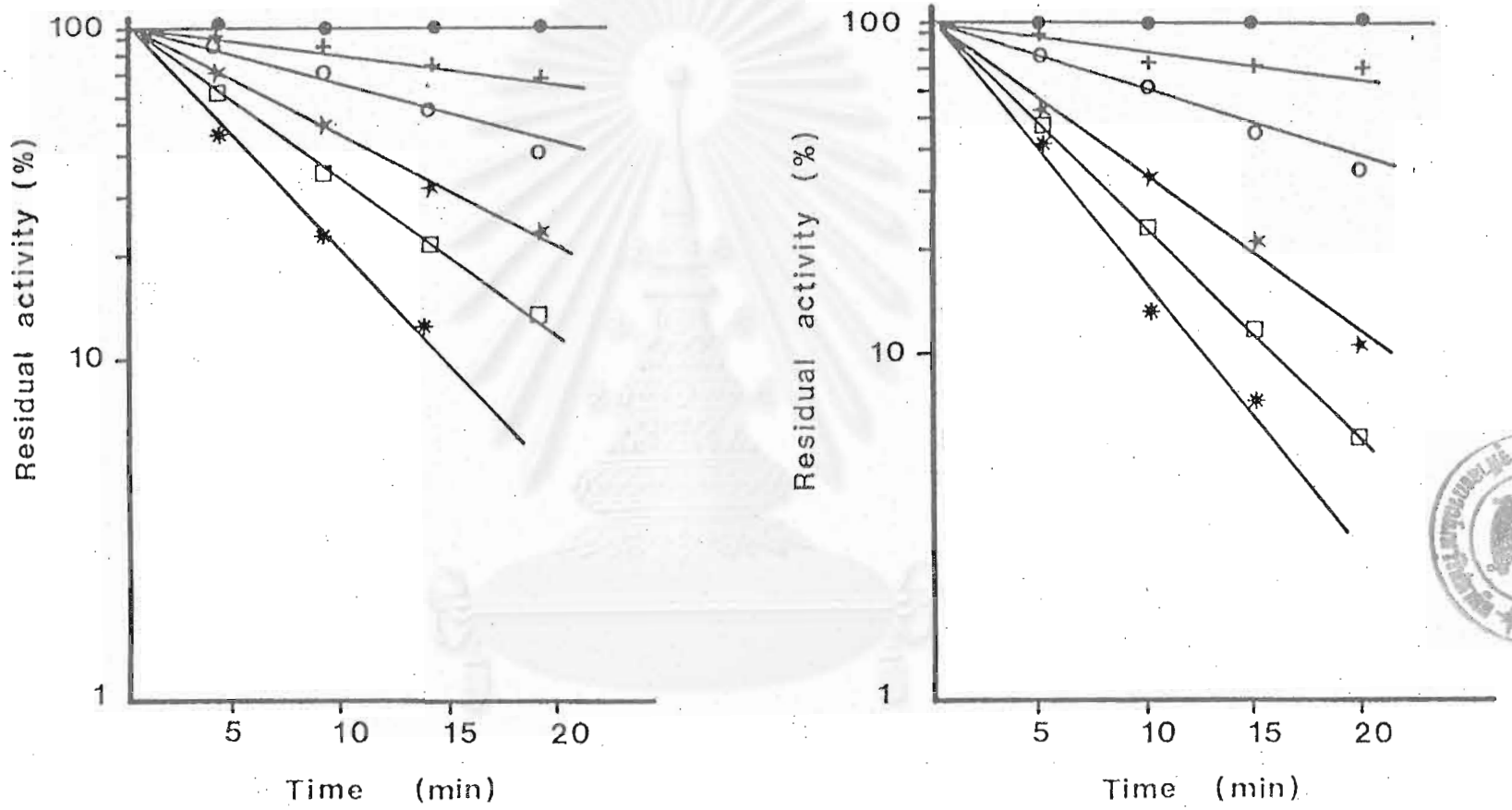


Figure 3.9 Inactivation of β-D-glucosidase/β-D-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre by CBE. The β-D-fucosidase/β-D-glucosidase was treated with CBE at 0 mM (-O-), 0.5 mM (-●-), 1.0 mM (-□-), 3.0 mM (-■-), 6.0 mM (-Δ-), and 9.0 mM (-▲-) in 0.1 mM sodium acetate buffer pH 5.0, at 37°C, for 5 to 20 min. *(A)* hydrolysis of PNPG; *(B)* hydrolysis of PNPF.

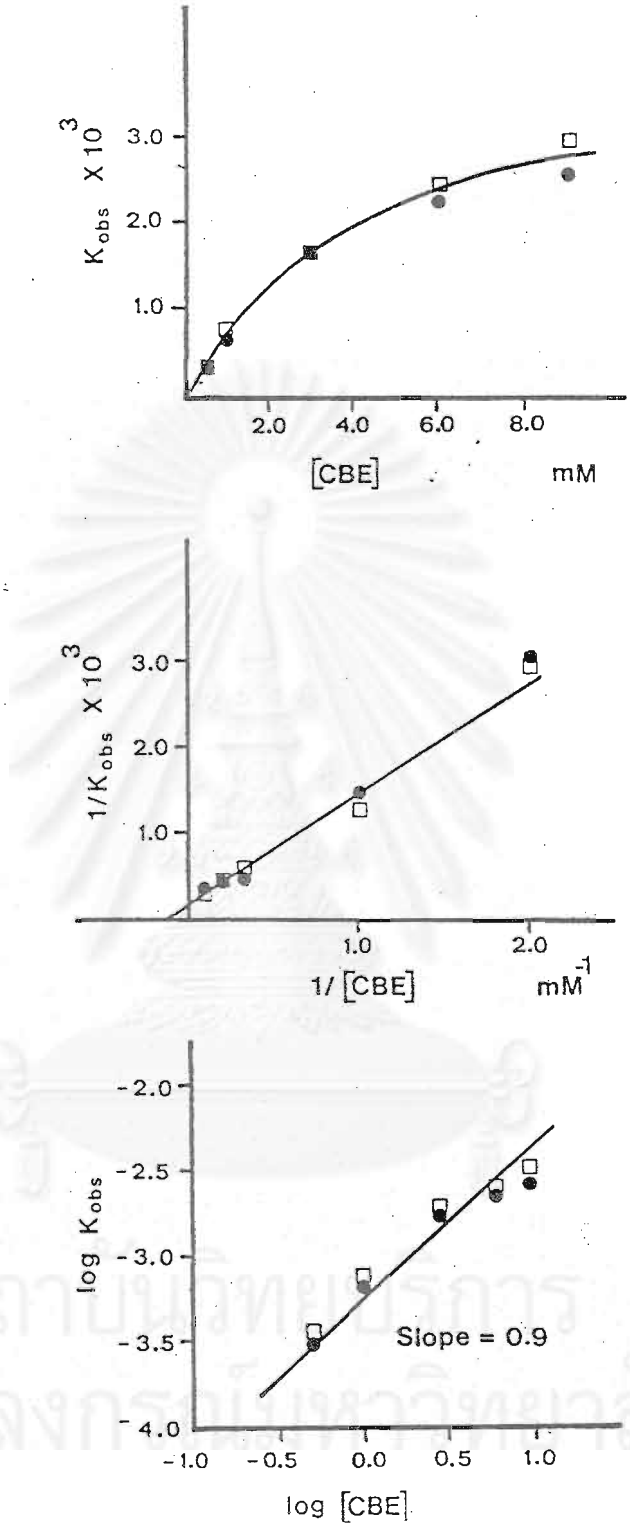


Figure 3.10 Relationship between concentration of CBE and k_{obs}, with PNPG (●) and PNPF (O) as substrate: *(A)* k_{obs} vs [CBE]; *(B)* double reciprocal plot of k_{obs} against [CBE] ; *(C)* log (k_{obs}) vs log [CBE].

นอกจากการศึกษาโดยใช้สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ conduritol B epoxide แล้วยังทำการศึกษาด้วยวิธีทางจลนศาสตร์ด้วย กล่าวคือทำการศึกษาแข่งขันกันในการจับกับสับสเตรทสองชนิด คือ pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside โดยพบว่าจะมีการยับยั้งแบบแข่งขันเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.11 ซึ่งค่า K_i ของการยับยั้งของ pNP-β-D-fucoside ต่อการทำงานของเอนไซม์เมื่อใช้ pNP-β-D-glucoside เป็นสับสเตรทมีค่า 0.42 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า Km ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่เป็น pNP-β-D-fucoside และเมื่อทำการศึกษาจลนศาสตร์ของ สับสเตรทผสม pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside ที่ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน (mole fraction) แล้วนำมา plot Lineweaver-Burk จะได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.12

f = [PNPG]/ ([PNPF] + [PNPG])

f = 1 หมายถึงมีแต่ p-NP-β-D-glucoside อย่างเดียว

f = 0 หมายถึงมีแต่ p-NP-β-D-fucoside อย่างเดียว

ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีบริเวณเร่ง ตำแหน่งเดียวที่สามารถเร่งได้ทั้ง pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside ว่าถ้าหาค่า K_m และ V_{max} ที่ตำแหน่ง f ต่าง ๆ กัน แล้วนำมา plot เทียบกับที่จะคำนวณได้ตามทฤษฎี จากสมการข้างล่าง

$$K_m = \frac{1}{K_A f + K_B (1-f)}$$

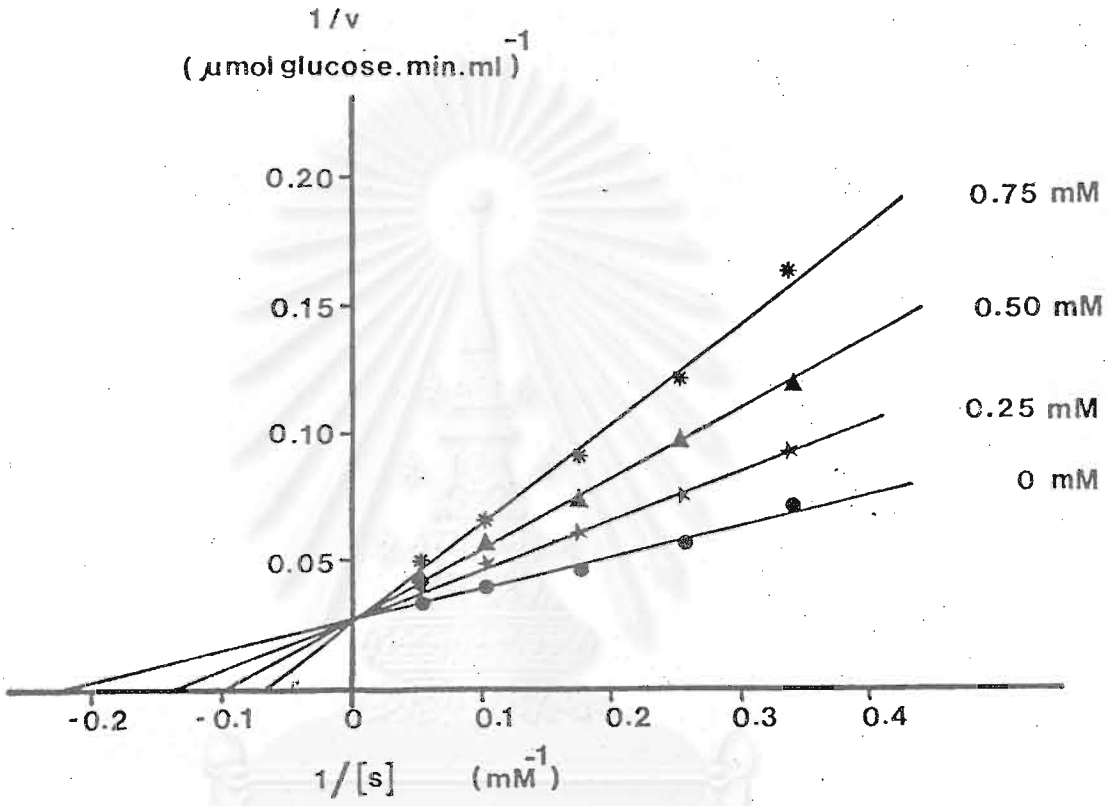


Figure 3.11 Inhibition of β-D- glucosidase activity by PNPF. The reaction mixture, containing 0.25 ml of substrate (PNPG) at various concentrations, 0.1 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0, 0.1 ml of various concentrations of PNPF, and 0.05 ml of enzyme solution, was incubated at 37°C for 10 min. The glucose liberated was measured. -●- 0 mM PNPF; -★- 0.25 mM PNPF; -▲- 0.5 mM PNPF; -✳- 0.75 mM PNPF.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

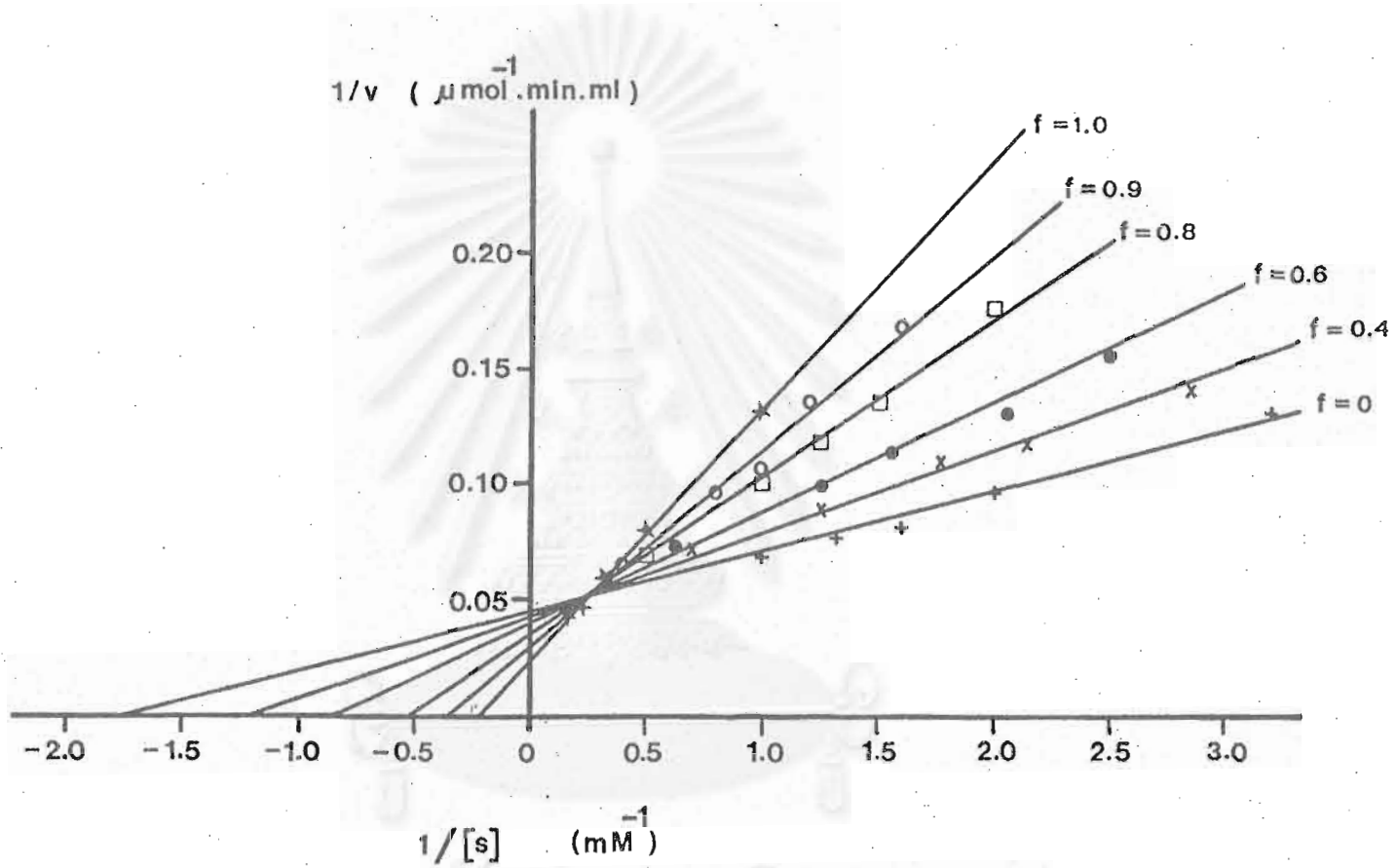


Figure 3.12 Plots of $1/v$ versus $1/s$ for mixtures of PNPG and PNPF substrates. The mole fraction of each substrate in the mixture is given by f = [PNPG]/([PNPG] + [PNPF]). ✚ f = 0; ✖ f = 0.4; □ f = 0.8; O f = 0.9; ★ f = 1.0

$$V_{max} = \frac{V_1 K_A f + V_2 K_B (1-f)}{K_A f + K_B (1-f)}$$

จะพบว่าค่าที่ได้จากทดลอง และค่าที่ได้จากการคำนวณทางทฤษฎีมีผลใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงในรูปที่ 3.13

ดังนั้นแสดงว่าเอนไซม์ β-D-glucosidase /β-D-fucosidase ที่เตรียมได้บริสุทธิ์จากเมล็ดพะยูง มีโปรตีนโมเลกุลเดียวกัน แต่มีความสามารถในการเร่งการสลายสับสเตรทได้ทั้ง glucoside และ fucoside โดยมีบริเวณเร่งบริเวณเดียว

3.4. บทวิจารณ์

จากการศึกษานี้พบว่า เมล็ดพะยูงเป็นแหล่งที่ดีมากของเอนไซม์เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส และเบต้า-ดี-ฟิวโคซิเดส โดยพบเอนไซม์ในปริมาณที่สูงมากถึง 250-350 nkats/ กรัมเมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) เป็นไม้ยืนต้นพื้นเมืองที่พบในประเทศไทย แต่ละต้นจะให้เมล็ดเป็นจำนวนมากในแต่ละปี มีประโยชน์ในการใช้ทำบ้านเรือนและเฟอร์นิเจอร์ต่างๆ เป็นไม้ที่กำลังได้รับการส่งเสริมให้ปลูกในโครงการการปลูกป่าต่าง ๆ ของกรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ การขยายพันธ์ในปัจจุบันกำลังพัฒนาไปสู่การใช้การต่อกิ่งและการทำ tissue culture เมล็ดพะยูงจึงหาได้ง่ายเป็นจำนวนมาก และในอนาคตเมล็ดพะยูงจะไม่มีประโยชน์ต่อเกษตรกรในการใช้แพร่พันธ์ จากการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ปริมาณมากด้วยการใช้ขั้นตอนที่ไม่ยุ่งยากนัก คือสามารถเตรียมเอนไซม์ได้ถึง 1 มิลลิกรัมจากเมล็ด 10 กรัม โดยมีขั้นตอนในการเตรียมประกอบด้วยขั้นตอนใหญ่ ๆ 3 ขั้นตอนได้แก่การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75 เปอร์เซนต์ตามด้วย

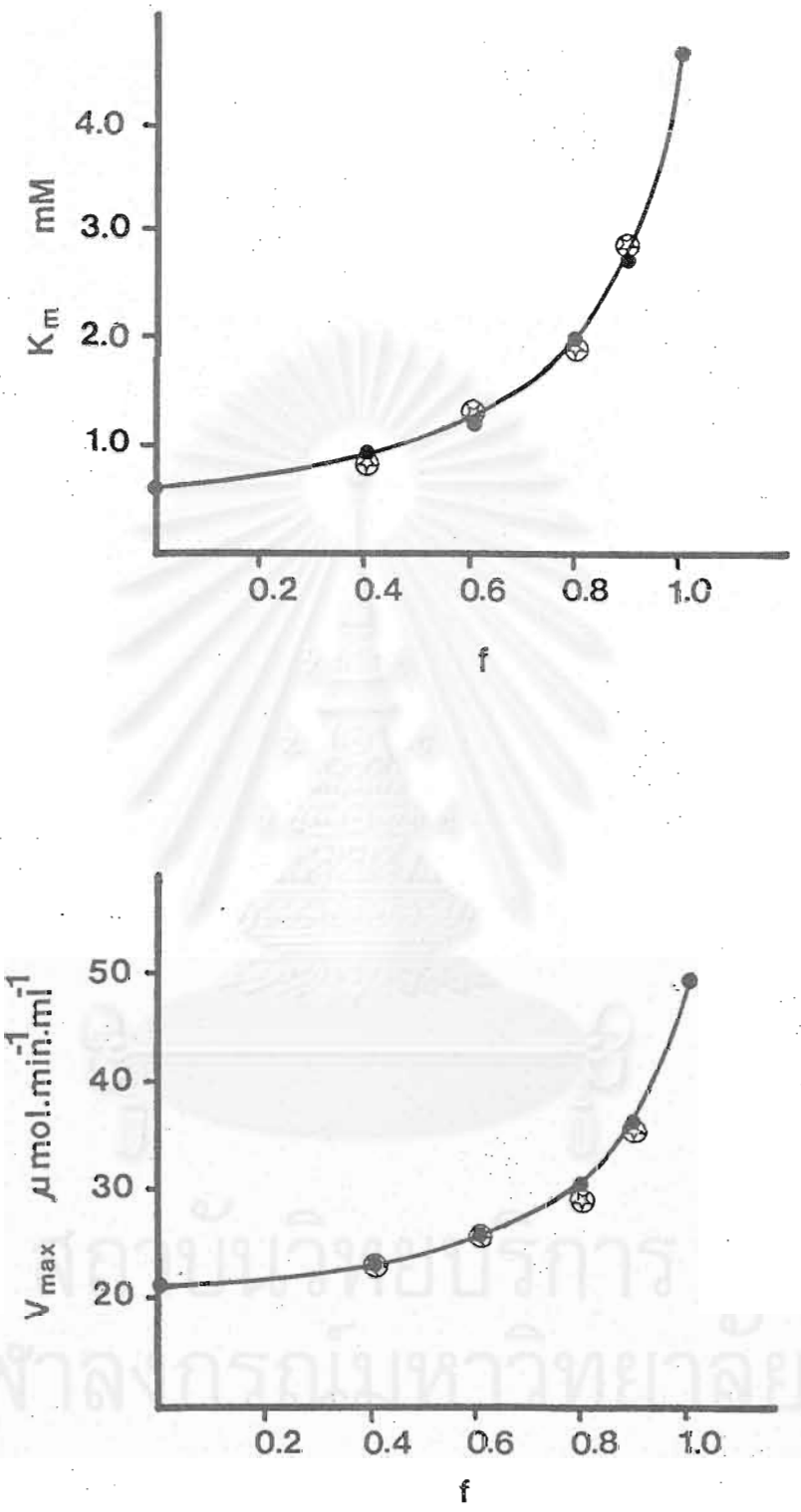


Figure 3.13 Dependence of V_{max} and K_m on f for the mixed substrate reactions described in Fig. 3.12. -●-= theoretical curve; ☆ = experimental values.

การแยกด้วย preparative isoelectric focusing แล้วนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-150 จะได้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีความคงตัวสูง

เอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 5.0 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสส่วนใหญ่ซึ่งจะมี pH ที่เหมาะสมในการทำงานค่อนข้างเป็นกรด (47) จากผลการศึกษาความสามารถในการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้มีแอคติวิตี้ต่อ pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside สูงที่สุด ซึ่งคุณสมบัตินี้จะคล้ายกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสอื่นหลายชนิด (26-29, 37) และแตกต่างจากเอนไซม์เบต้า-ฟิวโคซิเดสจากยางของต้นผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) (38) ซึ่งมีแอคติวิตี้สูงสำหรับย่อย pNP-β-D-fucoside และ pNP-β-L-fucoside ซึ่งนอกจากนี้การที่พบว่าเอนไซม์จากเมล็ดพะยูงสามารถย่อย pNP-β-D-galactoside, pNP-α-L-arabinoside, pNP-β-D-xyloside และ phenyl-β-D-glucoside ได้เล็กน้อยนั้น พบลักษณะเช่นเดียวกันนี้ ในเอนไซม์จำพวกเบต้า-กลูโคซิเดสอื่นเช่นกัน ตัวอย่างเช่นเอนไซม์ลินามาเรสจาก white clover (29) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากพืชเมืองร้อนอื่น (48, 49) ซึ่งการที่เอนไซม์สามารถมีแอคติวิตี้ต่อไกลโคไซด์ทั้ง 3 ชนิดได้นั้นอาจเนื่องมาจากในไกลโคไซด์ทั้งสามชนิดนั้น configuration ที่ C อะตอมตำแหน่งที่ 1,2 และ 3 อยู่ในตำแหน่ง trans equatorial เช่นเดียวกับที่พบใน pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่า เอนไซม์มีค่า K_m ต่อ pNP-β-D-fucoside น้อยกว่าต่อ pNP-β-D-glucoside ถึง 10 เท่า ส่วน K_m ต่อ pNP-β-D-Xyloside และ pNP-α-L-aralsinoside มีค่าอยู่ระหว่างค่า K_m ต่อ pNP-β-D-fucoside และต่อ Km ของ pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-galactoside ทั้งนี้อาจเนื่องจากในโครงสร้างของน้ำตาลเพนโต

ไซด์ซึ่งมีคาร์บอนอะตอม 5 อะตอมซึ่งที่ C ตำแหน่งที่ 5 จะมีหมู่ไฮโดรเจนอยู่ ขณะนี้สำหรับน้ำตาลฟิวโคสที่ C ตำแหน่งที่ 5 จะมีหมู่เมทธิลอยู่ ซึ่งจะต่างจากในน้ำตาลเฮกโซส ซึ่งที่ C ตำแหน่งที่ 5 จะมีหมู่ $-CH_2OH$ อยู่ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการที่มีหมู่ที่เป็นพวกไฮโดรฟิลิก ที่ C อะตอมตำแหน่งที่ 5 จะมีส่วนในการกำหนดประสิทธิภาพในการที่ สับสเตรทจะสามารถจับกับเอนไซม์ได้ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวจะเห็นได้อย่างชัดเจนในเอนไซม์กลูโคซิเดสจาก white clover (29) และ linamarase จากมันสำปะหลัง (50) โดยพบว่าจะมีค่า K_m ต่อสับสเตรทที่เป็น pNP-α-L-arabinoside และ pNP-β-D-xyloside ต่ำกว่าค่า Km ของสับสเตรทที่เป็น pNP-β-D-glucoside มาก

แม้ว่าค่า K_m ต่อ pNP-β-D-fucoside จะต่ำกว่า ค่า K_m ต่อ pNP-β-D-glucoside ถึง 10 เท่าก็ตาม ซึ่งแสดงว่า pNP-β-D-fucoside ควรจะเป็นสับเสตรทที่ดีที่สุดสำหรับเอนไซม์นี้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายของไกลโคไซด์ที่พบในธรรมชาติค่อนข้างต่ำมาก และไม่เคยเกิดมากกว่า 5 เปอร์เซนต์ของอัตราการสลาย pNP-β-D-glucoside เลย ดังนั้นจึงเชื่อว่า ไกลโคไซด์ที่ตรวจสอบคงจะไม่ใช่สับสเตรทตามธรรมชาติของเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งถ้าลองเทียบกับการศึกษาเกี่ยวกับสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสอื่นจะพบว่าอัตราการสลายสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์อื่น ๆ จะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วมาก (29-33) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับสับสเตรทในธรรมชาติจึงยังควรจะต้องทำการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาผลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าสารจำพวกปรอทจะมีผลในการยับยั้งแอคติวิตี้ของเอนไซม์ชนิดนี้ได้อย่างรุนแรงมากที่สุด เนื่องจากเอนไซม์นี้มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานเป็นกรด จึงเป็นไปได้ว่าหมู่ที่ทำงานที่บริเวณเร่งของเอนไซม์เป็นหมู่ที่แตกตัวได้ใน pH ที่เป็นกรด ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าสารประกอบจำพวกปรอทสามารถยับยั้งการ

ทำงานของเอนไซม์ได้โดยจับกับประจุลบที่เกิดขึ้นหลังจากการแตกตัวของหมู่คาร์บอกซิล ของกรดอะมิโนชนิด acidic amino acid ที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วยการใช้สาร conduritol B epoxide ยืนยันว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์มาก และเป็นเอนไซม์โมเลกุลเดียวที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ทั้งเมื่อใช้ เบต้า-ดี-ไกลโคไซด์หรือเบต้า-ดี-ฟิวโคไซด์เป็นสับสเตรท โดยมีบริเวณเร่งเดียวใน 1 หน่วยย่อยของเอนไซม์

โดยสรุปอาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์ที่แยกได้บริสุทธิ์จากเมล็ดพะยูงมีแอคติวิตี้ต่อทั้ง pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside การศึกษาหาสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์ตัวนี้ควรจะต้องดำเนินการต่อไปเพื่อที่จะได้ทราบถึงหน้าที่การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในธรรมชาติว่ามีหน้าที่อะไร และเหตุใดจึงมีปริมาณสูงมากในเมล็ดพืชดังกล่าว ซึ่งคาดว่าจะเป็นความรู้พื้นฐานที่มีประโยชน์ต่อไป จากการตรวจสอบหาปริมาณเอนไซม์จำพวกเบต้า-กลูโคซิเดส โดยใช้ pNP-β-D-glucoside และ pNP-β-D-fucoside เป็นสับสเตรทในส่วนต่าง ๆ ของต้นพะยูง ได้แก่ ในใบ ในลำต้น ก้านใบ ปลายยอด และปลายราก พบว่าในส่วนต่าง ๆ เหล่านี้มีเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในระดับค่อนข้างต่ำประมาณ 3.5 nkats ต่อกรัมของส่วนของพืชที่นำมาใช้ตรวจสอบ ซึ่งปริมาณดังกล่าวคิดเป็นเพียง 1 เปอร์เซนต์ของแอคติวิตี้ทั้งหมดที่พบในเมล็ดเท่านั้น ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับส่วนประกอบของกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโน บริเวณเร่งของเอนไซม์และโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์นี้ยังคงเป็นที่น่าสนใจที่จะดำเนินการต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

การเตรียมเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส

4.1 บทนำ

เอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส เป็นเอนไซม์ที่มีผู้รายงานว่าสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี ดังตัวอย่างรายงานจากนักวิจัยหลายท่านด้วยกัน (17-19) แหล่งของเอนไซม์ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสที่เป็นที่รู้จักกันดีคือ เอนไซม์จากถั่วแจ๊ค (Jack bean) การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ อาจทำได้ สองวิธี คือ equilibrium - controlled systhesis หรืออีกนัยหนึ่งคือการใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์จำพวกที่ย่อยคาร์โบไฮเดรท และ kinetically - controlled synthesis โดยปฏิกิริยา transglycosylation

เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในเชื่อรา (51-53) สัตว์ (54) และในพืช ที่มีผู้ศึกษากันมากในพืชคือ จากถั่วแจ๊ค (Jack bean, *Canavalia ensiformis*) และจาก almond (*Prunus amygdalus*) เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถเตรียมได้ในปริมาณค่อนข้างมาก และมีจำหน่ายทั่วไปจากบริษัทที่ผลิตเอนไซม์และสารเคมีต่างๆ ด้วยราคาพอประมาณ จึงได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ดังกล่าวอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์พวกอัลฟาแมนโนซิเดสนี้สามารถใช้ในการสังเคราะห์สารจำพวกโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีมาก ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในบทที่ 1 เชื่อกันว่าการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์จะทำให้ได้ผลิตผลหรือโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี regiospecificity สูงได้ถ้าเลือกใช้เอนไซม์ที่เหมาะสมภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม และที่สำคัญก็คือ น้ำตาลแมนโนสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญ

ใน ไกลโคโปรตีนต่างๆ มากมาย (3,4) โอลิโกแซคคาไรด์ของน้ำตาลแมนโนสที่มีขายมีราคาแพงมาก และโอลิโกแซคคาไรด์ของน้ำตาลแมนโนสที่เป็นกิ่ง (branched chain) ยังสังเคราะห์ได้ยาก ซึ่งจากความก้าวหน้าของวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในปัจจุบัน ทำให้การศึกษาความสำคัญของส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรทของไกลโคโปรตีนได้รับความนิยมจากนักวิจัยเพิ่มมากขึ้น เพราะเชื่อกันว่าจะเป็นความรู้ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในการศึกษาผลของส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรทต่อการทำงานของไกลโคโปรตีนต่างๆ ของมนุษย์ การเข้าใจถึงกลไกภูมิคุ้มกันร่างกาย แม้กระทั่งกลไกการแก่ตัวของเซลล์ และการตายของเซลล์ต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตจำพวกแบคทีเรีย และเชื้อรา หลายชนิดพบว่าโปรตีนหลายชนิดมีแมนโนสเป็นส่วนประกอบมักพบเป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้แบคทีเรียหรือเชื้อรานั้นๆ มีความเป็นพิษหรือเป็นตัวกำหนด virulence ของเชื้อต่างๆ นั่นเอง.

Li (55) ได้รายงานการใช้เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่น้ำตาลแมนโนสจาก Phenyl mannoside สร้างเป็น Phenyl mannobiosides และยังใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับสร้างเป็นน้ำตาล mannobiose จากน้ำตาลแมนโนสได้ด้วย Rastall และคณะฯ (17) ได้รายงานการสังเคราะห์โฮโมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ และเฮธเทอโรแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ใหม่เป็นครั้งแรกโดยใช้เอนไซม์อัลฟาแมนโนซิเดสจากถั่วแจ๊ค ตัวอย่างของปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายหมู่น้ำตาลแมนโนสจาก พาราไนโตรฟินิลอัลฟาแมนโนไซด์ ไปยังตัวรับต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 Johansson และคณะฯ(18,19) ได้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับโดยใช้เอนไซม์ อัลฟาแมนโนซิเดสจากถั่วแจ๊คพบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลแมนโนสปริมาณสูงๆ จะช่วยให้เกิดการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีขึ้น ผลการสังเคราะห์(ตารางที่ 4.2) จากการใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับเพื่อสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ของน้ำตาลแมนโนสนี้มีข้อดีกว่าวิธีอื่นคือ สามารถใช้น้ำตาลที่มีราคาถูกเป็นสับสเตรท และน้ำตาลแมนโนสเป็นน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ดีมาก

Table 4.1 Yields of oligosaccharides synthesised by co-condenation with mannose under equilibrium conditions(% yield by HPLC) (17)

Acceptor sugar	Percentage yield of oligosaccharides		Class*
	45% total sugar	72% total sugar	
D-Galactose	4.00	4.20	a
D-Glucose	11.00	11.70	a
D-Xylose	5.34	4.70	a
D-Psicose	9.30	8.20	a
D-Allose	8.05(m)	2.40(m)	b
D-Talose	2.67	0.00	b
D-Tagatose	7.50	5.50	b
L-Rhamnose	4.23	1.60	b
L-Fucose	6.73	0.00	b
D-Maltose	7.50	5.90	b
D-Trehalose	13.60	9.20	b
D-Melibiose	5.60	0.00	b
D-Maltotriose	7.50	3.20	b
N-acetyl-D-mannosamine	9.50(m)	6.40(m)	c
D-Altrose	3.75	ND	u
D-Fructose	ND	13.10	u
D-Quinovose	3.05	ND	u
D-Arabinose	38.00	ND	u
N-acetyl-D-glucosamine	3.65(m)	ND	u
D-Digitoxose	2.45(m)	ND	u
D-Sucrose	ND	14.40	u
D-Raffinose	ND	4.20	u

* Classes are defined as: (a) sugars that can act as acceptors and that are not inhibitory at high concentrations; (b) sugars that act as acceptors but are inhibitory at high concentrations; and (c) sugars that neither accept mannose nor inhibit synthesis of mannobioses
ND, No data available
m, Mannobiose is sole product
u, Unclassifiable with present data

Table 4.2 Equilibrium data for the α-mannosidase reversion at 55°C (19)

% mannose (Initial conc.)	H_2O (M)	Monosacch. (M)	Disacch. (M)	Trisacch. (M)	Tetrasacch. (M)	$K_{eq,di}$	$K_{eq,tri}$
25	46.0	1.18	0.17	0.033	–	5.5	7.7
40	40.0	1.72	0.34	0.11	0.021	4.6	7.5
55	32.5	1.81	0.61	0.23	0.052	6.0	6.8
70	24.1	1.67	0.74	0.37	0.16	6.4	7.3
85	16.6	1.73	0.93	0.61	0.25	5.1	6.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สามารถเตรียมที่ความเข้มข้นสูงๆ ได้โดยไม่มีความยุ่งยากในการละลาย และผลิตผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นพบว่าเกิดการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ได้หลายชนิดด้วย นอกจากนี้เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสยังมีข้อดีที่เป็นเอนไซม์ที่มีความคงตัวสูงมากทำให้สามารถทำงานได้เป็นเวลานาน และการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่ค่อยมีผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นี้

จากความสำคัญของเอนไซม์แมนโนซิเดสดังที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยได้ตัดสินใจมุ่งความสนใจไปยังการศึกษาเอนไซม์ ซึ่งอาจมีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ในสารจำพวกไกลโคโปรตีน โดยเฉพาะเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสร้างแขนงข้างของไตรแมนโนไซด์(trimannoside) [Man α 1-6] (Man α 1-3) -Mannosyl-Aglycon ซึ่งเป็นส่วนของแกนในของ N-linked-oligosaccharidesในไกลโคโปรตีนหลายชนิด ซึ่งเอนไซม์ที่คาดว่าจะมีบทบาทมากที่สุดในเรื่องนี้ควรจะเป็นเอนไซม์จำพวกอัลฟา-แมนโนซิเดส เราได้พยายามตรวจสอบหาเอนไซม์จำพวกอัลฟา-แมนโนซิเดสจากพืชชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชตระกูลถั่ว เนื่องจากเอนไซม์แมนโนซิเดสที่มีขายในท้องตลาดเตรียมจากในพืชจำพวกถั่ว คือ ถั่วแจ็ค ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าพืชตระกูลถั่วจะมีเอนไซม์จำพวกนี้สูง นอกจากนี้เรายังให้ความสนใจถึงการศึกษาค้นหาเอนไซม์ เบต้า-แมนโนซิเดส จากพืชตระกูลอื่นด้วย ซึ่งในอนาคตจะได้พยายามศึกษาถึงองค์ประกอบที่สำคัญที่เป็นตัวกำหนดความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรทต่างๆ ตลอดจนค้นหาเอนไซม์ไกลโคซิเดสที่มีความจำเพาะต่อน้ำตาลอื่นในไกลโคโปรตีนอีกด้วย

ผลที่ได้จากการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดพืชต่างๆ (ตารางที่ 2.2) พบว่ากระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn) มีเอนไซม์ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสในระดับปานกลาง

ค่อนข้างสูง ขณะที่ในเมล็ดมะฮอกกานี (*Swieteria* sp .) มีปริมาณอัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสและเบต้า-ฟิวโคซิเดสปานกลาง ในเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth., และฉนวน (*Dalbergia nigrescens* Kurz.) มีเอนไซม์ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสในระดับปานกลางค่อนข้างสูง ในเมล็ดแคฝรั่ง (*Gliricidia sepium* Steud.) จะพบปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส และอัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสในระดับปานกลาง เมล็ดมะระ (*Momordica charantia*) มีเอนไซม์ เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสในระดับปานกลาง ดังนั้น ต่อไปจะทำการศึกษาถึงปริมาณของเอนไซม์ต่างๆ ที่กล่าวข้างต้นในระหว่างที่เมล็ดกำลังจะงอก โดยหวังว่าในพืชบางชนิดอาจจะมีปริมาณเอนไซม์ที่กล่าวมาในปริมาณที่สูงกว่าเดิมในระหว่างการงอกของเมล็ด ด้วยวิธีนี้เราคาดว่าจะสามารถพบพืชที่จะเป็นแหล่งให้เอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสที่ดีในพืชตระกูลอื่นๆนอกจากพืชตระกูลถั่ว และยังหวังจะพบแหล่งที่ดีของเอนไซม์ อัลฟา-แอล-ฟิวโคซิเดส อัลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส และเบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส ในเมล็ดพืชด้วย

ดังนั้นจึงได้พยายามแยกและเตรียมเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสจากเมล็ดพืชที่มีระดับเอนไซม์ดังกล่าวค่อนข้างสูงให้บริสุทธิ์ เพื่อจะได้ศึกษาคุณสมบัติเกี่ยวกับเอนไซม์เหล่านี้ในแต่ละแหล่งและหาทางพัฒนาการสังเคราะห์โอลิโกแมนโนไซด์ให้ดีขึ้นโดยเปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์จากถั่วแจ๊ค ที่มีผู้นิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสแบ่งตามแหล่งดังนี้

-เอนไซม์จากถั่วนางแดง(*Vigna umbellata*)

-เอนไซม์จากเมล็ดถ่อน(*Albizzia procera* Benth)

-เอนไซม์จากเมล็ดปอแก้ว(*Hibiscus sabdariffta* L. var sabdariffa)

-เอนไซม์จากเมล็ดกระเจี๊ยบ(*Hibiscus sabdariffa* L.var altissima)

4.2 วัสดุและวิธีการ

4.2.1 เมล็ดถั่วนางแดง เมล็ดปอแก้ว และเมล็ดกระเจี๊ยบ ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ส่วนเมล็ดถ่อนได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์เมล็ดพันธุ์ไม้ป่าไทย-คานาดา อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี

4.2.2 วิธีการหาเอนไซม์แอคติวิตี้.(วิธีมาตรฐาน)

ปฏิกิริยาประกอบด้วย 50 ไมโครลิตรของ 0.01โมลาร์ พาราไนโตรฟีนิล-อัลฟา-ดี-แมนโนไซด์(จากบริษัทซิกมา ประเทศสหรัฐอเมริกา) 850 ไมโครลิตร ของ0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 10 นาที ตรวจวัดปริมาณพาราไนโตรฟินอล ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร กำหนดให้ หนึ่งหน่วยของเอนไซม์ (1 U) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สลายให้ 1 ไมโครโมล ของพาราไนโตรฟีนอลในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 30° ซ

4.2.3 การหาเวลาที่มีปริมาณเอนไซม์สูงสุดในเมล็ด

นำเมล็ดพืชที่ต้องการตรวจวัดแอคติวิตี้มาแช่ใน 0.1 เปอร์เซนต์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่อาจติดอยู่บนผิวของเมล็ด จากนั้นนำมาเพาะในสภาวะต่างๆ กัน ได้แก่ แช่น้ำ 1 วัน, 2 วัน และ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปเพาะบนผ้าขาวบางในกล่องปลอดเชื้อ คัดเลือกเมล็ดที่มีขนาดรากเท่าๆ กัน มาสกัดและตรวจสอบหาปริมาณเอนไซม์

4.2.4 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดถั่วนางแดง (*Vigna umbellata*)

นำเมล็ดถั่วนางแดงที่แช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 วัน และเพาะจนงอกรากเป็นเวลา 3 วัน มาปั่นให้ละเอียดในซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 3.0 ที่มี 5 เปอร์เซนต์ โปลีไวนิล โปลีไพรโรลิโดน(polyvinylpolypyrrolidone, PVPP), 1 มิลลิโมลาร์ ฟีนิลเมธิลซัลโฟนิล ฟลูออไรด์ (phenylmethylsulfonylfluoride ,PMSF) และ 1 มิลลิโมลาร์ สังกะสีซัลเฟต เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย นำมากรองผ่านผ้าขาวบาง บีบให้หมดน้ำ นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นตกตะกอนที่ 6000 xg เป็นเวลา 70 นาที นำส่วนน้ำใสไป dialyse กับ 0.01 โมลาร์ไกลซีนบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ สังกะสีซัลเฟตอยู่ด้วย เป็นเวลา 2 คืน นำไป dialyse กับ 0.01 โมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 จากนั้นนำไปผ่าน DEAE - cellulose chromatography ตามด้วย hydroxyapatite chromatography ขบวนการทั้งหมดทำที่ 4 ° ซ

4.2.5 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth.)

นำเมล็ดถ่อนมาทำความสะอาดแช่น้ำกลั่น 1 คืน แล้วมาปั่นให้ละเอียดในซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่มี 5 เปอร์เซนต์ โปลีไวนิลโปลีไพรโรลิโดน (polyvinyl polypyrrolidone, PVPP) 1 มิลลิโมลาร์ฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethyl-sulfonylfluoride,PMSF) เป็นองค์ประกอบ สารสกัดที่ได้นำไปปั่นตกตะกอนเพื่อนำกากเมล็ดทิ้งไป นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75 เปอร์เซนต์ นำไปผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟีที่บรรจุ DEAE-cellulose, Sephadex G-150 และ Phenyl-Sepharose ตามลำดับ ขบวนการทั้งหมดทำที่ 4 ° ซ

4.2.6 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var altissima)

นำเมล็ดปอแก้วมาทำความสะอาดแช่น้ำกลั่น 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง นำมาปั่นให้ละเอียดในซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่มี 0.05 โมลาร์ PMSF และ 5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) PVPP ปั่นในเครื่อง homognizer 3-4 ครั้งเป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้กรองผ่านผ้าขาวบางแล้ว ปั่นแยกกากเมล็ดออกที่ 10,000 xg เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาเติม 25 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) Dowex-X8 ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองยี่ห้อ Whatman เบอร์ 4 นำไปปั่นตกตะกอนที่ 10,000 xg อีก 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-65 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose โครมาโตกราฟฟี โดยใช้สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0-0.3โมลาร์ ใน 10 มิลลิโมลาร์โปแตส เซียมฟอสเฟต พีเอช 7.0 เป็นตัวชะ นำมาผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-300 โดยใช้ 100 มิลลิโมลาร์ NaCl, 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เป็นตัวชะ

4.2.7 การสกัดและเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* var sabdariffa)

นำเมล็ดกระเจี๊ยบมาทำความสะอาดและเตรียมสารสกัดหยาบโดยวิธีเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดหยาบจากเมล็ดปอแก้ว จากนั้นนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75 เปอร์เซนต์ นำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose, Sephadex G-200, Sephadex G-100 และ Sephadex G-200ตามลำดับ

4.2.8 การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์จำพวกอัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส

การศึกษาคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ต่างๆ ของเอนไซม์ที่สกัดและเตรียมให้บริสุทธิ์ได้บางส่วน ทำในวิธีเดียวกับที่อธิบายในบทที่ 3

4.3 ผลการทดลอง

4.3.1 การสกัดและเตรียมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วนางแดง (*Vigna umbellata*)

จากการทดลองเตรียมเอนไซม์ดังกล่าวพบว่าเตรียมเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ 10 เท่าได้ปริมาณ 28 เปอร์เซนต์ โดยมีเอนไซม์อื่นเจือปนอยู่บ้างคือมี เบต้า-กาแลคโตซิเดส 4.6 เปอร์เซนต์ เบต้า-เอ็น-อะซิติลกลูโคซามินิเดส น้อยกว่า 5 เปอร์เซนต์และเอ็น-อะซิติล กาแลคโตซามินิเดส 2.5 เปอร์เซนต์

4.3.2 การสกัดและเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์จากปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var altissima)

จากการทดลองเตรียม เอนไซม์ อัลฟา-แมนโนซิเดสดังกล่าวพบว่าได้เอนไซม์ที่บริสุทธิ์พอสมควร โดยมีเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดอื่นเจือปนอยู่บ้างน้อยกว่า 5 เปอร์เซนต์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่เตรียมได้

4.3.3 การสกัดและเตรียมเอนไซม์ที่บริสุทธิ์จากถ่อน (*Albizzia procera* Benth)

จากการทดลองเตรียมเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสให้บริสุทธิ์ สามารถเตรียมเอนไซม์ชนิดนี้จากเมล็ดถ่อนได้บริสุทธิ์พอสมควร (ตารางที่ 4.3) โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 35 เท่า และมีผลได้ 25 เปอร์เซนต์ เอนไซม์ที่เตรียมได้พบว่ามีเอนไซม์จำพวกไกลโค

Table 4.3 Purification of α-Mannosidase from *Albizzia procera* Benth.

Purification Step	Total Activity U	Total Protein mg	Specific Activity U/mg	Fold Purification	% Yield
Crude Extract	73.3	82.6	0.89	1	100
35-75% Ammonium sulfate	64.0	74.3	0.86	0.97	87.3
DEAE-cellulose (#160-199)	42.9	21.0	2.04	2.29	58.5
Sephadex G-150 (#33-45)	21.6	1.02	20.2	22.7	29.5
Phenyl-Sepharose	18.0	0.57	31.5	35.4	24.6

* Purification was performed from 50 g of imbibed seeds

Table 4.4 Extent of contamination of *Albizzia procera* α-mannosidase by other glycosidases

Substrate	Relative Activity
PNP-α-Mannoside	100
PNP-β-Galactoside	<0.25
PNP-β-Glc-Nac	0.76
PNP-β-Gal-Nac	<0.25
PNP-α-Galactoside	0.26

ซิเดสอื่นเจือปนอยู่น้อยกว่า 1 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 4.4) รูปที่ 4.1, 4.2 และ 4.3 แสดง profile ของการแยกเอนไซม์โดย คอลัมน์ DEAE cellulose คอลัมน์ Sephadex G-150 และคอลัมน์ Phenyl-Sepharose

ได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยการใช้วิธีแยกโดยวิธีอิเลคโตรโฟริสิสแบบที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพพบว่าปรากฏเป็นแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ซึ่งเมื่อย้อมด้วย 4-MU-glycoside จะพบมีแถบสว่างเกิดขึ้นในบริเวณแถบโปรตีนดังกล่าวนั้น เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-gel electrophoresis พบว่าจะยังคงมีแถบโปรตีนหลายแถบ โดยมีแถบที่คาดว่าเป็นเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณมากกว่า 100,000 ดาลตัน

4.3.4 การสกัดและการเตรียมเอนไซม์จากเมล็ดกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* var sabdariffa)

จากการทดลองพบว่าเมื่อเตรียมเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบได้บริสุทธิ์พอสมควร ดังแสดงในตารางที่ 4.5 คือสามารถทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นได้ 60 เท่า แต่ % yield ที่ได้ค่อนข้างต่ำ คือประมาณ 16.1% เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ด้วยการทำ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าปรากฏแถบโปรตีนหลายแถบ แสดงว่ายังมีโปรตีนชนิดอื่นอยู่ด้วยอย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ จำพวกโกลโคซิเดสชนิดอื่นที่อาจเจือปนอยู่ พบว่าใน pool II จะมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามินิเดสเจือปนอยู่เพียง 1.7 เปอร์เซนต์ และมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ อัล

Table 4.5 Partial purification of α-Mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var. sabdariffa

Purification Step	Total Activity U	Total Protein mg	Specific Activity	Fold Purification	% Yield
Crude Extract	71.6	1210.2	0.06	1	100
35-75% Ammonium sulfate	62.4	518.5	0.12	2.04	87.2
DEAE-cellulose	47.1	227.6	0.21	3.50	65.9
Sephadex G-200	38.2	40.6	0.94	15.9	53.4
Sephadex G-100	27.1	22.6	1.20	20.3	37.9
Sephadex G-200 Pool I	7.7	2.6	2.95	50.0	10.7
Sephadex G-200 Pool II	3.9	3.6	1.07	18.0	5.4

Table 4.6 Extent of contamination of α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var. sabdariffa by other glycosidases

Substrate	Relative Activity
PNP-alpha-Mannoside	100
PNP-beta-Galactoside	0.92
PNP-beta-Glc-Nac	1.70
PNP-alpha-Galactoside	1.57

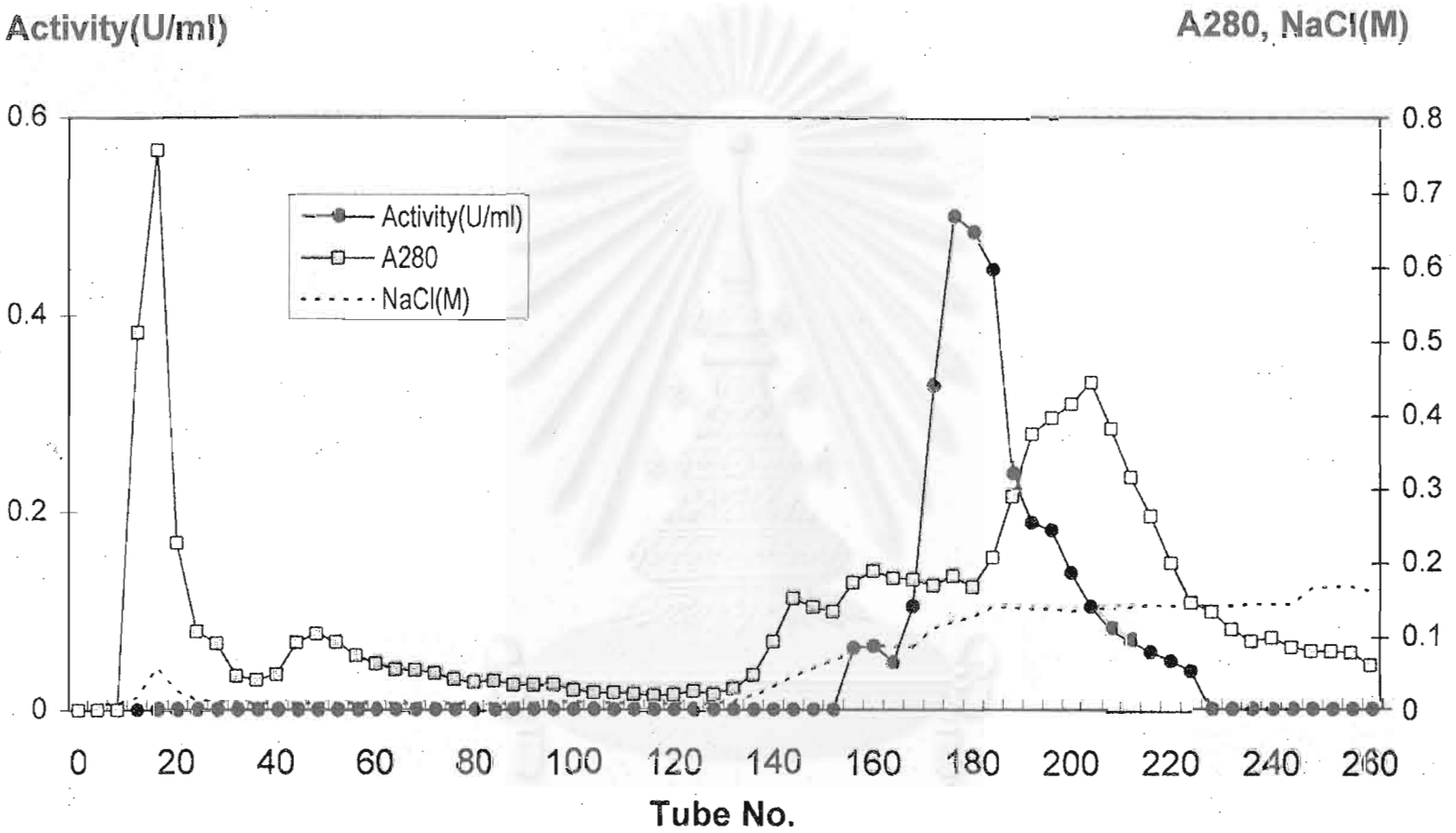


Figure 4.1 DEAE-cellulose chromatography of the dialysed ammonium sulphate fraction of *Albizzia procera* Benth.

● α-mannosidase activity; □ A_{280}; --- [NaCl]

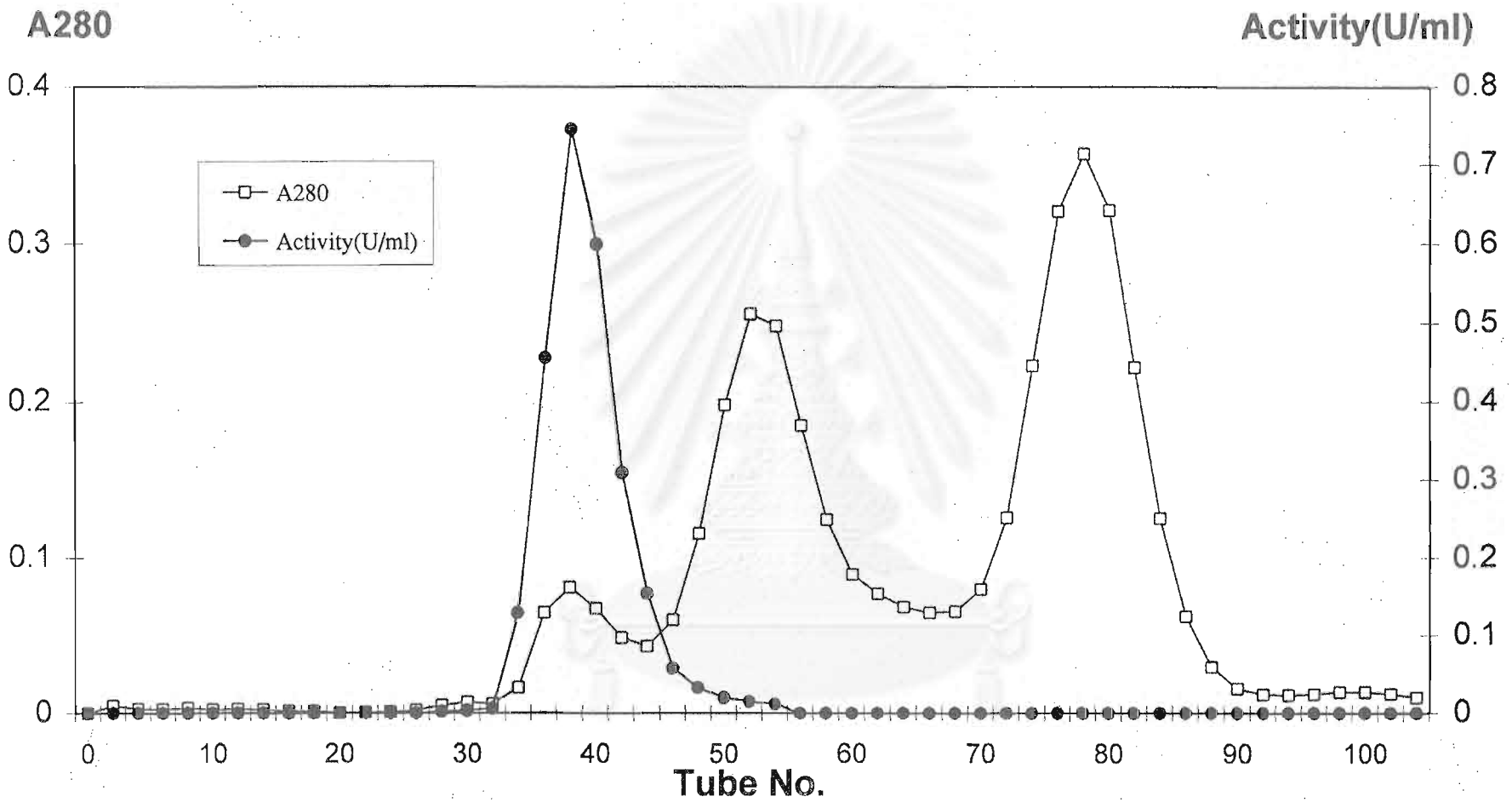


Figure 4.2 Sephadex G-150 chromatography of *Albizzia procera* Benth. α-mannosidase pool from DEAE-cellulose (Figure 4.1)
● α-mannosidase activity; □ A_{280}

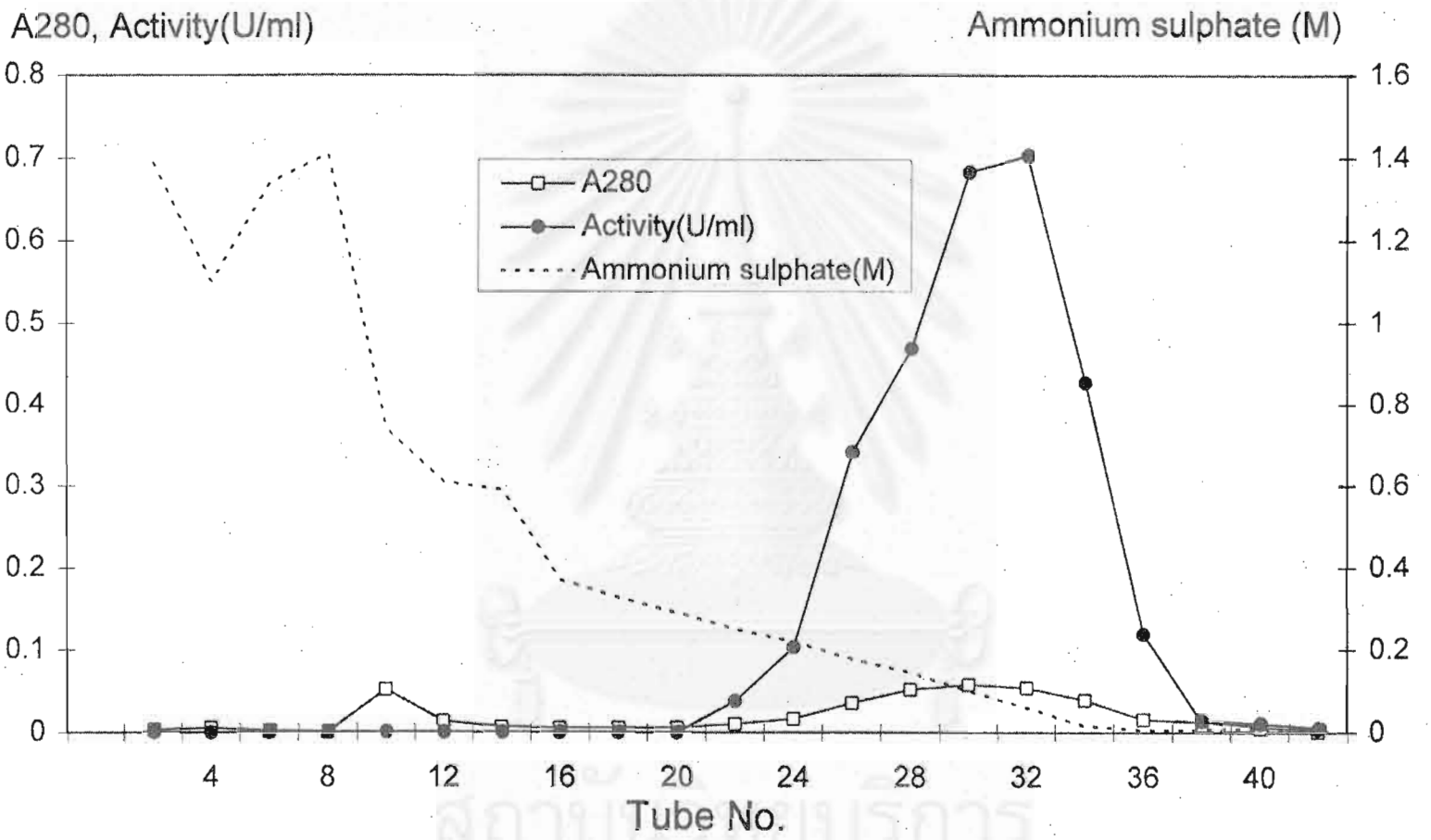


Figure 4.3 Phenyl-Sepharose chromatography of *Albizzia procera* Benth. α-mannosidase pool from Sephadex G-150 (Figure 4.2)

● α-mannosidase activity; □ A_{280}; --- [Ammonium sulphate]

ฟา-กาแลคโตซิเดสพบว่ามีเจือปนอยู่เพียง 1.57 เปอร์เซนต์ และมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดสเจือปนอยู่ 0.9 เปอร์เซนต์ (ดังแสดงในตารางที่ 4.6)

4.3.5 การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส

ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์จำพวกอัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสจากถ่อน (*Albizzia procera* Benth) มีความคงตัวดี สามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี้ไป คือ สามารถเก็บได้ถึง 2 เดือนโดยเก็บไว้ใน 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 4°ซ หรือเก็บโดยวิธีการทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว (quick freeze) แต่พบว่าเอนไซม์ทั้งหมดที่ศึกษาจะเก็บโดยวิธี lyophilized ไม่ได้เพราะจะทำให้สูญเสียแอคติวิตี้ไป นอกจากนี้การเก็บในสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว จะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี้ไปอย่างรวดเร็วมาก

4.3.6 ผลของสารประกอบประเภทสังกะสี ต่อการทำงานของเอนไซม์

สังกะสี (Zn^{2+}) เป็นธาตุที่พบว่าสามารถช่วยในการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส บางชนิดได้ ซึ่งจากการทดลองเติม $ZnCl_2$ ให้กับเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสจากเมล็ดถั่วนางแดงจะพบว่ามีผลในการช่วยความคงตัวของเอนไซม์มากขึ้น (data not shown) แต่สำหรับเอนไซม์อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดสที่เตรียมได้จากเมล็ดถ่อนและเมล็ดกระเจี๊ยบ การเติม $ZnCl_2$ ไม่มีผลต่อเอนไซม์แอคติวิตี้แต่อย่างใด

4.4 บทวิจารณ์

จากการศึกษาเรื่องการเตรียมเอนไซม์อัลฟ่า-ดี-แมนโนซิเดส จากเมล็ดพืชต่างๆ พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นกว่าเดิมได้ หรือไม่ให้มีแอคติวิตี้ ของเอนไซม์อื่นเจือปนมากกว่า 5 เปอร์เซนต์ได้สำเร็จ แต่ยังไม่สามารถเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยปราศจากเอนไซม์อื่นหรือโปรตีนอื่นเจือปนได้ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์มากพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีการใช้เอนไซม์

จากการศึกษาเอนไซม์แมนโนซิเดสจากเมล็ดถั่วแจ๊คจะพบว่าเอนไซม์จำพวกนี้มี heterogeneity และเมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะของเอนไซม์ที่แยกจากเมล็ดปอ กระเจี๊ยบและถ่อน พบว่ามีความจำเพาะต่อสับสเตรทพันธะต่างๆ เช่นเดียวกับเอนไซม์จากเมล็ดถั่วแจ๊ค

ส่วนการศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ของเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้จะได้กล่าวต่อไปในบทที่ 7

จุฬาลง

บทที่ 5

เอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้ว

5.1 บทนำ

เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสเป็นเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสชนิดหนึ่ง ที่พบว่าสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 5.1 ซึ่งเอนไซม์จำพวกนี้ได้มีการเตรียมให้บริสุทธิ์และศึกษากันอย่างกว้างขวางในเรื่องของกลไกการทำงานในธรรมชาติ เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในจุลินทรีย์ สัตว์และพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสในพวกแบคทีเรียในลำไส้ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางจนทราบถึงบทบาทการทำงานและการควบคุมในระดับจีนของเอนไซม์ดังกล่าวเป็นอย่างดี (56-58) ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่พบเอนไซม์นี้คือ *Pseudomonodaceae, Parvobacteriaceae และ Neisseriaceae* (59)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่าเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายสารจำพวกไกลโคลิปิด มิวโคโปลีแซคคาไรด์ และไกลโคโปรตีน พบได้ในลำไส้เล็กของสัตว์หลายชนิด ในน้ำย่อยของสัตว์จำนวนทาก ในน้ำลายและในสารคัดหลั่งของมนุษย์(58-60)

ในพืชมีการพบเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสในเมล็ดพืชหลายชนิดรวมทั้ง อัลมอนด์ ข้าวบาร์เลย์, Baptisia, Brassica, Cajanus, Carrot, Convovulus, Dolichos,French bean, Jack

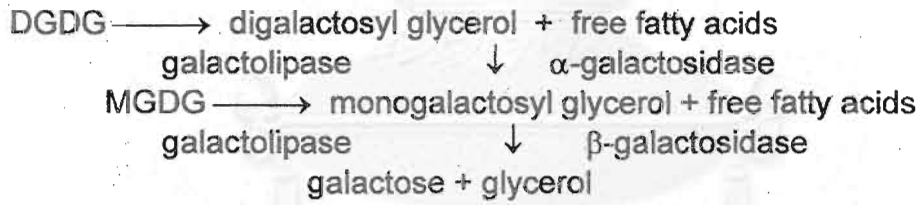
Table 5.1 Sources and properties of β-galactosidase enzymes

Source	Form	Method of separation	M.W.(kD)	pH optima	pI value	K_m oNP-β-gal mM	K_m pNP-β-gal mM
	I		-	4	7.1	-	1.48
Cajanus indicus	II	CM-cellulose	-	4	6.5	-	0.3
	III		-	4.5	6.1	-	1.2
Hordium valgare	I	Gelfiltration and CM-	65	-	-	-	-
	II	cellulose	48	4.2	-	-	-
	I	DEAE-cellulose and gel	74	3.2	-	-	2.3
Lupinus luteus	II	filtration	54	3.9	-	-	2.4
	III		65	3.1	-	-	1
Medicago sativa	I	Gel filtration	300	7.2-7.4	-	-	-
	II		180	4.2-4.4	-	-	-
Petunia hybrida	I		-	4.3	5.6	1	-
	II	Isoelectric focusing	-	4.3	5.9	1.3	-
	III		-	4.3	6.1	0.9	-
	IV		-	4.3	6.5	1.8	-
Vigna radiata	I		67	4	-	0.69	4.54
	II	DEAE-cellulose and CM-	83	4	-	2.63	4.35
	III	cellulose	96	4	-	1.25	4.16
	IV		44	4	-	2.77	0.66
Lens culinaris	I	DEAE-cellulose and CM-	-	4.5	-	-	0.13
	II	cellulose	-	5	-	-	0.25
Vigna sinensis	I		43.6	4.5	-	2.5	0.39
	II	DEAE-cellulose and gel	66.8	4.5	-	2.8	0.57
	III	filtration	54.3	4.5	-	2.8	0.82
	IV		79.4	4.5	-	2.8	0.5
	I	DEAE-sephadex, gel filtra-	144	3.8	6.7	-	0.32
Lycopersicon es-	II	tion and CM-sephadex	62	4.2	7.8	-	0.77
culentum L.	III		71	3.8	6.8	-	0.43
Raphanus sativus	I	CM-cellulose,hydroxyl- apatite, gel filtration and IEF	60	4	8.6-8.8	1.19	0.46
Tropacolum majus	I	DE-cellulose,CM-cellulose, chromatofocusing	70	4.0-5.0	6.6-7.1	-	-
Barley		Lactosyl Sepharose4B	70	4	5.0,5.1,5.4,5.7	1.35	-

Source	Form	Method of separation	M.W.(kD)	pH optima	pI value	K_m oNP-β-gal mM	K_m pNP-β-gal mM
Corn		Lactosyl Sepharose4B	68	4	4.5, 4.6	0.77	-
				3.6		-	-
Jack bean		Lactosyl Sepharose4B	65	4	6.9,7.7,8.3	0.53	-
Rye		Lactosyl Sepharose4B	69	4	4.7,4.9,5.4,6,	1.6	-
				4.4	6.56.6,7.1,7.2	-	-
					7.5,7.8,8.0		
Tobacco		Lactosyl Sepharose4B	46	4	5.2,5.25,5.9,	1.11	-
					6.6,6.7,7.1,7.4,		
					7.7,7.9,8.0		
Spinach		Lactosyl Sepharose4B	63	4	6.6,7.3	0.61	-
				4.4		-	-
Wheat germ		Lactosyl Sepharose4B	N.D.	4.5	4.9,5.0	8.4	-
						-	-
Feline liver	I	Con A Sepharose, DEAE-	700	4.1	4.9-5.7	-	4.9-5.7
	II	cellulose, Affinity chroma	130				
		tography and gel filtration					
Bovine testis	I	Con A Sepharose,	>600-700	-	-	-	-
Rat mammary	I	Gel filtration, Affinity	110, pH7.0	3.5			0.19
gland		chromatography	200, pH5.0				
Rat epididymal	I	Con A Sepharose, DEAE-	320, low pH	3.5	-	-	0.52
luminal fluid		cellulose, gel filtration	180,92, neutral				
Aspergillus niger	I	Gel filtration,ion exchange,	124	2.5-3.5	4.64	2.35	-
	II	hydrophobic chromato-	150	2.5-4.0	4.59	2.36	-
	III	graphy	173	3.2	4.55	2.38	-
Streptococcus 6646K	I	Affinity chrom, gel filtration	-	5.5	-	2.17	2.17
Saccharomyces	I	Ultrafiltration,gel filtration,	630	7	4.2	0.1	-
lactis	II	ion exchange chromato-	550	7	4.8	2.5	-
	III	graphy	41	7	4.5	2.6	-
	IV		19	7	5.2	12.5	-
Escherichia coli	I	Gel filtration, DEAE-	540	7	-	-	-
	II	celluiose chromatography	850-2325	7	-	-	-
Bacillus macerans	I		320	6.5			
Thermoaerobacter	I		154	6			

bean, Lupin, Medicago, ถั่วเขียว, Pea, Petunia, ข้าว, ข้าวโพด, ข้าวฟ่าง,ผักขม,อ้อย, Sycamore, Trifolium, ข้าวสาลี และ ในผลไม้หลายชนิด เช่น แอ๊ปเปิ้ล พีช แพร์ พลัม และมะเขือเทศ เป็นต้น(58) ซึ่งส่วนใหญ่จะพบในส่วนของเมล็ดและใบ หน้าที่ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสพบว่าอาจเกี่ยวข้องกับการสลายสารพวก กาแลคโตลิปิด โมโนกาแลคโตซิล ไดเอซิลกลีเซอรอลและไดกาแลคโตซิล ไดเอซิล กลีเซอรอล (61) และยังเกี่ยวข้องในการสลายผนังเซลล์ของพืช(58) ในเมล็ดพืชใบเลี้ยงคู่พบว่าเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับการสลายสารจำพวกไกลแคน (glycan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของเมล็ด(62) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จำพวกนี้เกี่ยวข้องกับขบวนการสุกของผลไม้ต่างๆ ด้วย (63) ตัวอย่างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสและคุณสมบัติ แสดงในตารางที่ 5.1

Figure 5.1 Pathway for degradation of MGDG, and DGDG to galactose, glycerol, and free fatty acids through concerted efford of galactolipase, α-galactosidase, and β-galactosidase (61).



ได้มีความพยายามนำเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสมาใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้เป็นผลสำเร็จ (22) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะหาแหล่งของเอนไซม์ชนิดนี้จากเมล็ดพืชที่พบในประเทศไทยเพื่อศึกษาคุณสมบัติและพยายามนำมาใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป

5.2 วัสดุและวิธีการ

5.2.1 เมล็ดพืชได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

5.2.2 การวัดเอนไซม์แอคติวิตี้วิธีมาตรฐาน

ปฏิกิริยาประกอบด้วย 850 ไมโครลิตรของ 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0, 50 ไมโครลิตรของเอนไซม์ และ 100 ไมโครลิตรของ 0.01 โมลาร์พารา ไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กาแลคโตไซด์ เริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสับสเตรท แล้วบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 2 มิลลิลิตรของ 2 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต วัดปริมาณพาราไนโตรฟีนอล ที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถสลายสับสเตรทแล้วได้พาราไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 30^{o}ซ ในสารละลายพีเอช 5.0

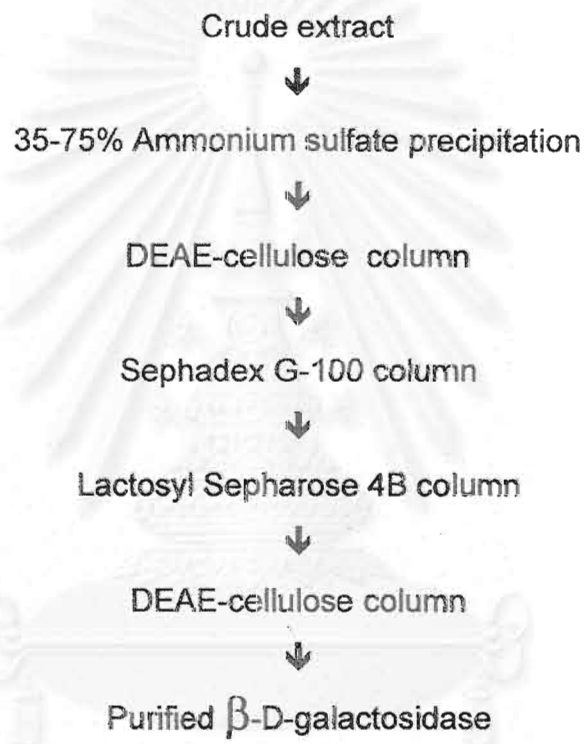
5.2.3 การสกัดและเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

กระบวนการสกัดและเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ทั้งหมดทำที่4 ^{o}ซ สารสกัดหยาบ (crude extract) ของเอนไซม์เตรียมโดย นำ 50 กรัมของเมล็ดปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* L. var altissima) มาทำความสะอาดด้วยสารละลาย 5 เปอร์เซนต์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง นำมาบดให้ละเอียด กรองผ่านผ้าขาวบาง บีบเอาน้ำออกให้หมดนำไปปั่นที่ 10,000 xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาเติม 25 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ของ Dowex 2X-8 กวนทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

เพื่อกำจัดสารพวก phenolic compound กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 แล้วปั่นอีกครั้งที่ 10,000 xg เป็นเวลา 30 นาที ส่วนน้ำใสที่ได้เรียกว่า crude extract จากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75 เปอร์เซนต์ เพื่อตกตะกอนโปรตีน นำไปปั่นที่ 10,000 xg เป็นเวลา 40 นาที นำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายใน 10 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ขนาด 2.0 x 15 ซม. ที่บรรจุ DEAE -cellulose ที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกัน ใช้ 0-0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์เดียวกันเป็นตัวชะ (3+3 เท่า ปริมาตรคอลัมน์) และตามด้วย 1.0 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ในสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกันอีก 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราเร็วของการไหล 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตรวจหาปริมาณโปรตีนและเอนไซม์แอคติวิตี้ จากนั้นนำส่วนที่มีเอนไซม์มารวมกันแล้วทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการใช้ ultrafiltration นำไปผ่านคอลัมน์ขนาด 1.5 x 80 ซม. ที่บรรจุ Sephadex G-100 ที่อยู่ใน 10 มิลลิโมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 50 มิลลิโมลาร์ของโซเดียมคลอไรด์อยู่ด้วย โดยใช้อัตราการไหลผ่านคอลัมน์เป็น 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตรวจหาปริมาณโปรตีนและเอนไซม์แอคติวิตี้ แล้วนำส่วนที่มีเอนไซม์แอคติวิตี้มารวมกันนำไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultrafiltration อีกครั้งหนึ่งแล้วนำไปผ่านคอลัมน์ขนาด 1.2 x 12 ซม. ที่บรรจุ Lactosyl Sepharose 4B ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ด้วยอัตราไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ล้างคอลัมน์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 แล้วใช้ 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 ด้วยปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ เป็นตัวชะ ส่วนที่มีเอนไซม์แอคติวิตี้ที่ได้จาก Lactosyl Sepharose 4B นี้นำไปผ่านคอลัมน์ขนาด 1 x 9 ซม. DEAE-cellulose ที่อยู่ใน 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 อีกครั้งหนึ่ง ล้างด้วย 2 ปริมาตรคอลัมน์ของ 0.1 โมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 ตามด้วย 1 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ 2

ปริมาตรคอลัมน์ ใช้อัตราการไหล 50 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตรวจวัดเอนไซม์แอคติวิตี้และปริมาณโปรตีน แผนภาพแสดงการเตรียมเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสให้บริสุทธิ์แสดงในรูปที่ 5.2

รูปที่ 5.2 Purification of β-D-galactosidase from crude extract



5.2.4 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วย SDS-PAGE โดยใช้ 10 % slab gel และใช้ rabbit muscle myosin (205 kD), *E coli* β-galactosidase(116 kD), rabbit muscle phosphorylase b (97.4 kD), bovine serum albumin (66 kD), ovalbumin (45 kD) และ carbonic anhydrase (29 kD) เป็นสารมาตรฐาน ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R

นอกจากนี้ยังตรวจสอบความบริสุทธิ์ ของเอนไซม์โดยใช้การทำอิเลคโตโฟริสิสในสภาพธรรมชาติ โดยใช้ 4% Polyacrylamide gel แล้วย้อมเอนไซม์ด้วย 4- methylumberriferyl- β-D-galactopyranoside (4-MU-Gal) นอกจากนี้ยังตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลในสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ดังกล่าว ด้วยการทำ Gel filtration column chromatography โดยใช้ Sephadex G-200 (1.8 x 90 ซม.) ในสารละลาย 0.2 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ใน 10 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 โดยใช้ β-amylase (200 kD), bovine serum albumin (66kD), ovalbumin (45 kD) และ cytochrome C (12.4 kD) เป็นสารมาตรฐาน

5.2.5 การตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดที่กำลังงอก

นำเมล็ดปอแก้วมาทำความสะอาด ด้วย 0.1 เปอร์เซนต์โซเดียมไฮโปคลอไรต์ แล้วแช่น้ำกลั่นทิ้งไว้ 1-2 วันที่อุณหภูมิห้อง หลังจาก 2 วัน นำเมล็ดไปเพาะบนผ้าขาวบางในกล่องพลาสติกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1, 2 หรือ 3 วัน จากนั้นเลือกเมล็ดที่อยู่ในระยะเดียวกัน คือมีความยาวรากเท่าๆ กัน มาเตรียมสารสกัดหยาบเพื่อตรวจสอบเอนไซม์แอคติวิตี้

5.2.6 การตรวจสอบคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์

นำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มาตรวจสอบคุณสมบัติทางจลนศาสตร์ต่างๆ ได้แก่

5.2.6.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อย

5.2.6.2 พีเอชที่เหมาะสมในการย่อย

5.2.6.3 ผลของโลหะ อนุพันธ์ของน้ำตาลและสารอื่นๆ

5.2.6.4 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

5.2.6.5 การหาค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรทต่างๆ

ซึ่งการศึกษาทั้งหมดนี้ทำโดยใช้วิธีการวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์ ตามวิธีมาตรฐานแต่ใช้สภาวะต่างๆกัน ออกไป

5.2.7 Heterogeneity ของเอนไซม์

ทำการตรวจสอบ Heterogeneity ของเอนไซม์ด้วยการใช้เทคนิคการทำ Isoelectric focusing โดยใช้ Bio-Rad minigel IEF เตรียมโปลีอะคริลาไมด์เจล (5 ml) ที่มี 1.0 ml monomer concentrate stock solution (ประกอบด้วย 24.7 % อะคริลาไมด์ และ 0.75 % บิสอะคริลาไมด์ 5 % (โดยปริมาตร) กลีเซอรอลและ 2 % ไบโอไลต์ (พีเอช 3-10) โดยใช้กระแสไฟฟ้าดังนี้ 100 โวลท์ 15 นาที, 200 โวลท์ 15 นาที และ 450 โวลท์ 50 นาที ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue - G 250 และย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์ด้วย 4-MU-β-galactoside

นอกจากนี้ยังตรวจสอบโดยการทำ chromatofocusing โดยใช้คอลัมน์ขนาด 1.0 x 10.5 ซม. ในสารละลาย 0.025 โมลาร์ เอทธาโนลามีน บัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์นี้ 1 ปริมาตรคอลัมน์ แล้วตามด้วย 5 เปอร์เซนต์ (โดยปริมาตร) ของ polybuffer 74 ที่ปรับพีเอชเป็น pH 5.0 ดังนั้นจะมีการสร้าง pH gradient ระหว่าง 5.0 ถึง 9.0 ในระหว่างการแยก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 ผลการทดลอง

5.3.1 ผลของการงอกของเมล็ดต่อปริมาณเอนไซม์

จากการศึกษาผลของการงอกของเมล็ดต่อปริมาณเอนไซม์เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส พบว่าเมล็ดจะงอกช้าในระยะ 2 วันแรก แต่จะงอกเร็วขึ้นในระยะที่ 3 วันหลัง ทั้งเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส และอัลฟา-แมนโนซิเดสจะมีการเพิ่มปริมาณสูงสุด หลังจากแช่น้ำทิ้งไว้ 2 วัน แล้วลดลงระหว่างที่มีการงอก (ดังแสดงในตารางที่ 5.2) ดังนั้นการแช่น้ำ 2 วัน จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดที่จะแยกสกัดเอนไซม์

5.3.2 ผลของการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

ผลของการเตรียมเอนไซม์ตามขั้นตอนต่างๆ แสดงในตารางที่ 5.3 จะเห็นได้ว่าการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะช่วยกำจัดโปรตีนอื่นออกไปได้มาก ในขณะที่เอนไซม์ยังคงไม่มีการเสียแอคติวิตี้ไป การแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-cellulose ที่พีเอช 7.0 พบว่าสามารถแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสออกจากเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสได้ โดยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจะจับติดกับ DEAE - cellulose ในคอลัมน์ขณะที่เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจะไม่ติดและออกมาก่อน ดังแสดงในรูปที่ 5.3 ขั้นตอนนี้จึงเป็นขั้นตอนที่ได้ผลดีสำหรับการแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสออกจากเบต้า-กาแลคโตซิเดส และยังสามารถกำจัดโปรตีนชนิดอื่นๆออกไปได้อีกมากด้วย จากตารางที่ 5.3 แสดงว่าขั้นตอนต่างๆนี้สามารถเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นถึง 15 เท่า การใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 จะช่วยแยกเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสออกจากเอนไซม์อัลฟา-กาแลคโตซิเดส แต่ยังมีช่วงที่ซ้อนกันอยู่บ้าง ดังแสดงในรูปที่ 5.3 ทำให้ต้องแยกการเก็บเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสออกเป็น 2 ส่วน คือ pool 2 (หลอด

Table 5.2. **Effect of imbibing and germination on the content of β-galactosidase and α-mannosidase from the seeds of *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima***

Day of Treatment	% Seed selected*	Morphology of germinating seed selected	Activity (U) β-gal per g seed**	Specific activity U β-gal/mg	Activity (U) α-man per g seed**	Specjfic activity U α-man/mg	Weight (g) of , seed, root, plantlet per g seed**
Imbibing							
1	97	root 1 mm	1.15	0.034	1.04	0.03	2.15
2	98	root 2 mm	1.79	0.037	1.35	0.028	2.47
Germination							
1	98	root 5-10 mm	0.74	0.026	0.84	0.031	3.1
2	76	root 10-15 mm, plant 20-30 mm	0.74	0.026	0.91	0.032	4.66
3	71	root 15-20 mm, plant 50-100 mm	0.41	0.011	0.83	0.029	8.92

* % Seed selected was calculated from the number of seeds with the specified morphology, used for crude extract preparation compared to the number of seeds at the start.

** g seed refers to the weight of original seed corresponding to the selected group.

Table 5.3. Purification of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* seeds

Purification Steps	Total activity unit (U)	Total protein mg	Specific activity U/mg	Purification Fold	Yield (%)
Crude extract	70.2	2430	0.029	1	100
35-70 % $(NH_4)_2SO_4$ fraction	58.8	414	0.14	4.8	84
DEAE-cellulose chromatography	43.9	20.2	2.17	75	63
Sephadex G-100 filtration					
Pool 1 (with α-gal)	25.7	10.6	2.42	83	37
Pool 2 (without α-gal)	14.1	6.96	2.02	70	20
Affinity chromatography					
from Pool 1 (with α-gal)	19.3	6.66	2.91	100	27
from Pool 2 (without α-gal)	13.9	2.39	5.82	201	20
DEAE-cellulose chromatography					
from Pool 1 (with α-gal)	12.14	0.947	12.8	442	17
from Pool 2 (without α-gal)	8.88	0.353	25.2	868	13

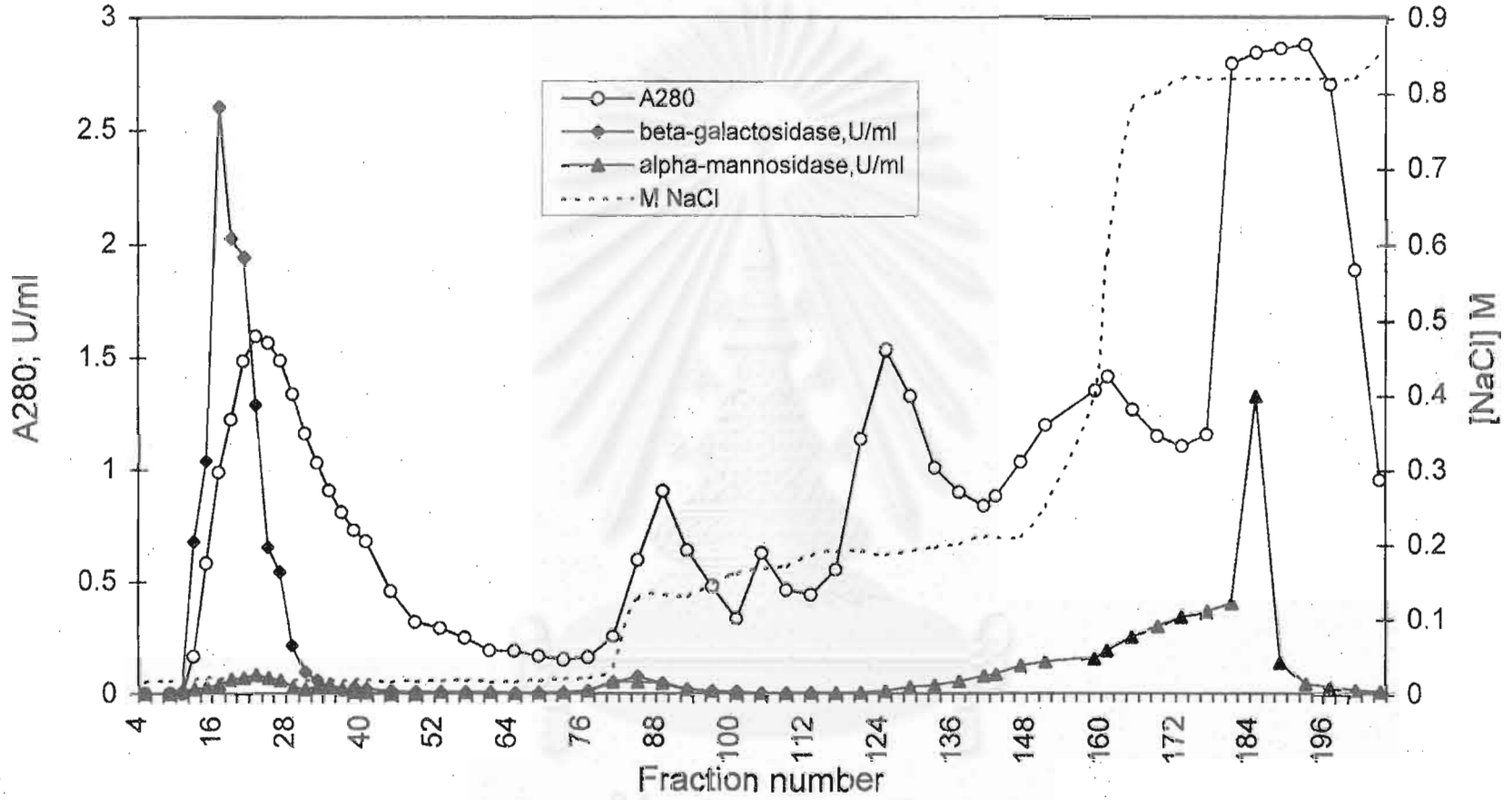


Figure 5.3 DEAE-cellulose chromatography of the dialyzed 35-70% ammonium sulfate fraction from Thai Jute seeds. The column (2.0 x 15 cm) was washed with 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, followed by a gradient of 0 - 0.2 M NaCl in the same buffer (starting at tube 50), and then by 1.0 M NaCl in the same buffer. -○- A_{280}; -◆- β-galactosidase activity; -▲- α-mannosidase activity; ----- [NaCl], M.

ที่ 41-50) มี เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสที่ไม่มีอัลฟา-กาแลคโตซิเดสปน และ pool 1 (หลอดที่ 33-40) มีเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสปนอยู่กับอัลฟา-กาแลคโตซิเดส(ซึ่งมีปริมาณ 4%) ดังแสดงในรูปที่ 5.4

เมื่อนำส่วนที่แยกจาก Sephadex G-100 มาทำให้บริสุทธิ์ต่อด้วยการนำไปผ่านคอลัมน์ของ Lactosyl-Sepharose พบว่าสามารถแยกโปรตีนอื่นออกไปได้อีกบางส่วน ดังแสดง และพบว่าเมื่อทดลองใช้ 1.0 โมลาร์น้ำตาลแลคโตสเป็นตัวชะ ให้ผลไม่ดีเท่าเมื่อใช้ 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 เป็นตัวชะ และเพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จึงนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง จะได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยมีการกำจัดอัลฟา-กาแลคโตซิเดสออกไปได้อีกบางส่วน

จากตารางที่ 5.3 จะพบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้ถึง 868 เท่าโดยมี % yield เป็น 13 % และสามารถเตรียมเอนไซม์ที่ยังมีเอนไซม์อัลฟา-กาแลคโตซิเดสปนอยู่บ้าง (น้อยกว่า 5 %) ให้บริสุทธิ์ได้ 442 เท่า โดยมี % yield เป็น 17 %

5.3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยใช้ SDS-PAGE พบว่าปรากฏเป็นแถบโปรตีนแถบเดียวบนแผ่นเจล (รูปที่ 5.5) โดยแถบโปรตีนที่ได้มี น้ำหนักโมเลกุลเป็น 66 kD เมื่อเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลในสภาพธรรมชาติซึ่งคำนวณจากค่าที่ได้จากการผ่าน Sephadex G-200 ซึ่งแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 kD แสดงว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วยหน่วยย่อยเพียงหน่วยเดียวเท่านั้นดังแสดงในรูปที่ 5.6

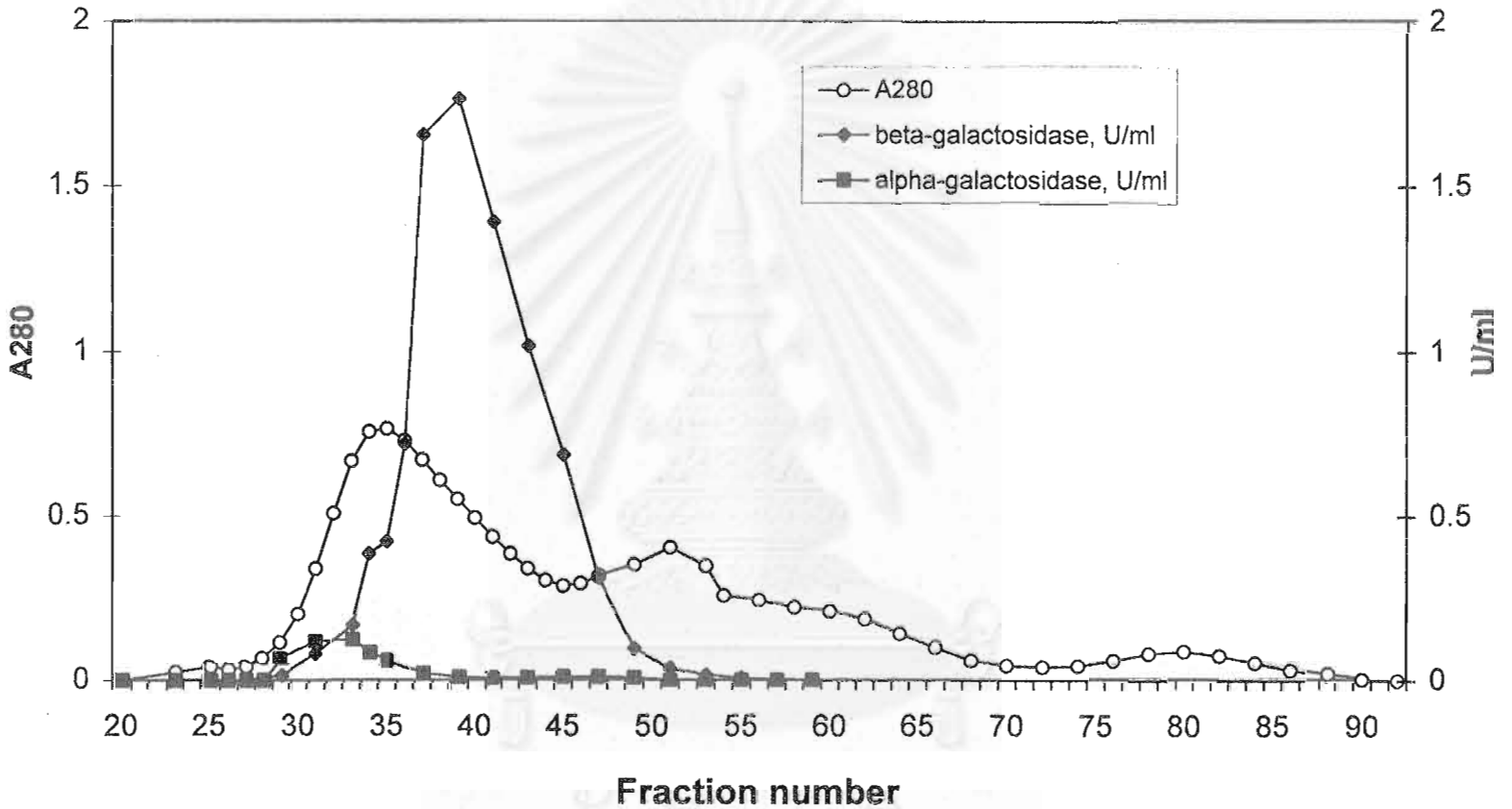


Figure 5.4 Sephadex G-100 chromatography of the unbound DEAE-cellulose fraction from Figure 5.3. The column (1.5 x 80 cm) was eluted with 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 containing 50 mM NaCl. -O- A_{280}; -◆- β-galactosidase activity; -■- α-galactosidase activity;

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 5.5 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* β-galactosidase on a 10 % slab gel. *Lane 1:* purified β-galactosidase (5 μg); *Lane 2*: high molecular weight markers (205 kD, 116 kD, 97 kD, 66kD, 45 kD and 29 kD).

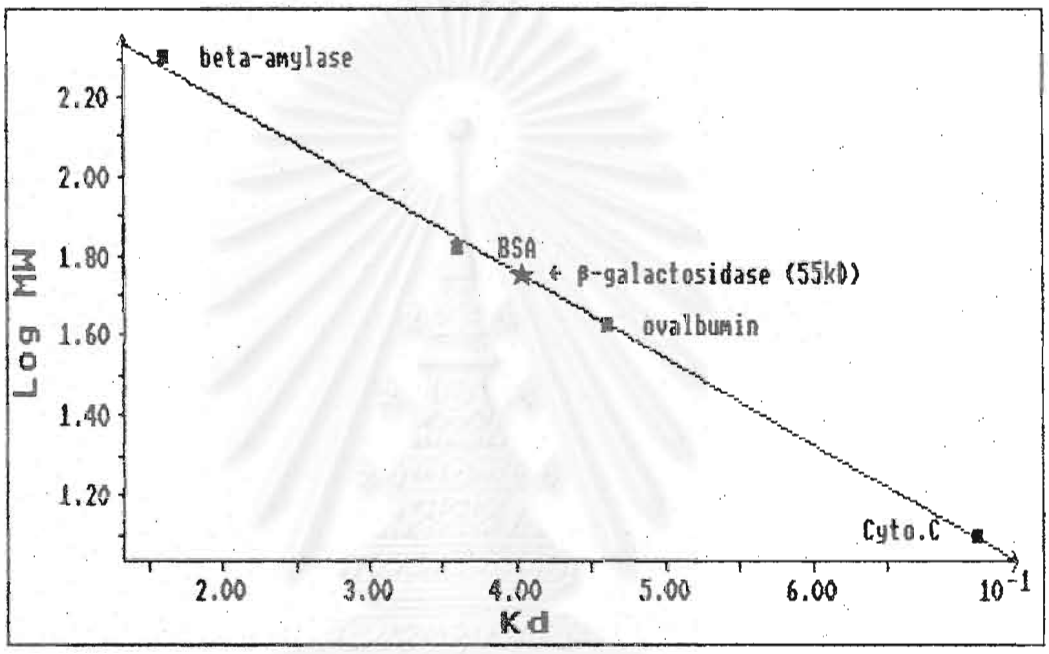


Figure 5.6 Molecular weight detemination of native β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima* on Sephadex G-200 chromatography.

5.3.4 คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์

5.3.4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสับสเตรทที่เป็น p-Nitrophenyl-β-D-galactoside คือ 55^{o} ซ ดังแสดงในรูปที่ 5.7

5.3.4.2 pH ที่เหมาะสมในการย่อยสับสเตรท

เมื่อทำการทดลองวัดเอนไซม์แอคติวิตี้ในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างๆ กันคือ pH 2.7, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ค่า pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์นี้คือที่ pH 4.0 ดังแสดงในรูปที่ 5.8

5.3.4.3 ผลของโลหะ อนุพันธ์ของน้ำตาล และสารอื่นๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เตรียมได้บริสุทธิ์พบว่า ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5.4 กล่าวคือ $HgCl_2$ และ p-hydroxymercuribenzoate (p-HMB) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสได้ถึงประมาณ 90 % ในขณะที่ iodoacetic acid (IAA) มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้บางส่วน (ประมาณ 30%) ในขณะที่ NaF, $CaCl_2$, LiOH, CdOAc, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, NiOAc, และ EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ (ตารางที่ 5.4)

นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์ของน้ำตาลกาแลคโตสส่วนใหญ่จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ยกเว้น isopropyl-β-Thio-galactopyranoside (IPTG) และ p-aminophenyl -β-D-galactopyranoside ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ถูกยับยั้งได้

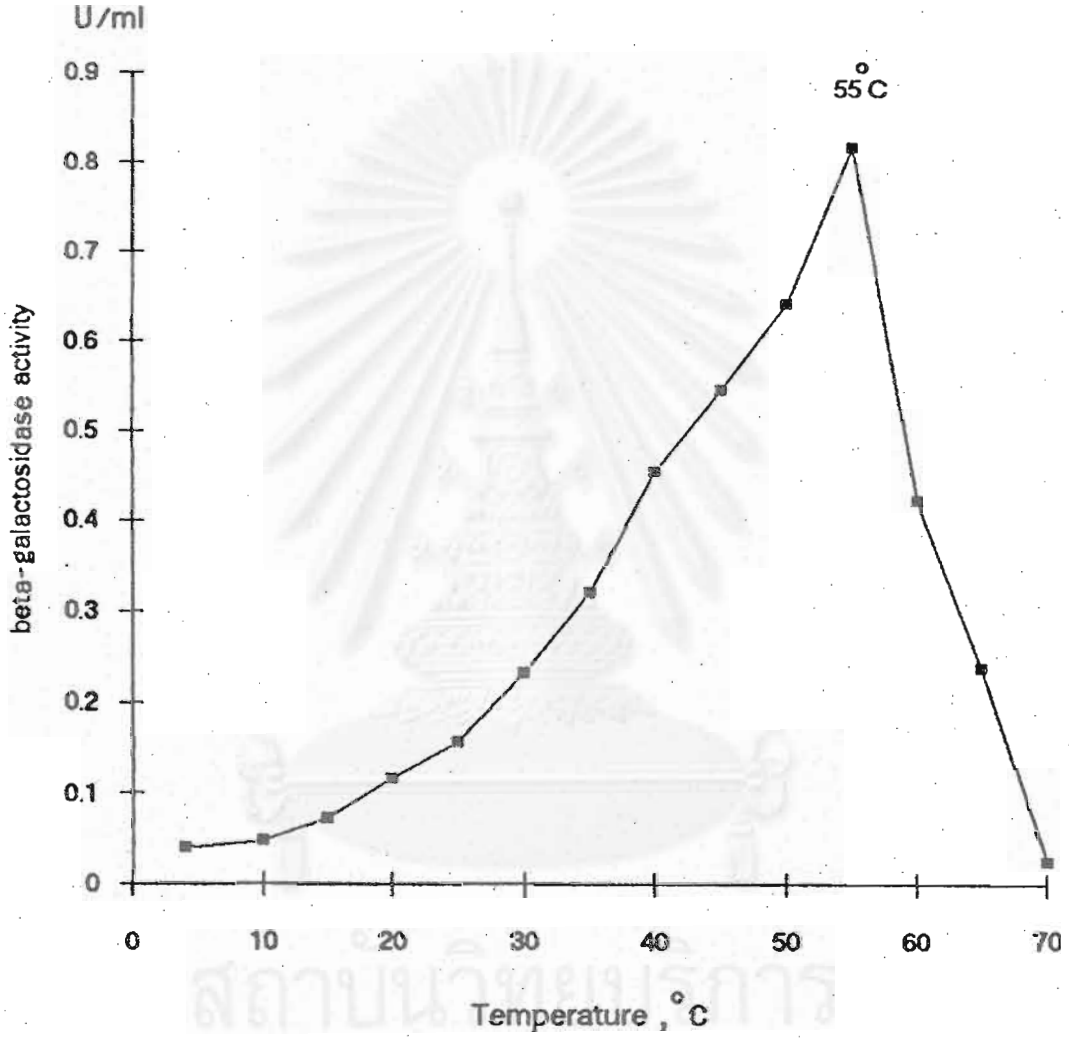


Figure 5.7 Determination of optimum temperature of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*.

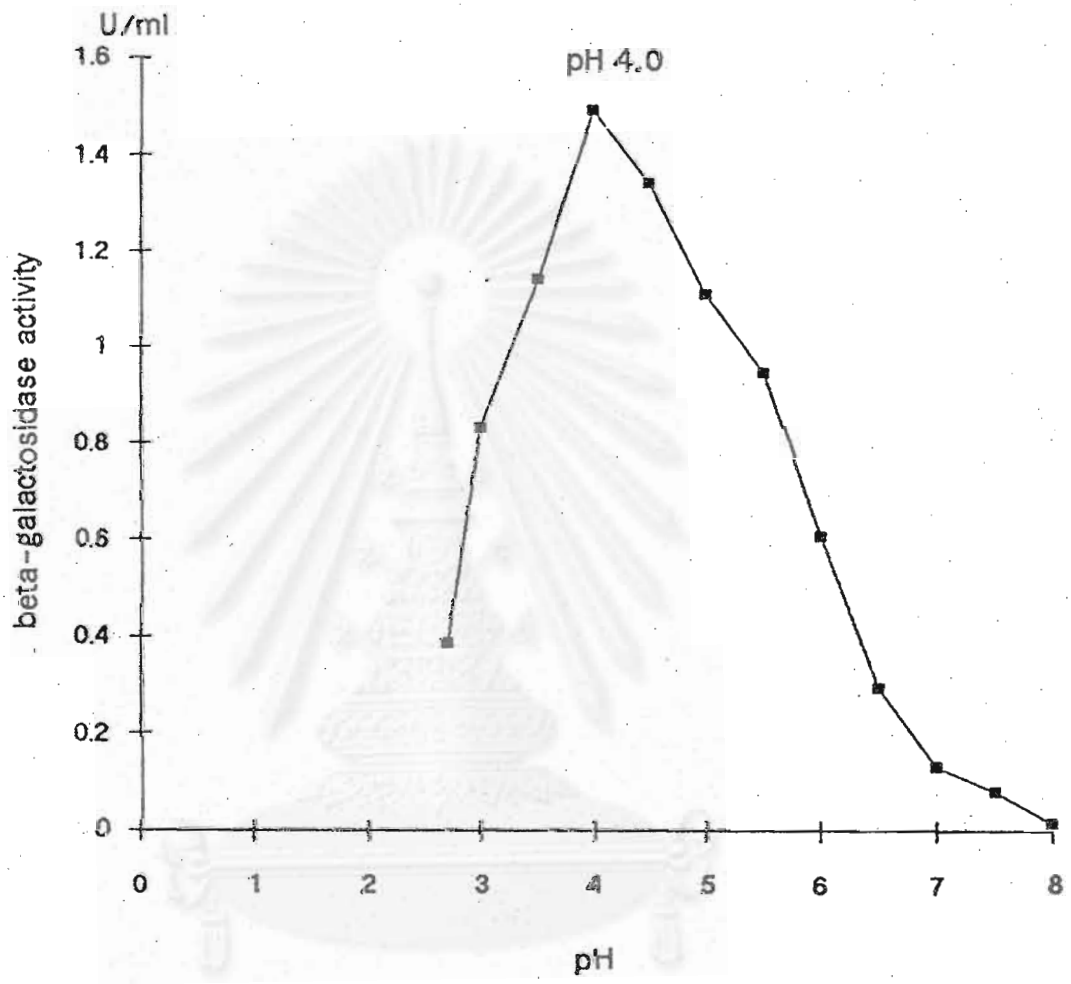


Figure 5.8 Determination of optimum pH of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*.

Table 5.4. Effect of various substances on the activity of β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*

Substance	Concentration (mM)	Relative Activity (%)
Control	-	100
$MgCl_2$	1	111
KCN	1	110
NiOAc	1	105
$CuSO_4$	1	108
$CaCl_2$	1	106
NaF	1	105
LiOH	1	103
CdOAc	1	95
$ZnSO_4$	1	93
EDTA	1	96
$HgCl_2$	1	1
Iodoacetic acid (IAA)	1	71
p-Hydroxymercuribenzoate (PHMB)	1	2
Isopropyl-thio-β-galactoside (IPTG)	1	95
Methyl-β-galactoside	5	9
Methyl-α-galactoside	5	2
p-NP-α-galactoside	5	26
p-Aminophenyl-thio-β-galactoside	5	105
p-Aminophenyl-β-galactoside	5	92
Phenyl-β-galactoside	5	53
Galactono-1,4-lactone	5	5
Glucono-1,5-lactone	5	85
D-Galactal	5	9
D-Galactose	5	27
β-Lactose	50	84

Enzyme was preincubated with each substance for 30 min and then assayed with 1 mM pNP-β-D-galactopyranoside in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0 at 30° C.

มากกว่า 90% ด้วย methyl-β-D-galactopyranoside, methyl-α- D-galactopyranoside, galactono-1,4-lactone และ D-galactal ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ pNP-α-D-galactopyranoside และ phenyl-β-D-galactopyranoside จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 74 และ 47 % ตามลำดับ ในขณะที่ 50 มิลลิโมลาร์ เบต้า-แลคโตส และ 5 มิลลิโมลาร์ กลูโคโน-1,5-แลคโตน ยับยั้งเอนไซม์แอคติวิตี้ได้เพียง 15 % ดังแสดงในตารางที่ 5.4

5.3.4.4 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

ผลการวัดแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยใช้อนุพันธ์พาราไนโตรฟีนอลของน้ำตาลอื่นๆ 12 ชนิดพบว่ามีความจำเพาะต่อสับสเตรท pNP-β-D-galactopyranoside สูงกว่าอนุพันธ์ pNP ของน้ำตาลอื่นมาก และมีแอคติวิตี้ ต่อ pNP-α-L-arabinopyranoside เพียง 6% ของที่มีเมื่อเทียบกับ pNP-β-D-galactopyranoside

5.3.4.5 การหาค่า K_m และ V_{max} ต่อสับสเตรทต่างๆ

ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์ต่อ pNP-β-D-galactoside, oNP-β-D-galactoside และ β-lactose แสดงในตารางที่ 5.5 ค่าอัตราส่วน V_{max}:K_m แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จะสามารถย่อย pNP-β-D-galactoside ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ oNP-β-D-galactoside และ β-lactose เป็นสับสเตรทที่ไม่ค่อยดีของเอนไซม์ชนิดนี้

5.3.5 การศึกษา Heterogeneity ของเอนไซม์ โดยใช้ส่วนที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose

Table 5.5. Kinetic properties of *Hibiscus sabdariffa* var. *altissima* β-galactosidase

Substrate	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min/μg protein)	V_{max}/K_m (nmol/min/μg/mM)
p-NP-β-D-Galactoside	0.80 ± 0.02	53.3 ± 0.3	66.1
o-NP-β-D-Galactoside	12.8 ± 0.51	14.2 ± 0.3	1.11
β-Lactose	84.7 ± 1.28	5.0 ± 0.3	0.060

Reactions were performed in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0 at 30°C ;
values represent mean ± S.D, determined by regression analysis.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาด้วยการทำ isoelectric focusing บน polyacrylamide gel pH 3-10 พบว่ามี heterogeneity ของเอนไซม์ โดยพบว่าเมื่อย้อมแอคติวิตี้ของเอนไซม์โดยใช้ 4-MU-β-D-galactopyranoside เป็นสับสเตรทจะพบแถบโปรตีนหลายแถบ

จากการทำ Chromatofocusing column ในช่วง pH 5.0-9.0 โดยใช้ polybuffer exchanger 94 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้เป็น basic protein และจากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 5.9 พบว่าสามารถแยกออกได้เป็น 8 peak ด้วยกัน และเมื่อนำทั้ง 8 peak ไปทำ isoelectric focusing ช่วง pH 3-10 บน 5 % polyacrylamide slab gel พบว่ามีแอคติวิตี้ของเอนไซม์จริงในทุก peak แสดงว่าเอนไซม์นี้มีหลาย isozyme

5.4 บทวิจารณ์

เนื่องจากผลการตรวจสอบหาเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสจากพืชตระกูล Malvaceae และ Tiliaceae ได้แก่กระเจี๊ยบและปอ ที่มีระดับเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดสค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบหาปริมาณเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสอื่นอีก 9 เอนไซม์จากเมล็ดพืชในตระกูลนี้ เท่าที่สามารถจะหาได้ในประเทศไทย เอนไซม์ที่ทำการตรวจสอบ ได้แก่ เอนไซม์ อัลฟา-ดี-กาแลคโตซิเดส (α-D-galactosidase) เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส (β-D-galactosidade) อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส (α-D-mannosidase) อัลฟา-ดี-กลูโคซิเดส (α-D-glucosidase) เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส (β-D-glucosidase) อัลฟา-แอล-ฟิวโคซิเดส (α-L-Fucosidase) เบต้า-ดี-เอ็น-อะซิติลกลูโคซิเดส (β-D-N-acetylglucosaminidase) และอัลฟา-แอล-อะราบิโนซิเดส (α-L-arabinosidase) โดยพืชที่ทำการตรวจสอบ ได้แก่ กระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdinosidariffa* L. var. altissima) 4 ชนิด ปอคิวบา (*Hibiscus cannabinus*

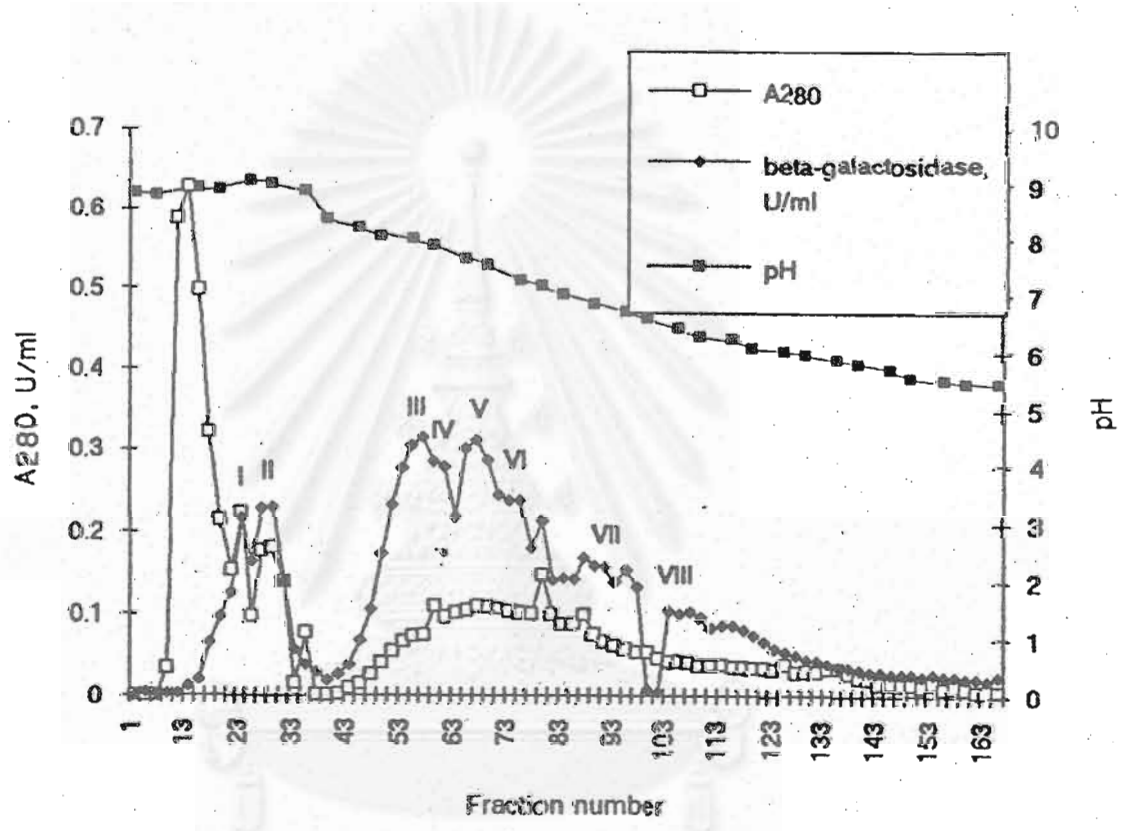


Figure 5.9 Chromatofocusing profile of partially purified β-galactosidase in the pH range 5.0 to pH 9.0 The column was eluted with a gradient (10 volumes) of 5% polybuffer PBE 94 and 5% polybuffer 74 adjusted to pH 5.0. Fractions were pooled into 8 pools which were further analysed by isoelectric focusing

L.) 2 ชนิด ฝ้าย 2 ชนิด (*Gossypium hirsutum* L. และ *Gossypium arboreum* L.) ปอกระเจา 2 ชนิด (*Corcorus olitrorius* L. และ *Corcorus capsularis* L.) และการตรวจสอบพบว่า ปอแก้ว 2 ชนิดมีปริมาณเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดส สูงกว่า 1 หน่วยต่อกรัมเมล็ด ขณะที่เมล็ดพืชชนิดอื่นมีค่าอยู่ระหว่าง 0.5-1 หน่วยต่อกรัมเมล็ด ขณะที่ฝ้ายและปอกระเจามีระดับเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส น้อยกว่า0.5 หน่วยต่อกรัมเมล็ด สามารถพบเอนไซม์ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส ได้ในเมล็ดพืชทุกชนิดที่ทำการตรวจสอบ และเมล็ดพืชบางอย่างเช่นกระเจี๊ยบแดง ยังพบระดับสูงมากกว่า 1 หน่วยต่อกรัมเมล็ดอีกด้วย ทำให้น่าสนใจจะศึกษาเมล็ดกระเจี๊ยบแดงนี้ต่อไป เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์ อัลฟา-ดี-แมนโนซิเดส สูงกว่า เอนไซม์ เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดสเสียอีกส่วนเอนไซม์อื่นๆ พบในปริมาณที่น้อยเกินกว่าจะสามารถนำมาแยกสกัดได้ (รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2.1) จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้สามารถเลือกนำเมล็ดปอแก้ว 2 ชนิดและเมล็ดกระเจี๊ยบแดงมาทำการแยกสกัดเอนไซม์เพื่อศึกษาในรายละเอียดต่อไป

ก่อนที่จะทำการแยกสกัดเอนไซม์ได้ทำการศึกษาหาช่วงเวลาที่มีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้ในการสกัด โดยตรวจหาปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดแห้ง เมล็ดแช่น้ำและเมล็ดที่กำลังจะงอก ผลการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์ เบต้า-ดี-กาแลคโตซิเดส จะเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากแช่น้ำไว้ 2 วัน หลังจากนั้น เมื่อเมล็ดเริ่มงอกปริมาณเอนไซม์จะเริ่มลดลง

จากการศึกษาขั้นต้นทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาเอนไซม์จากเมล็ดปอแก้วอย่างละเอียด นอกจากจะเป็นความรู้พื้นฐานที่สำคัญสำหรับเอนไซม์ชนิดดังกล่าวแล้วยังเป็นงานใหม่ที่ยังไม่เคยมีผู้วิจัยมาก่อนแล้วยัง เป็นหัวใจที่สำคัญในการที่จะเข้าใจถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ และยังมีประโยชน์ในการนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการวิศวกรเอนไซม์ต่อไปด้วย

ผลการเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าเตรียมเอนไซม์ได้บริสุทธิ์ขึ้น 868 เท่าโดยมี % yield 13 % มี Specific activity 25.2 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีนและพบเป็นโปรตีนแถบเดียวบน SDS-PAGE ซึ่งวิธีการดังกล่าวอาจเปรียบเทียบกับที่เคยมีผู้รายงานไว้ถึงการทำเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดผักกาดและเมล็ดถั่วแจ๊คให้บริสุทธิ์ โดยได้มีผู้รายงานว่าสามารถเตรียมเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดผักกาดได้บริสุทธิ์ขึ้นถึง 281 เท่า ด้วย yield 13% และ specific activity 5.62 หน่วยต่อมิลลิกรัม (64) ส่วนเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดถั่วแจ๊คสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ขึ้นได้ 600 เท่า ด้วย yield 10% และมี specific activity 18.6 หน่วยต่อมิลลิกรัม (65) และวิธีดังกล่าวนี้คือสามารถใช้ในการเตรียมอัลฟา-กาแลคโตซิเดสที่มีเบต้า-กาแลคโตซิเดสเจือปนอยู่น้อยกว่า 5 % ได้อีกด้วย

จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสมีความจำเพาะสูงมากคือไม่สามารถย่อยอนุพันธ์พาราไนโตรฟินอลของน้ำตาลอื่นได้เลย ยกเว้น pNP-β-D-glucopyranoside และ pNP-α-L-arabinoside ที่ย่อยได้เพียง 1% และ 6% ของความสามารถในการย่อย pNP-β-D-galactopyranoside เท่านั้น ส่วนน้ำตาลอะราบิโนสซึ่งมีการแทนที่ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 6 เป็น H แทนที่จะเป็นหมู่ CH_2OH และค่า K_m ของเอนไซม์ชนิดนี้ไม่แตกต่างจากที่พบในเอนไซม์ประเภทเดียวกันจากแหล่งอื่นมากนัก คือค่า K_m ต่อ pNP-β-galactoside อยู่ในช่วง 0.3 มิลลิโมลาร์ ถึง 3 มิลลิโมลาร์ (64-68) ส่วนค่า K_m สำหรับ β-lactose (84.7 มิลลิโมลาร์) มีค่าสูงกว่าค่า Km ของเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ที่พบในพืชชนิดอื่น(13-39 มิลลิโมลาร์) ได้แก่ ข้าวบาเลย์ ข้าวโพด ยาสูบ ผักขม และ wheatgerm (68) แต่มีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus niger* (85 มิลลิโมลาร์) (69) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่พบในเอนไซม์ชนิดนี้จากแหล่งอื่นก็สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากเมล็ดปอแก้วได้เช่นกัน สารประกอบที่มีปรอท เช่น $HgCl_2$ หรือ p-hydroxymercuribenzoate ซึ่งสามารถทำ

ปฏิกิริยากับหมู่ thiol และจะทำลายบริเวณเร่งที่ประกอบด้วยพวก acidic amino acids การที่พบว่า D-galactono 1,4 lactone และ D-galactal สามารถยับยั้งเอนไซม์แอคติวิตี้ได้ แสดงว่าอาจเป็นไปได้ว่ากลไกการทำงานของเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการสร้าง lactone intermediate เช่นเดียวกับที่มีผู้เสนอสำหรับกลไกการทำงานของเอนไซม์จำพวกไกลโคไฮโดรเลสอื่น (47)

โดยสรุปจะเห็นได้ว่า เราสามารถเตรียมเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้วให้บริสุทธิ์ได้ และจากการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่ามีทั้งความเหมือนและความต่างของเอนไซม์นี้เมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันนี้ที่เตรียมได้จากแหล่งอื่นๆ ตามที่เคยมีผู้รายงานไว้ ซึ่งจากความรู้ต่างๆ เหล่านี้จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาถึงการใช้เอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดสจากเมล็ดปอแก้วเพื่อการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง

6.1 บทนำ

เอนไซม์ลินามาเรส (linamarase, EC 3.2.1.21: linamarin β-D-glucoside glucohydrolase) เป็นเอนไซม์จำพวกเบต้า-กลูโคซิเดส ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยน้ำของสารจำพวก cyanogenic glucoside ที่มีชื่อว่า ลินามาริน (linamarin, 2-hydroxy-isobutyronitrile-β-D-glucopyranoside) และสารที่เกี่ยวข้องเช่น lotaustralin (2-hydroxy-2-methyl butyronitrile-β-D-glucopyranoside) โดยให้ hydrocyanic acid (HCN) ซึ่งเป็นสารพิษในมันสำปะหลังและผลิตผลจากมันสำปะหลัง ลินามาเรสพบได้ในพืช (26-29, 48-50) แมลง (70) แบคทีเรีย (71-72) และเชื้อรา (73-74) ตัวอย่างของลินามาเรสแสดงในตารางที่ 3.1 เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะสูงมากสำหรับส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรท(aglycone part) และเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสอื่นๆ มักจะไม่ย่อยลินามาริน เอนไซม์ลินามาเรสในมันสำปะหลังมีแอคติวิตี้ต่อสับสเตรทอื่นๆ ด้วยดังแสดงในตารางที่ 3.1 ในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ลินามาเรสมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดพิษและการตรวจวัดปริมาณไซยาไนด์ ตัวอย่างเช่นได้มีการเติมเอนไซม์ลินามา เรสในอาหารจำพวกหมักดอง เพื่อกำจัดพิษของกรดไฮโดรไซยานิก (75).

ลินามาเรสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืชหลายชนิด และพบได้ในส่วนต่างๆ ของพืชหลายส่วนทั้งในราก ลำต้น และใบ (28) โครงสร้างและคุณสมบัติของเอนไซม์นี้สรุปไว้ในตารางที่ 3.1 ในมันสำปะหลัง Cooke *et al.* (77) เป็นคนแรกที่รายงานการเตรียมเอนไซม์นี้จาก parenchymal tissue ต่อมา เอกสิทธิกุลและจุฬาวัฒนทล (28) ได้รายงานการเตรียมเอนไซม์

จากก้านใบ ลำต้น และราก และยังได้รายงานผลการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ต่อมาพบว่าประกอบด้วย 3 isozymes ที่มี isoelectric point ต่างกัน และต่อมาได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ (77) และกลไกการทำงาน (50) ของลินามาเรสจากมันสำปะหลังอย่างละเอียด

เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่เคยมีความสำคัญติดอันดับ 1 ใน 3 ของผลิตผลการเกษตรที่นำรายได้มาสู่ประเทศไทย แม้ว่าในปัจจุบันอุตสาหกรรมเข้ามามีบทบาทในการนำรายได้เข้าสู่ประเทศเพิ่มมากขึ้น ทำให้รายได้จากการส่งออกผลิตผลทางการเกษตรลดความสำคัญลงก็ตาม มันสำปะหลังก็ยังคงเป็นพืชที่ทำรายได้เป็นอันดับที่ 3 ของสินค้าการเกษตร รองจากยางพาราและข้าว โดยที่มันสำปะหลังเป็นผลิตผลการเกษตรที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย และ เนื่องจากได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ลินามาเรสมาแล้ว มีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเอนไซม์นี้อยู่มากแล้วทำให้มีความสนใจเกี่ยวกับความพยายามนำเอนไซม์นี้มาใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

6.2 วัสดุและวิธีการ

6.2.1 หัวมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) และส่วนต่างๆ ของต้นมันสำปะหลังซื้อจากตลาดในกรุงเทพฯ

6.2.2 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

สกัดเอนไซม์จากส่วนต่างๆ ของต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของเอกสิทธิกุล(28) โดยนำส่วนที่ต้องการสกัดเอนไซม์มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปบดให้ละเอียด

ในสารละลาย 0.1 โมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 (ใช้อัตราส่วน 2 มิลลิลิตร ของบัฟเฟอร์ ต่อน้ำหนักวัตถุดิบ 1 กรัม) ที่มี 0.1 มิลลิโมลาร์ PMSF และ 5%(w/v) ของ PVPP อยู่ กรองกากทิ้งไป นำไปปั่นเพื่อตกตะกอนแยกกากที่ยังเหลืออยู่ออกทิ้งไปนำส่วนน้ำใสมาเติม Dowex 2X-8 (25% w/v) กรอง Dowex 2X-8 ทิ้ง แล้วนำไปปั่นแยกตะกอนอีกครั้งให้ได้สารละลายใส นำส่วนของสารละลายใสที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 65 เปอร์เซนต์ แล้วนำไปแยกต่อด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ gel filtration ในคอลัมน์ที่บรรจุ Sepharose 4 B (2.5 x 80 ซม.) ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 ด้วยอัตราการไหล 22 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

6.2.3 การตรวจแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลินามาเรส

6.2.3.1 การตรวจวัดแอคติวิตี้โดยใช้สับสเตรทธรรมชาติ (linamarin)

ตรวจโดยใช้วิธีของเอกสิทธิกุลโดยอาศัยปฏิกิริยาประกอบด้วย 0.2 โมลาร์ของโปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 6.8, 1-2 มิลลิโมลาร์ของลินามารินและ 0.5 ไมโครลิตรของเอนไซม์ ใช้ 0.5 % กรดพิคริกเป็นตัวจับกรดไฮโดรไซยานิกที่เกิดขึ้น ปฏิกิริยาจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o} ซ และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.5 มิลลิลิตร ของ 0.5 โมลาร์กรดเกลือที่เย็น วัดปริมาณ isopurpurine picrate ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวช่วงคลื่น 515 นาโนเมตร

6.2.3.2 การตรวจแอคติวิตี้โดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ (p-nitrophenyl glycosides)

ใช้วิธีของ Montreuil (24) ปฏิกิริยา (0.5 มิลลิลิตร) ประกอบด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5 1 หรือ 10 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟินิลไกลโคไซด์ 50 ไมโครลิตร และ 50 ไมโครลิตรของเอนไซม์ บ่มปฏิกิริยาที่ 37^{o} ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 1 มิลลิลิตรของ 1 โมลาร์โซเดียมคาร์บอเนต ตรวจวัดพาราไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวช่วงคลื่น 400 นาโนเมตร

6.2.4 การตรวจสอบคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ลินามาเรส

6.2.4.1 ตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่เสียสภาพธรรมชาติด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ตามวิธีของ Laemmli (40).

6.2.4.2 การศึกษาเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติโดยใช้ Non-denaturing gel electrophoresis

ใช้วิธีของ Cameo และ Blaquier (41) เตรียมเจลขนาด 15x12x0.5 ซม. โดยใช้ 5% acrylamide ใน 0.025 โมลาร์ Tris, 0.192 โมลาร์ไกลซีนบัฟเฟอร์ พีเอช 8.3 ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ที่ 150 โวลท์ เป็นเวลา 9-16 ชั่วโมง แล้วย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant blue R-250 และย้อมเอนไซม์แอคติวิตี้ด้วยการแช่ใน 1 มิลลิโมลาร์ 4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside และ 4- methylumbelliferyl-β-D-fucoside

6.2.4.3 การตรวจสอบเอนไซม์ไกลโคซิเดสจากมันสำปะหลัง

ตรวจสอบเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสจากมันสำปะหลังโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ที่เป็นอนุพันธ์พาราไนโตรฟีนิลของน้ำตาลอื่นคือ เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase), เบต้า-ฟิวโคซิเดส (β-fucosidase), เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase),อัลฟา-อะราบิโนซิเดส (α-arabinosidase) โดยใช้สภาวะเดียวกันกับที่ตรวจสอบเอนไซม์ลินามาเรสในข้อ 6.2.3.2

6.3 ผลการทดลอง

6.3.1 การเตรียมเอนไซม์ลินามาเรสบริสุทธิ์

จากเตรียมเอนไซม์จากก้านใบ ลำต้น และหัวมันสำปะหลัง พบว่า protein profile ไม่ค่อยมีความแตกต่างกันระหว่างแหล่งเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน รูปที่ 6.1 แสดง พบว่าสามารถแยกโปรตีนออกได้เป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ (M.W. 600,000-2,000,000) และอีกส่วนมีโมเลกุลขนาดเล็ก จะพบโปรตีนทั้งสองนี้ในเอนไซม์ที่มาจากทั้งก้านใบ ลำต้น และผิวในของหัวมัน นอกจากนี้ในส่วนที่แยกได้นี้พบว่าอัตราส่วนแอคติวิตี้ของเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดส ต่อ เบต้า-กลูโคซิเดส มีค่าเท่ากับ 2.0-3.0% สำหรับส่วนที่มีโมเลกุลใหญ่ และมีค่าเท่ากับ 65-125% สำหรับส่วนที่มีโมเลกุลเล็ก (ตารางที่ 6.1) จากการทำอิเลคโตรโฟริสิสบน SDS-gel พบว่าเอนไซม์ที่มีโมเลกุลใหญ่จะประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 63,000 แต่เอนไซม์ที่มีโมเลกุลเล็กจะไม่พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลดังกล่าวเลย จากผลการทดลองนี้ยืนยันว่าเอนไซม์ไกลโคซิเดสในมันสำปะหลังประกอบด้วยเอนไซม์สองชนิด คือลินามาเรสที่มีขนาดใหญ่และเบต้า-กาแลคโตซิเดส ซึ่งมีขนาด

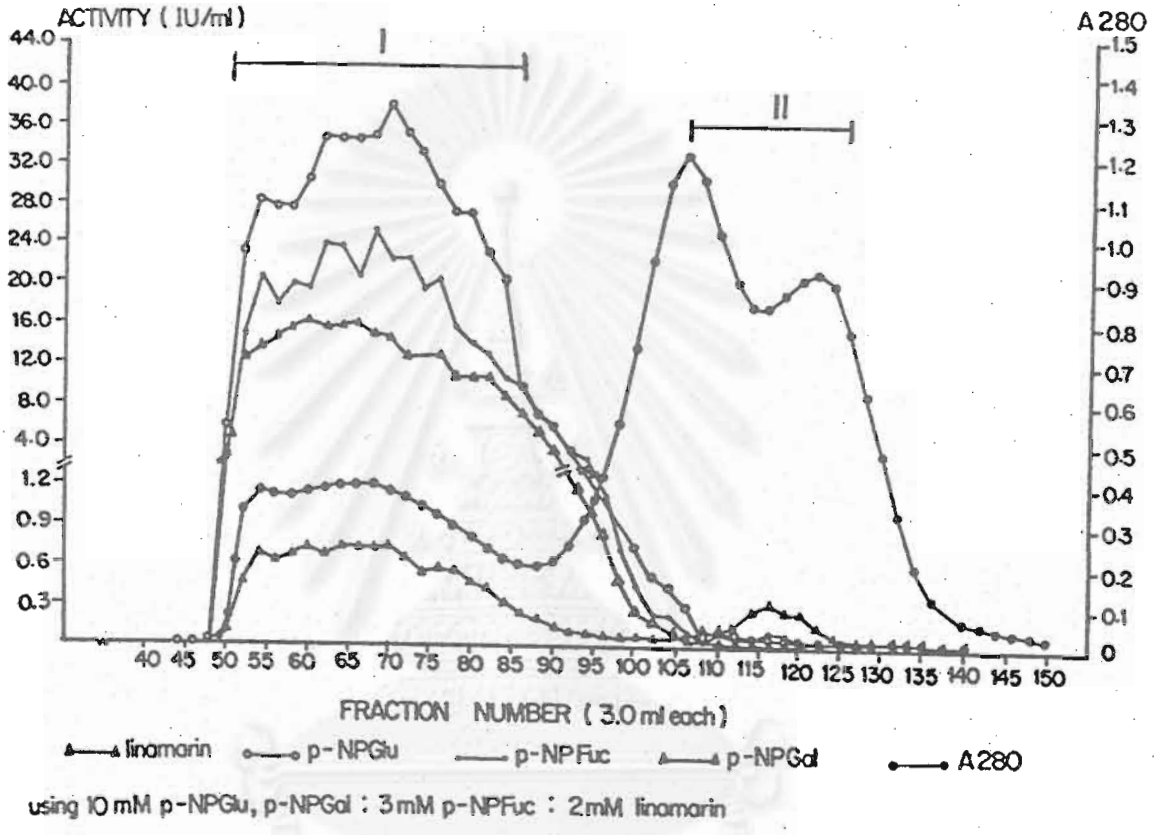


Figure 6.1 Sepharose 4B chromatography of 35-65% ammonium sulphate fraction from cassava petiole. Fractions of 3 ml were taken and monitored for protein (●). Activity was determined with 2mM linamarin (Δ), pNP-β-glucoside (O), 10 mM pNP-β-galactoside (▲) or 3 mM pNP-β-fucoside (•).

Table 6.1 Activity of linamarase, β-glucosidase, β-fucosidase and β-galactosidase and the ratio of β-Fuc/β-Glu and β-Gal/βGlu from the High and Low molecular weight pools from Sepharose 4B chromatography.

	Petiole		Stem		Root cortex	
	(Part I) High	(Part II) Low	(Part I) High	(Part II) Low	(Part I) High	(PartII) Low
Pooled tube no.	50-86	108-126	54-85	105-130	56-85	104-125
Protein (mg/ml)	0.18	0.18	0.12	0.294	0.139	0.086
Activity (IU/ml)						
β-Glucosidase	34.66	0.16	18.83	0.14	29.42	0.03
β -Fucosidase	33.75	0.14	17.75	0.14	32.75	0.04
β -Galactosidase	0.69	0.10	0.46	0.11	0.07	0.04
Linamarase	20.32	0.08	11.74	0.05	17.48	0.01
Ratio						
β-Fuc/ β -Glu	0.97	0.88	0.94	1.03	1.11	1.25
β-Gal/ β-Glu	0.02	0.65	0.02	0.82	0.03	1.25

เล็ก แต่อย่างไรก็ตามเบต้า-กาแลคโตซิเดสที่พบยังอยู่ในสภาพที่ไม่บริสุทธิ์ และอาจมีอยู่น้อยเกินกว่าจะสามารถนำมาทำให้บริสุทธิ์

เมื่อทำการศึกษาโดยใช้ระบบอิเลคโตรโฟริสิสอื่นที่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ เช่น ใน 6 M urea - 0.9 M acetic acid, pH 2.7 และใน 1% TritonX-100, 2.5 M urea, 0.9 M acetic acid พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสจากเนื้อเยื่อทั้งสามนี้ประกอบด้วยสายโปลีเปปไทด์ชนิดเดียว เช่นเดียวกับใน SDS-PAGE (รูปที่ 6.2)

6.3.2 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ด้วยเทคนิคทางอิเลคโตรโฟริสิส

จากการศึกษาเอนไซม์ลินามาเรสโดยใช้เทคนิคทางอิเลคโตรโฟริสิส ในขณะที่เอนไซม์ยังอยู่ในสภาพธรรมชาติ โดยใช้ cellulose acetate electrophoresis พบว่ามีแถบโปรตีนกว้าง ๆ เพียงแถบเดียว ซึ่งแสดงว่าโมเลกุลของเอนไซม์ลินามาเรสนี้ไม่ได้แตกต่างกันมากในประจุ แต่เมื่อศึกษาเอนไซม์ในสภาพธรรมชาติด้วยเทคนิคของ polyacrylamide electrophoresis จะได้แถบของเอนไซม์มีหลายแถบ เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของหน่วยย่อยเป็นขนาดต่าง ๆ กันได้ อาจเกิดเป็น 4, 6, 8, 10 และ 12-14 หน่วยรวมตัวกัน (รูปที่ 6.3) ซึ่งการรวมตัวของหน่วยย่อยของเอนไซม์นี้อาจมีส่วนสำคัญในการควบคุมการทำงานของเอนไซม์นี้ในสภาพธรรมชาติก็ได้

6.3.3 การตรวจสอบไกลโคซิเดสอื่นจากมันสำปะหลัง

นอกจากลินามาเรสแล้วยังศึกษาถึงลักษณะโครงสร้างและการทำงานของเอนไซม์จำพวก ไกลโคซิเดสอื่นของมันสำปะหลังอีกด้วยได้แก่ เบต้า-กลูโคซิเดส (β-glucosidase) เบต้า-ฟิวโคซิเดส (β - fucosidase) และเบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-

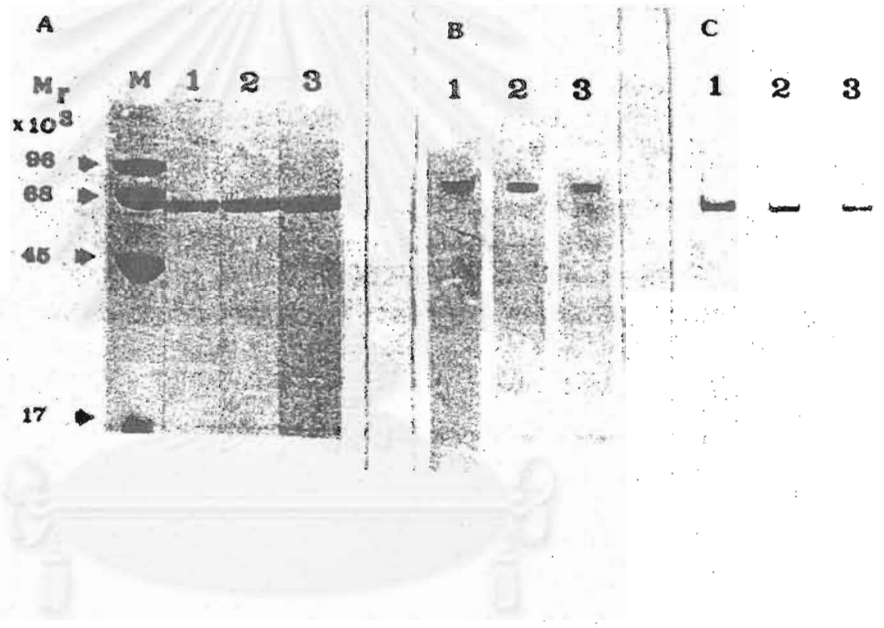


Figure 6.2 Electrophoresis of purified cassava linamarase under denaturing conditions in various gel systems, followed by protein staining. *A:* SDS-polyacrylamide gels; *B:* Acid-urea gels; *C:* Triton-acid-urea gels. *M*: Molecular weight markers; *1*: petiole linamarase; *2*: stem linamarase; *3*: root cortex linamarase.

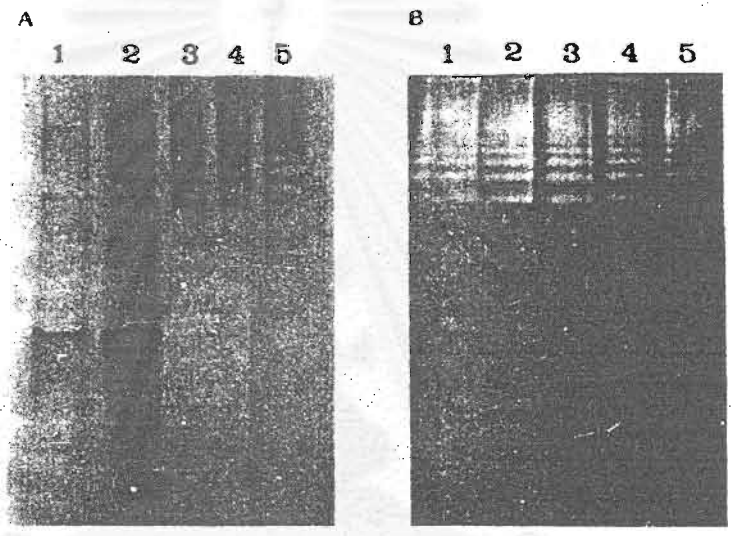


Figure 6.3 Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on 5% gels. *A*: Protein stain; *B*: Activity stain. *1*: petiole crude extract; *2*: petiole $(NH_4)_2SO_4$ ppte; *3*: petiole Sepharose pool; *4*: stem Sepharose pool; *5*: root cortex Sepharose pool.

galactosidase) โดยทำการสกัดเอนไซม์จำพวกนี้จากก้านใบ (petiole) ลำต้น (stem) และปลายยอดอ่อน (shoot tip) ด้วยอะซิเตท บัฟเฟอร์ ส่วนต่าง ๆ เหล่านี้อาจผ่านกรรมวิธีที่ใช้สารโปลีไวนิลไพรโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) มาก่อนหรือไม่ก็ได้ ตรวจหาเอนไซม์ต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้นโดยใช้สารพาราไนโตรฟีนิลไกลโคไซด์ (p- nitrophenylglycosides) ที่เหมาะสมเป็นสับสเตรทที่ pH 4, pH 6 และ pH 8 พบว่าในส่วนต่าง ๆ ทั้ง 3 ส่วนมีเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และเบต้า-ฟิวโคซิเดสในปริมาณใกล้เคียงกัน แต่มีเบต้า-กาแลคโตซิเดสในปริมาณที่ต่ำกว่ามาก (คือมีเบต้า-กาแลคโตซิเดสอยู่ประมาณ 2-5% เท่านั้น) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างอัตราส่วนระหว่าง เบต้า-ฟิวโคซิเดสต่อเบต้า-กาแลคโตซิเดส หรือ เบต้า-กาแลคโตซิเดส ต่อ เบต้า-กลูโคซิเดส ในส่วนต่าง ๆ ของมันสำปะหลัง หรือที่ pH ต่าง ๆ กัน

เมื่อสกัดเอนไซม์จากปลายยอดอ่อนโดยใช้การแยกด้วยวิธีตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียซัลเฟต ที่ 0-35%, 35-40 %, 40-65% และ 65-80% ตามลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างของอัตราส่วนของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้น และเมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีใน Sepharose 4B พบว่า มีเบต้า-ฟิวโคซิเดส และเบต้า- กลูโคซิเดสปริมาณสูง แต่พบเบต้า- กาแลคโตซิเดส ในปริมาณต่ำ ในส่วนของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 600,000 นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดสปริมาณเล็กน้อยในส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เมื่อศึกษาด้วยวิธีอิเลคโตรฟริสิสพบว่า เอนไซม์ไกลโคซิเดสที่พบในส่วนของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงคือ เอนไซม์ ลินามาเรส ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นทั้ง กลูโคซิเดส และฟิวโคซิเดส ส่วนในโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำน่าจะเป็นเอนไซม์คนละชนิดเพราะมีกาแลคโตซิเดสสูง นอกจากนี้ยังพบว่ามีเอนไซม์จำพวก อัลฟา-อะราบิโนซิเดส (α-arabinosidase) ด้วย

6.4 บทวิจารณ์

เอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์มากแต่ยังคงแสดง ladder pattern ปรากฏในการทำอิเลคโตรโฟริสิสแสดงว่า มีการรวมตัวกันของหน่วยย่อยเกิดขึ้นได้หลายลักษณะ เอนไซม์ลินามาเรสที่เตรียมได้จาก Sepharose 4B คอลัมน์ ของก้านใบ ลำต้นและหัวมันสำปะหลัง จะพบมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ลินามาเรส และมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลาย pNP-glycosides 3 ชนิดคือ pNP-β-D-glucoside, pNP-β-D- fucoside และ pNP-β-D-galactoside

จากการศึกษานี้พบว่าเอนไซม์ลินามาเรสมีแอคติวิตี้ต่อ pNP-β-glucoside และ pNP-β-fucoside ในโมเลกุลเดียวกัน และได้มีรายงานว่าเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังจะพบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองอยู่ร่วมกับในเอนไซม์โมเลกุลเดียวกัน โดยได้มีการศึกษาคุณสมบัติของบริเวณเร่งของเอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลังและยืนยันว่าบริเวณเร่งสำหรับสับสเตรททั้งสองอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน โดยมีกรดอะมิโนที่เป็น acidic amino acid อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์นี้ (50)

อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเอนไซม์ลินามาเรสซึ่งเป็นเอนไซม์จำพวกกลูโคซิเดสจำพวกหนึ่งมาใช้ในการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยขบวนการย้อนกลับ โดยจากทฤษฎีที่ว่าเอนไซม์แทบทุกชนิดสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ถ้าได้มีการปรับสภาวะแวดล้อมของปฏิกิริยาให้เหมาะสม แต่ลินามาเลสอาจจะเป็นเอนไซม์นี้ใช้ในขบวนการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ไม่ดีนักเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะค่อนข้างสูง ไม่สามารถใช้สับสเตรทอื่นได้เลย และยังมีความจำเพาะต่อสับสเตรทในธรรมชาติที่เป็น cyanogenic glycoside

มากกว่า glycoside ชนิดอื่นด้วยผลการศึกษาเกี่ยวกับการนำลินามาเรสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ไปใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จะได้กล่าวในรายละเอียดในบทต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 7

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

7.1 บทนำ

วิธีการเตรียมโอลิโกแซคคาไรด์ในปัจจุบันอาจทำได้ 3 วิธีด้วยกันคือ

1. สกัดแยกโอลิโกแซคคาไรด์จากแหล่งที่มีอยู่ในธรรมชาติ เช่นจากน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด จากอุจจาระของทารกที่ยังไม่หย่านม และจากแหล่งอื่นๆ (12) ซึ่งการแยกด้วยวิธีดังกล่าวจะได้ปริมาณน้อยและลงทุนแพงมาก

2. การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีการเคมี (9, 10) แต่กรรมวิธียุ่งยากมากและผลิตผลที่ได้ไม่มีความจำเพาะ ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ปริมาณน้อยไม่สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตให้สูงขึ้นได้เนื่องจากความยุ่งยากซับซ้อนของขบวนการ

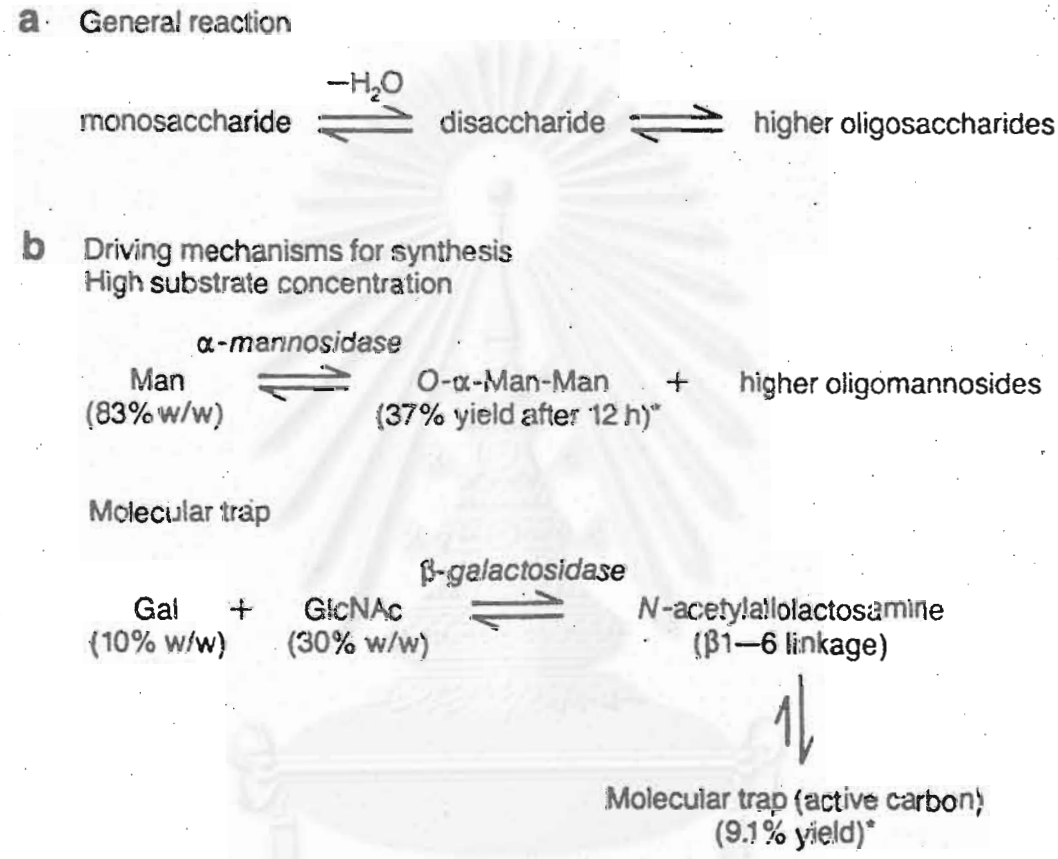
3. การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยการใช้เอนไซม์ (11-13) ซึ่งจะมีข้อดีหลายอย่างคือ จะได้ผลผลิตที่มี regiospecificity หลายชนิด ปฏิกิริยาไม่ยุ่งยากซับซ้อน ไม่ต้องการปฏิกิริยาที่ใช้สภาวะที่รุนแรง ปฏิกิริยาสามารถเกิดได้ที่อุณหภูมิห้องและที่ pH ที่เป็นกลาง การใช้เอนไซม์จะทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีอันตรายในการทำปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ที่ใช้กันโดยทั่วไปในปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ มีอยู่ 2 ชนิด คือ เอนไซม์จำพวกไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (Glucosyl transferase, EC 2.4) และเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส (Glycosidases, EC 3.2)

เทคนิคการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยการใช้เอนไซม์ เป็นเทคนิคที่กำลังได้รับความสนใจจากนักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายเพิ่มมากขึ้น ด้วยความหวังที่จะสามารถเพิ่มความยาวของสายโอลิโกแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้ให้เพิ่มมากขึ้น และสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีลำดับของโมโนแซคคาไรด์อย่างที่ต้องการ ยิ่งไปกว่านั้นการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์เป็นวิธีที่น่าจะช่วยให้สังเคราะห์ได้โดยมี regiospecificity สูง

เนื่องจากการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรสมีข้อจำกัดบางอย่าง จึงให้ความสนใจในการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มของเอนไซม์พวกไกลโคซิเดสมากกว่า เนื่องจากการใช้เอนไซม์จำพวกนี้ไม่ต้องใช้อนุพันธ์นิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลมาเป็นสับเตรทในการสังเคราะห์ ซึ่งสารดังกล่าวมีราคาสูงมาก นอกจากนี้เอนไซม์จำพวกนี้พบได้ในแหล่งต่าง ๆ มากมาย

การใช้เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรทสามารถทำได้ในลักษณะเดียวกับการใช้เอนไซม์โปรตีเอส (protease) ในการสังเคราะห์เปปไทด์ งานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้เอนไซม์จำพวก exoglycosidases ซึ่งมีวิธีการทำได้ 2 วิธีคือ

1. Equilibrium controlled synthesis ซึ่งทำโดยการใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับทำให้เกิดการรวมตัวของโมโนแซคคาไรด์ ดังรูปที่ 7.1 ซึ่งตามปกติแล้วปฏิกิริยาจะมีแนวโน้มที่จะเกิดในทางการสลาย (hydrolysis) มากกว่าการสร้าง (glycoside formation) ได้มีผู้ทำการวิจัยมากมายเพื่อหาสภาวะที่จะทำให้เกิดการสร้างมากกว่าการสลายซึ่งได้มีรายงานว่าการใช้ความเข้มข้นของโมโนแซคคาไรด์ที่สูงและอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ โอลิโกแซคคาไรด์ได้



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 7.1 Equilibrium synthesis of oligosaccharides by glycosidases (11)

(11-13) หรือการนำเอาผลิตผลของปฏิกิริยาออกไปจากปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วก็จะทำให้สมดุลย์ของปฏิกิริยามีแนวโน้มที่จะเกิดมาเป็นผลิตผลมากขึ้น (11)

2. Kinetically controlled synthesis บางทีเรียกกว่า transglycosylation จะประกอบด้วย activated glycoside donor ซึ่งจะเกิดตัวกลางกับเอนไซม์ในความเข้มข้นที่สูง (active intermediate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากันต่อ ให้โอลิโกแซคคาไรด์ได้ ซึ่งวิธีการนี้อาจทำให้สามารถเกิดผลิตผลสะสมได้มากกว่าวิธีที่ 1 Hedbys *et al.* (78) ได้รายงานการใช้เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส ทำปฏิกิริยาโดยใช้กาแลคโตส (Gal) จากน้ำตาลแลคโตส (Lac) ไปต่อกับ เอ็น-อะซิติล-กาแลคโตซามีน (GalNAc) จะเกิดเป็น Gal-β 1, 6 GalNAc ได้ถึง 20% yield ในขณะที่การใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับเกิดได้เพียง 2-3 % yield เท่านั้น

เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสมี selectivity สูงในการเลือกต่อพันธะไกลโคซิดิก ส่วนใหญ่จะสร้างเร่งพันธะ 1,6 ระหว่างตัวให้ (donor) และ ตัวรับ (acceptor) อย่างไรก็ตาม regioselectivity จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ และเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มาจากแหล่งที่ต่างกันจะสามารถสร้างผลผลิตที่ต่างกันได้ ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้เอนไซม์ β - Galactosidase (EC 3.2.1.23) จาก *E. coli* จะสามารถสร้างพันธะ Gal β 1, 6 GalNAc เป็นผลิตผลส่วนใหญ่ เมื่อใช้ตัวให้เป็นน้ำตาลแลคโตส และตัวรับเป็นเอ็น-อะซิติล-กาแลคโตซามีน (79) ขณะที่ β-Galactosidase จาก *Lactobacillus bifidus* จะให้ผลิตผลเป็น β 1, 4 มากกว่า (80) เป็นต้น

นอกจากชนิดของเอนไซม์ จะมีความสำคัญแล้ว โครงสร้างและ anomeric configuration ของ acceptor glycoside จะมีผลต่อ regiospecificity ของผลิตผลของปฏิกิริยาด้วย ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้เอนไซม์อัลฟา-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดกาแฟ (EC 3.2.1.22) เร่งปฏิกิริยาการรวมตัว

ระหว่าง Gal β-OMe กับ lactose (Gal β1, 4 Glc) หรือรวมกับ Gal α-Op-NO_2 Ph จะเกิดพันธะอัลฟา 1,6 ไดแซคคาไรด์ขณะที่ถ้าใช้ lactose กับ Gal-α-Op-NO_2 Ph จะได้ผลิตผลของปฏิกิริยาเป็น α1, 2 ไดแซคคาไรด์และถ้าใช้ lactose กับ Gal α-OMe จะได้ผลิตผลของปฏิกิริยาเป็น α1, 3 ไดแซคคาไรด์ทั้งนี้เข้าใจว่าขึ้นอยู่กับบริเวณ hydrophobic region ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (81)

จากความพยายามค้นหาแหล่งของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสที่อาจมีประโยชน์ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จากเมล็ดพืชในประเทศไทยพบว่าเมล็ดพืชหลายชนิดสามารถเป็นแหล่งของเอนไซม์ได้ดี แต่เมล็ดที่เลือกทำการศึกษาก่อนเป็นเมล็ดที่มีเอนไซม์ในปริมาณสูงและเตรียมในปริมาณมากได้โดยไม่ยากนัก ซึ่งได้แก่

1. เอนไซม์เบต้า- กลูโคซิเดส / เบต้า- ฟิวโคซิเดส จากเมล็ดพะยูง
2. เอนไซม์เบต้า- กาแลคโตซิเดส จากเมล็ดปอแก้ว
3. เอนไซม์อัลฟา- แมนโนซิเดส จากเมล็ดถ่อนและเมล็ดถั่วนางแดง
4. เอนไซม์ลินามาเรสจากหัวมันสำปะหลัง

เอนไซม์ทั้งหมดนี้เมื่อทดสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ในสารสกัดหยาบ (crude extract) แล้วพบว่าสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ แต่เพื่อให้สามารถอธิบายผลผลิตที่เกิดขึ้นได้ว่ามาจากเอนไซม์ชนิดใดแน่จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเตรียมเอนไซม์แต่ละชนิดให้บริสุทธิ์มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ และการศึกษารายละเอียดและกลไกในการทำงานของเอนไซม์จะมีส่วนช่วยในการตัดสินใจเลือกสภาวะของปฏิกิริยาสังเคราะห์ที่เหมาะสมหรือดัดแปลงสภาวะของปฏิกิริยาสังเคราะห์ให้เหมาะสมหรือดียิ่งขึ้นได้

7.2 วัสดุและวิธีการ

7.2.1 การเตรียมเอนไซม์

crude extracts, purified enzymes และ partial purified enzyme แต่ละชนิด เตรียมด้วยวิธีที่กล่าวมาแล้วในบทก่อน ๆ

7.2.2 การวัดเอนไซม์แอคติวิตี้

การวัดเอนไซม์แอคติวิตี้ของเอนไซม์ต่าง ๆทำโดยใช้สารอนุพันธ์พาราไนโตร-ฟีนอลของน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดในสภาวะที่เหมาะสมตามที่ได้กล่าวมาแล้วในบทก่อน ๆ

7.2.3 การศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

ทำปฏิกิริยาโดยการใช้เอนไซม์ต่างๆ กับน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด โดยใช้โมโนแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (30-70 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก) ใช้อุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง (40°ซ - 70°ซ) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นเวลา 1-14 วัน ตรวจสอบผลิตผลที่เกิดขึ้นด้วย h.p.l.c และ t.l.c.

7.2.4 การตรวจสอบผลิตผลของปฏิกิริยาด้วย h.p.l.c

นำปฏิกิริยามาตรวจสอบด้วยเครื่อง h.p.l.c (Waters 625 LC) ตามปกติโดยใช้คอลัมน์ Aminex HPX -87C ที่อุณหภูมิ 85°ซ โดยใช้ตัวชะเป็นน้ำ และวัดปริมาณสาร

คาร์โบไฮเดรทด้วยการใช้เครื่องวัดดัชนีการหักเหของแสง (refractive index detector, Waters 410) แต่ถ้าต้องการแยกสารไดแซคคาไรด์ที่มีพันธะต่าง ๆ กันออกจากกันให้ดียิ่งขึ้นสามารถทำได้โดยใช้ Dionex Carbopac PA-1 Column และใช้ตัวชะที่มีส่วนประกอบของด่างคือโซเดียมไฮดรอกไซด์ และตรวจวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรทด้วย pulsed amperometric detector (Waters 464) โดยใช้ gold electrode

7.2.5 การตรวจสอบผลิตผลด้วย t.l.c

ใช้ t.l.c ที่เป็น silica gel G precoated plate บนอะลูมิเนียมบอนด์

ใช้ solvent system ดังนี้

System I propan-1-ol : acetone : l M lactic acid (7:1:1)

System II n-butanol : 2- propanol : H_2O (10: 5: 4)

System III n-butanol : 2-propanol : H_2O (3:12:4)

System IV $CHCl_3$: acetic acid : H_2O (3:7:0.5)

System V n-butanol : ethanol : H_2O (5:3:2)

ตรวจสอบคาร์โบไฮเดรทที่แยกได้ด้วยการย้อมด้วยกรดกำมะถันเข้มข้นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100° ซ เป็นเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.3 ผลการทดลอง

7.3.1 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส / เบต้า-ฟิวโคซิเดสจากเมล็ดพะยูง

จากการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จากเมล็ดพะยูงพบว่า crude extract จากเมล็ดพะยูงสามารถใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้เมื่อบ่มเอนไซม์กับสารละลายน้ำตาลกลูโคส (50 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก) ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}ซ เป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในรูปที่ 2.2 จะพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นสารจำพวกไดแซคคาไรด์ (วิเคราะห์ด้วย h.p.l.c โดยใช้ คอลัมน์ Aminex HPX - 87 C)

เมื่อทำการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จากเอนไซม์บริสุทธิ์โดยใช้สภาวะแวดล้อมเดียวกับ crude extract พบว่ายังคงมีการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 7.2 โดยในระยะแรกจะเกิดเป็นไดแซคคาไรด์ขึ้นก่อนแล้วเมื่อทิ้งไว้เป็นระยะเวลานานออกไปจะพบว่าจะมี trisaccharide เกิดขึ้นได้บ้าง โดยจะพบว่าผลิตผลของปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 4 วันแรกแล้วจะเริ่มช้าลงและปฏิกิริยาจะเข้าสู่สมดุลย์หลังจาก 10-14 วัน (รูปที่ 7.3)

เมื่อตรวจสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์ต่อการสลาย pNP-glucoside พบว่าเมื่อเอนไซม์อยู่ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กล่าวคือในสารละลายน้ำตาล ดี-กลูโคส ความเข้มข้น 50 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 60 ^{o} ซ พบว่ามากกว่า 50 % ของเอนไซม์แอคติวิตี้ยังคงอยู่

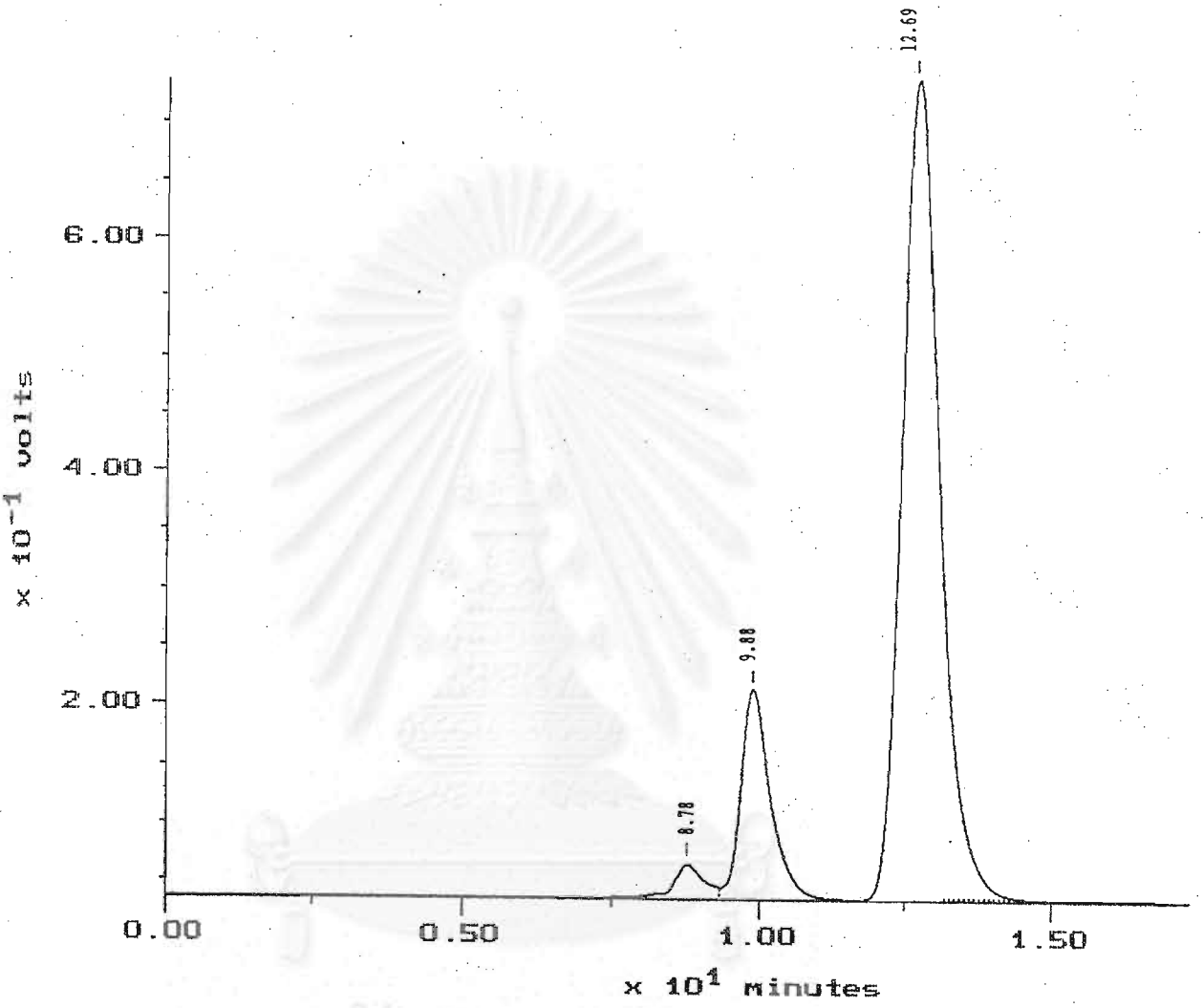


Figure 7.2 H.p.l.c. profile of oligosaccharide synthesis with purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme was incubated with 50% (w/w) D-glucose at pH 5, 50°C for 8 days. Peaks at 12.69 min, 9.88 min and 8.78 min are D-glucose, disaccharide and trisaccharide respectively.

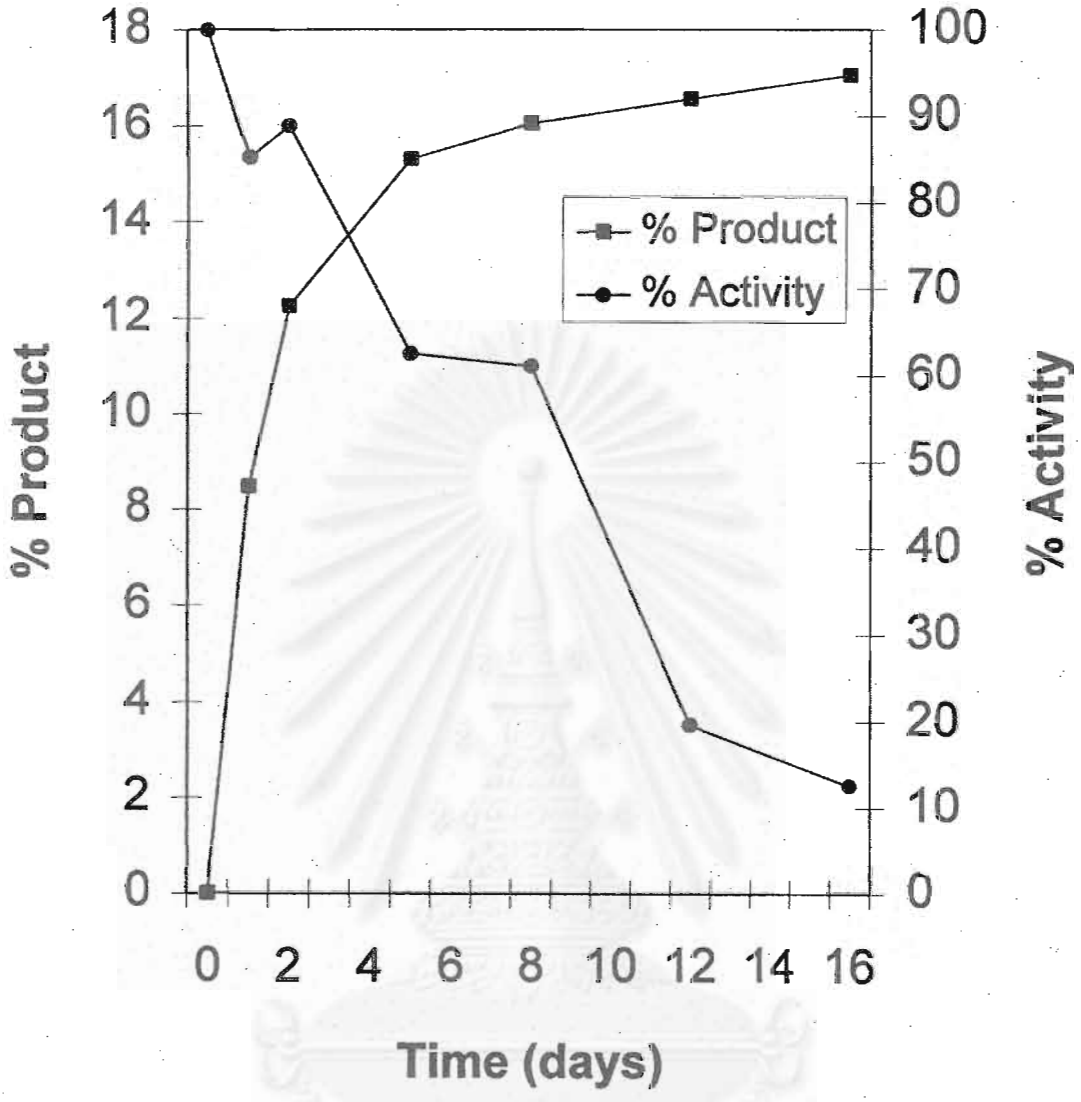


Figure 7.3 Time course of oligosaccharide synthesis (% product) and enzyme activity remaining (% activity) with purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme was incubated with 50% w/w D-glucose at pH 5, 50°C for varying times.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

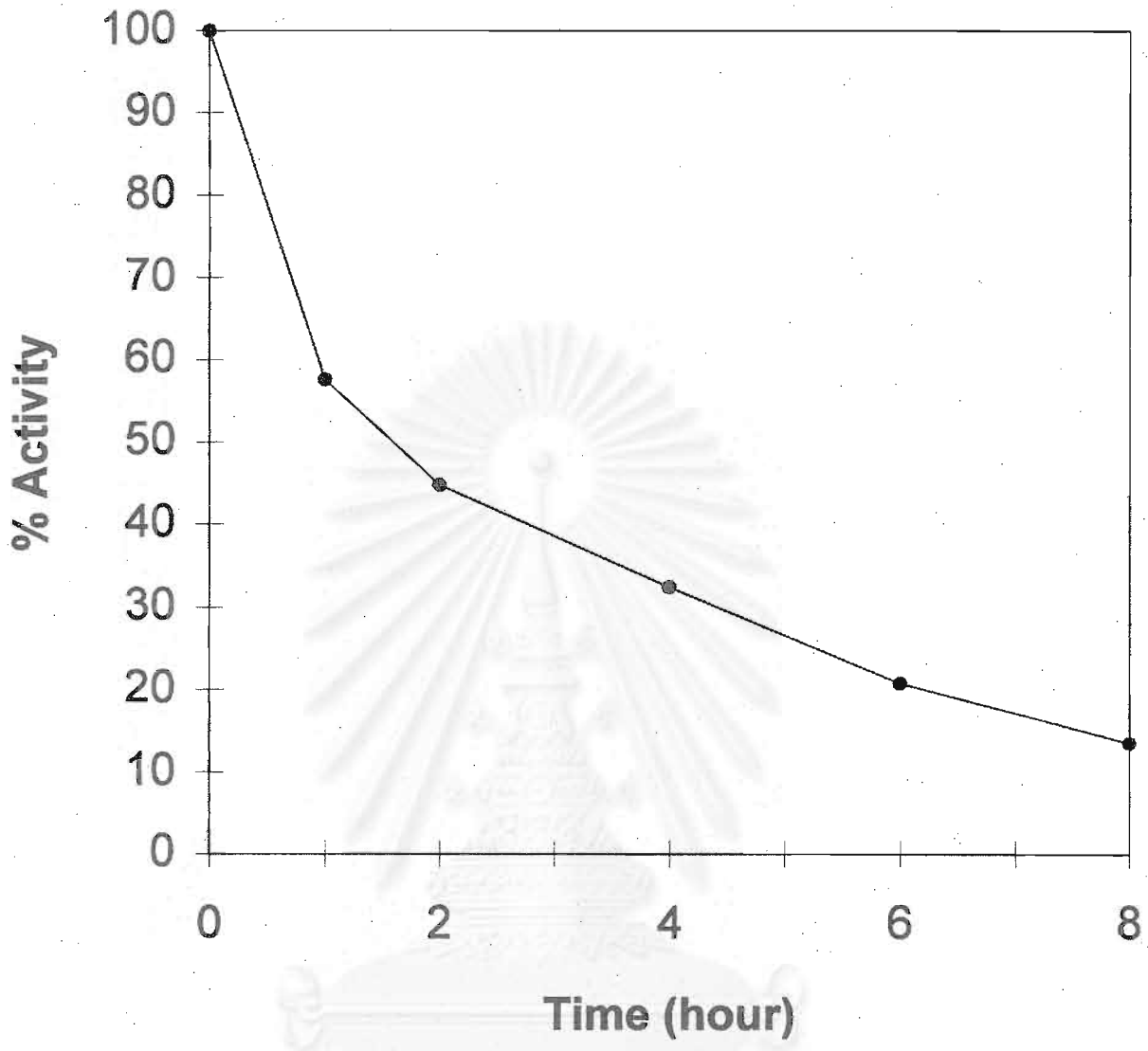
เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน แล้วเอนไซม์แอคติวิตี้จึงค่อย ๆ ลดลง เมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานาน 16 วัน จะมีเอนไซม์แอคติวิตี้เหลืออยู่ประมาณ 10% ของแอคติวิตี้ตั้งต้น (รูปที่ 7.3) ในขณะที่ถ้าตรวจสอบแอคติวิตี้ของเอนไซม์เมื่อไม่มีสับสเตรทอยู่ด้วยจะพบว่าเอนไซม์จะมีการสูญเสียแอคติวิตี้ไปอย่างรวดเร็ว คือมีแอคติวิตี้ลดลง 50 เปอร์เซนต์ ภายในเวลา 1 ชั่วโมงและลดลงเหลือประมาณ 10 เปอร์เซนต์เมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 7.4

เมื่อทำการทดลองหา pH ที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์สำหรับเอนไซม์นี้ โดยใช้น้ำตาล ดี-กลูโคสเป็นสับสเตรทพบว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดคือที่ pH = 5.0 ดังแสดงในรูปที่ 7.5

เมื่อทำการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์สำหรับเอนไซม์นี้ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์คือ 60-65 ^{o} ซ ดังแสดงในรูปที่ 7.6

เมื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ พบว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้นปริมาณผลิตผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะยิ่งเพิ่มสูงขึ้นดังแสดงในรูปที่ 7.7

ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์จะมีความสำคัญเช่นกัน คือถ้าเพิ่มปริมาณเอนไซม์ขึ้น ปริมาณผลิตผลที่เกิดขึ้นจะเพิ่มขึ้นด้วย ดังแสดงในรูปที่ 7.8



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure 7.4 Stability of purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre in the absence of substrate. Enzyme was incubated in buffer without substrate at pH 5, 50°C for varying times.

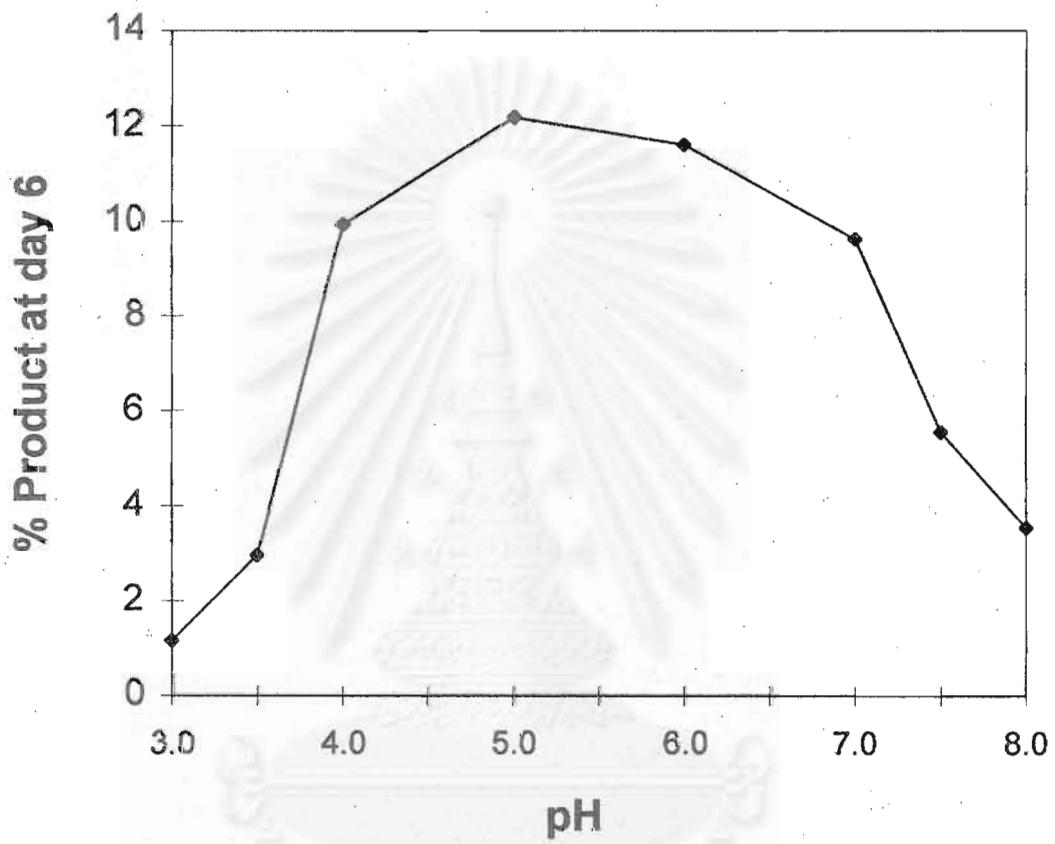


Figure 7.5 Effect of pH on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme was incubated with 50% w/w D-glucose at varying pH, at 50°C for varying times.

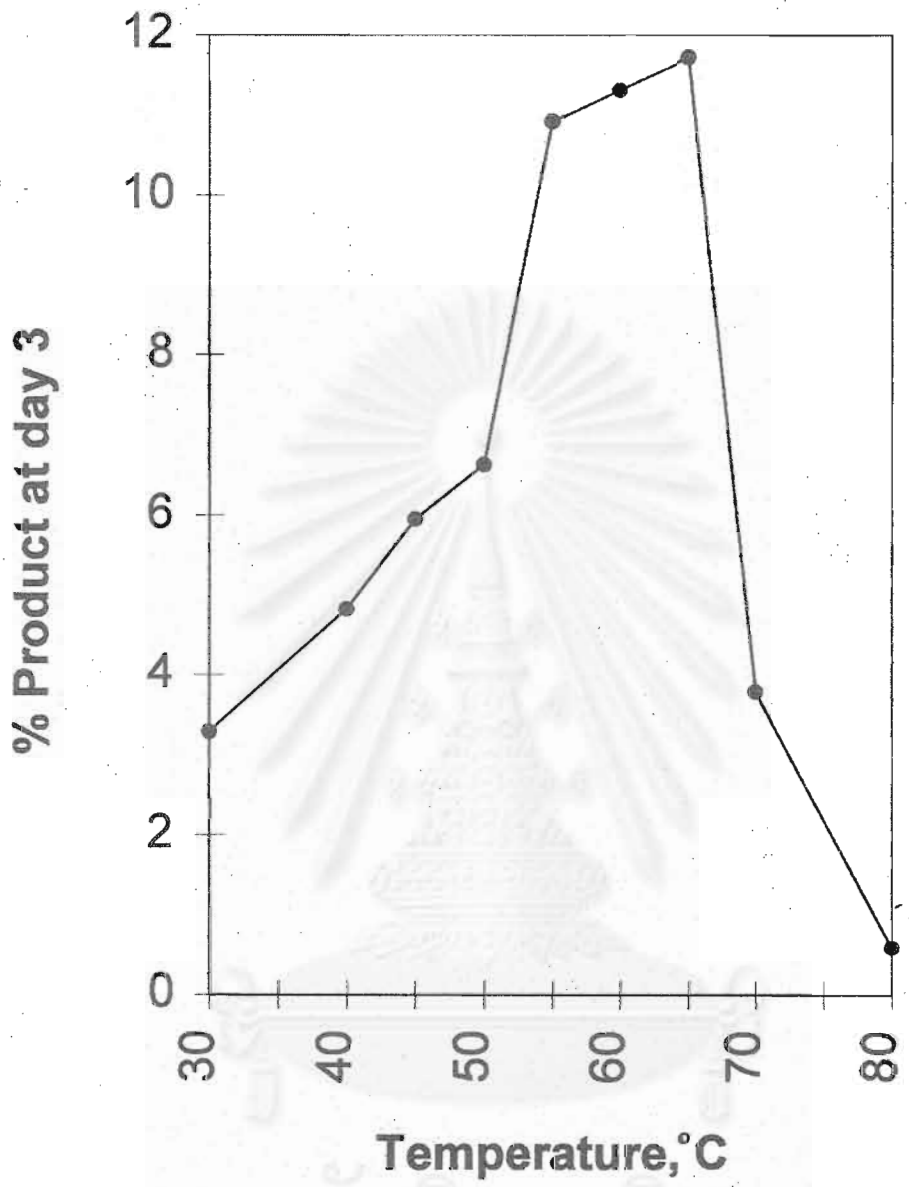


Figure 7.6 Effect of temperature on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme was incubated with 50% w/w D-glucose at pH 5 at varying temperatures.

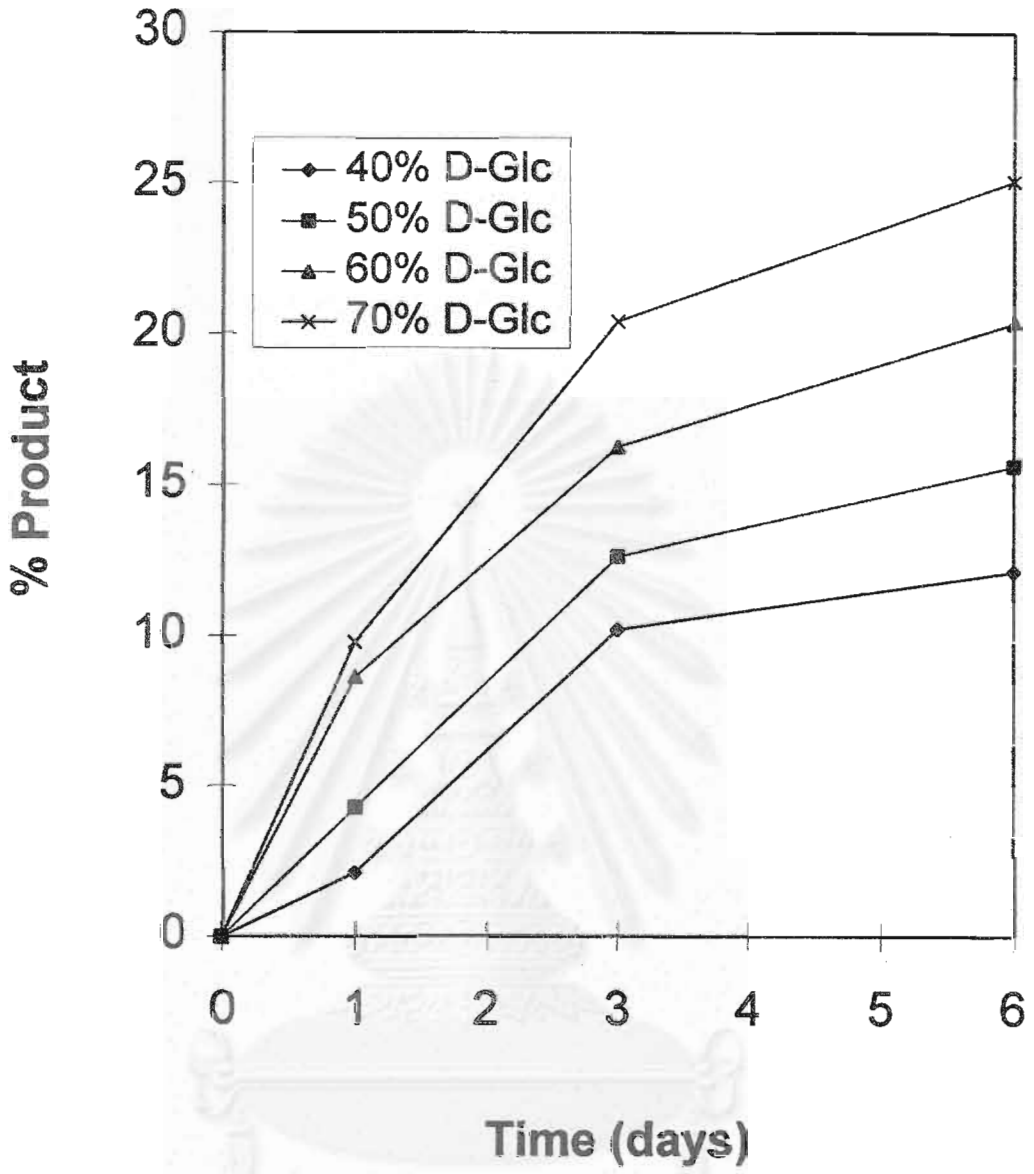


Figure 7.7 Effect of glucose concentration on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme was incubated with varying concentrations of D-glucose at pH 5 at 50°C for varying times.

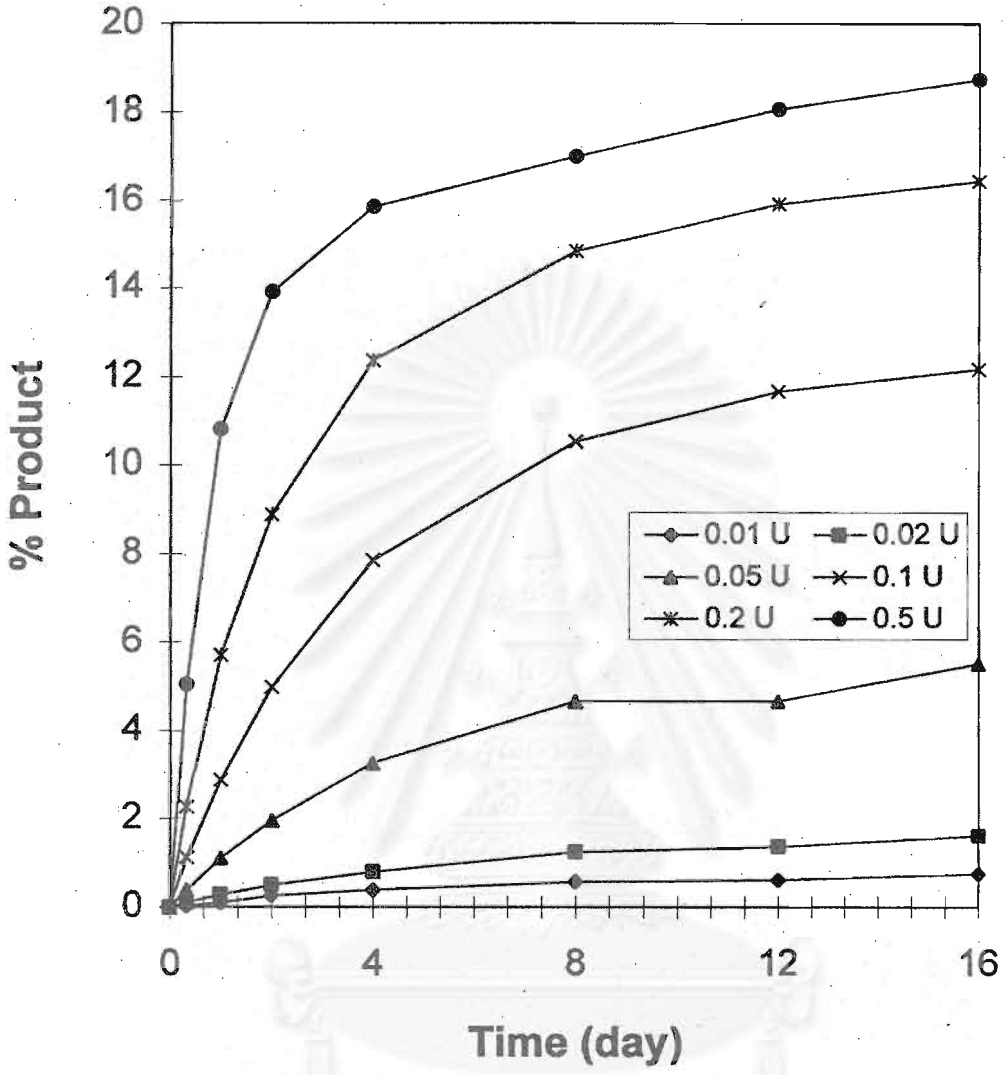


Figure 7.8 Effect of varying enzyme concentration on oligosaccharide synthesis by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Varying amounts of enzyme were incubated in a reaction mixture of 100 mg containing 50% w/w D-glucose at pH 5 at 50°C for varying times.

ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์คือที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 60° ซ และความเข้มข้นของสับสเตรทเป็น 60 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักและใช้เอนไซม์ 0.5 หน่วยเอนไซม์จะพบว่าจะได้ผลิตผลของปฏิกิริยาที่เป็นไดแซคคาไรด์และไตรแซคคาไรด์ รวมกันประมาณ 30-35 เปอร์เซนต์ของคาร์โบไฮเดรททั้งหมดในปฏิกิริยา โดยมีอัตราส่วนระหว่างไดแซคคาไรด์และไตรแซคคาไรด์ประมาณ 0.2

เนื่องจากเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้จากเมล็ดพะยูงนี้มีความสามารถในการย่อยสับสเตรทได้ 2 ชนิดคือ β-glucoside และ β-fucoside จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทดลองใช้ D-fucose เป็นสับสเตรทสำหรับการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ผลการทดลองพบว่า D-fucose เป็นสับสเตรทที่ไม่ดีสำหรับการสังเคราะห์ เมื่อบ่มเอนไซม์ (0.1 หน่วยเอนไซม์) กับน้ำตาล D- fucose ความเข้มข้น 50 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก ในสารละลายโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลา 7 วัน พบผลิตผลของปฏิกิริยาที่เป็นไดแซคคาไรด์ หรือโอลิโกแซคคาไรด์น้อย ดังแสดงในรูปที่ 7.9 อย่างไรก็ตามเมื่อใช้น้ำตาล D-glucose และน้ำตาล D-fucose ในปริมาณที่เท่ากันเป็นสับสเตรทจะพบว่ามีสารใหม่เกิดขึ้น ซึ่งคาดว่าเป็นไดแซคคาไรด์ของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟิวโคสต่อกัน ดังแสดงในรูปที่ 7.10 และ 7.11

ได้พยายามแยกผลิตผลของการสังเคราะห์ด้วยเครื่อง h.p.l.c โดยใช้คอลัมน์ Dionex Carbopac PA 1 ที่ต่อกับ pulse amperometric detector โดยใช้ 0.075 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวชะจะพบว่าสามารถแยกไดแซคคาไรด์ gentiobiose (β1, 6), cellobiose (β1,4) , laminaribiose (β1,3) และ Sophorose (β1, 2)ออกจากกันได้ เมื่อใช้ระบบนี้ในการวิเคราะห์ผลิตผลของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ที่เกิดขึ้นกับ D-glucose พบว่าไดแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นจะเป็น gentiobiose (β1, 6) 35 เปอร์เซนต์ และมี Sophorose (β1, 4) เกิดขึ้น 11

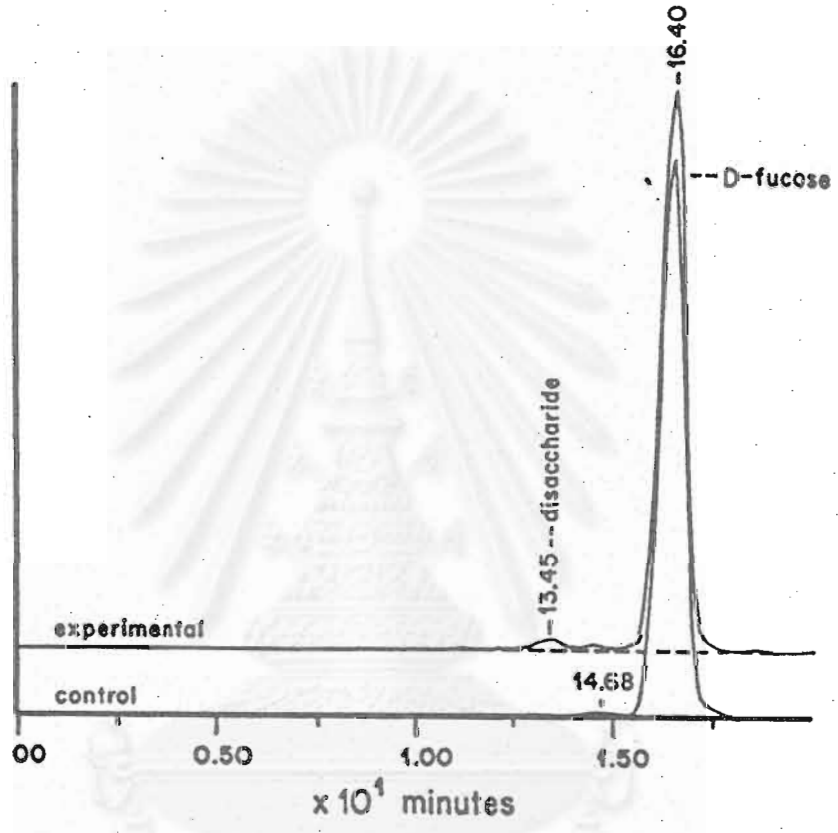


Figure 7.9 H.p.l.c. profile of the synthesis reaction with 50% D-fucose by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme was incubated with 50% w/w D-fucose at pH 5, 50°C for 7 days. Only small amounts of disaccharide were detectable.

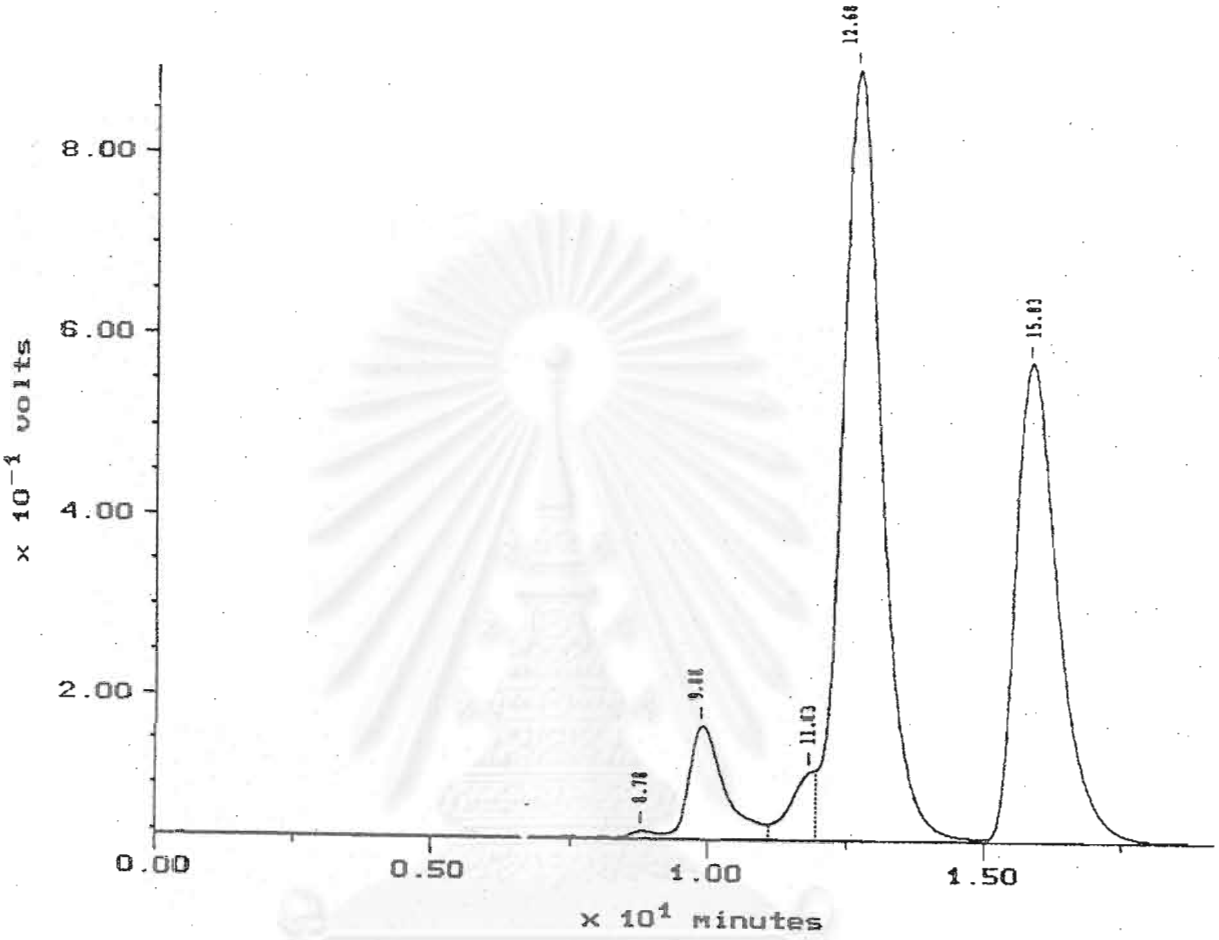


Figure 7.10 H.p.l.c. profile of the synthesis reaction with a mixture of D-fucose and D-glucose by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Enzyme was incubated with 50% (w/w) total monosaccharide (20% w/w fucose + 30% w/w glucose) at pH 5, 50°C for 7 days. Peaks at 15.83 min, 12.68 min, 11.83 min, and 9.88 min were beileved to be D-fucose, D-glucose, heterodisaccharide, and glucose disaccharide.

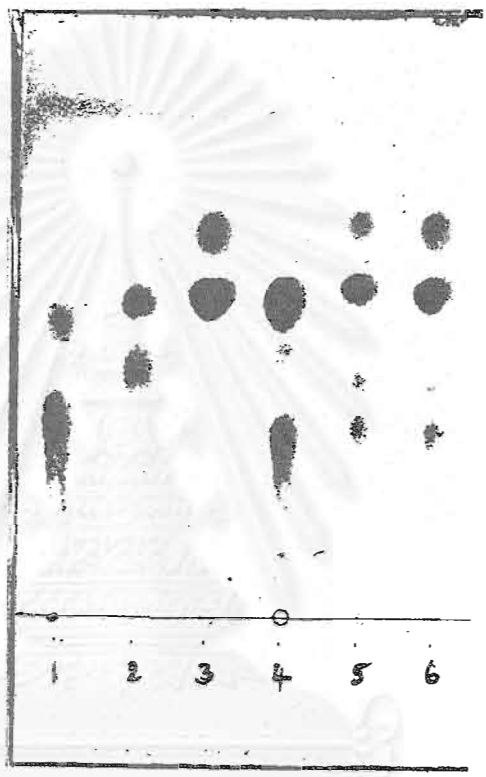


Figure 7.11 Thin-layer chromatography of the synthesis products with a mixture of D-fucose and D-glucose by purified β-glucosidase/β-fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. Solvent was 2-propanol:acetone: 1M lactic acid (7:1:1 by vol.) *1*: sophorose + gentiobiose; *2*: cellobiose + laminaribiose; *3*: glucose + fucose; *4*: 50% glucose incubated with enzyme for 14 days; *5*: 30% glucose + 20% fucose incubated with enzyme for 16 days; *6*: 30% glucose + 20% fucose incubated with enzyme for 7 days.

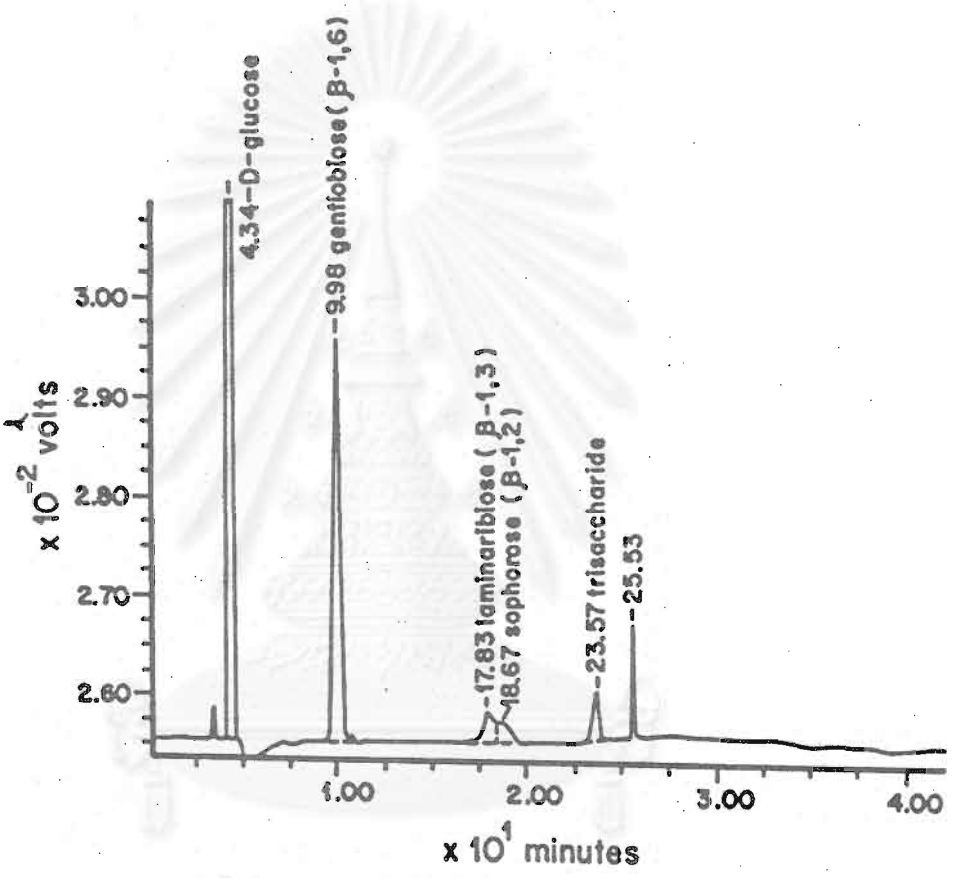
เปอร์เซนต์ ขณะที่ไม่พบ cellobiose เลย (รูปที่ 7.12) และเมื่อใช้ D-glucose กับ D-fucose ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์สามารถพบ hetero-oligosaccharide ด้วย (รูปที่ 7.13)

นอกจากใช้คอลัมน์ Dionex carbopac PA 1 แล้วยังได้ทดลองใช้ t.l.c ตรวจสอบผลิตผลของปฏิกิริยาเช่นกันพบว่าสามารถแยกไดแซคคาไรด์ที่มีพันธะไกลโคซิดิกต่าง ๆ กัน ออกจากกันได้เช่นกันดังแสดงในรูปที่ 7.11 และ 7.14

เนื่องจากไดแซคคาไรด์ที่เป็น glucose-fucose ยังไม่มีขายในท้องตลาดดังนั้นจึงไม่มีสารมาตรฐานมาเทียบว่าผลิตผลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเป็นสารใด จึงได้ทำการเตรียมสารดังกล่าวในปริมาณมากขึ้น โดยใช้คอลัมน์ Biogel P- 2 superfine (Bio-Rad) ซึ่งคอลัมน์ดังกล่าวสามารถแยกน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ และไดแซคคาไรด์ ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ดังแสดงในรูปที่ 7.15) แต่การวิเคราะห์โครงสร้างที่แท้จริงของน้ำตาลดังกล่าวกำลังอยู่ในระหว่างดำเนินการศึกษาต่อไป

7.3.2 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้ว

การศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้ว โดยวิธี equilibrium controlled synthesis โดยใช้ partially purified enzymes หลังจากผ่าน DEAE-cellulose column ปริมาณ 1.0 หน่วยเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับ 30 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาลกาแลคโตสใน 10 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 5 ที่ 55° ซ แล้วตรวจผลิตผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นที่เวลาต่าง ๆ กันด้วย



7.12 Dionex carbopac PA-1 h.p.l.c. profile of synthesis products obtained by incubating purified *Dalbergia cochinchinensis* Pierre β-glucosidase/β-fucosidase with 50% w/w glucose.

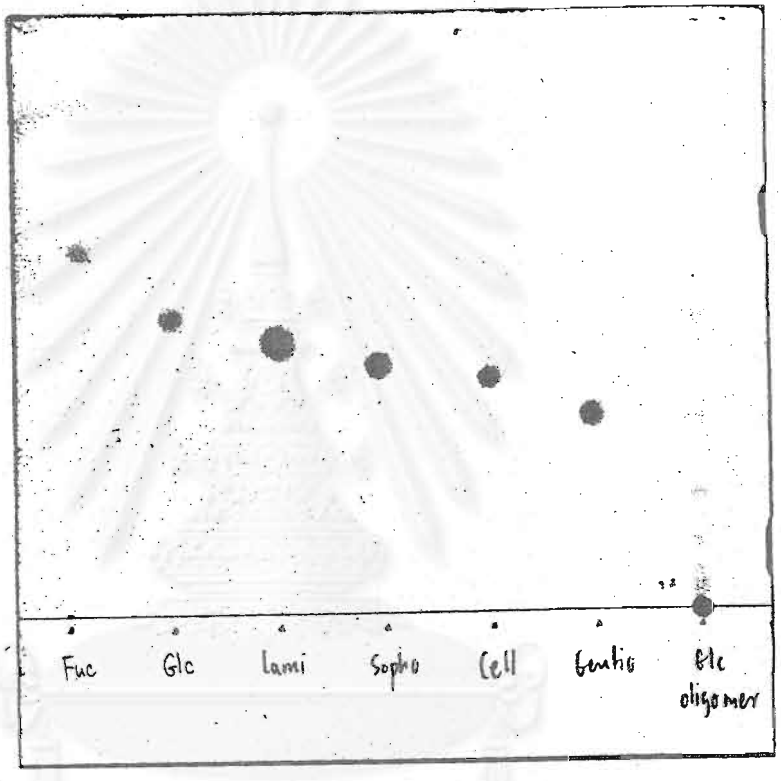


Figure 7.14 Separation of glucose disaccharides and other sugars by thin-layer chromatography using 1-butanol: ethanol: water (5:3:2 by vol.). Fuc = D-fucose; Glc = D-glucose; Lami = laminaribiose; Sopho = sophorose; Cell = cellobiose; Gentio = gentiobiose; Glc oligomer = glucose oligomer.

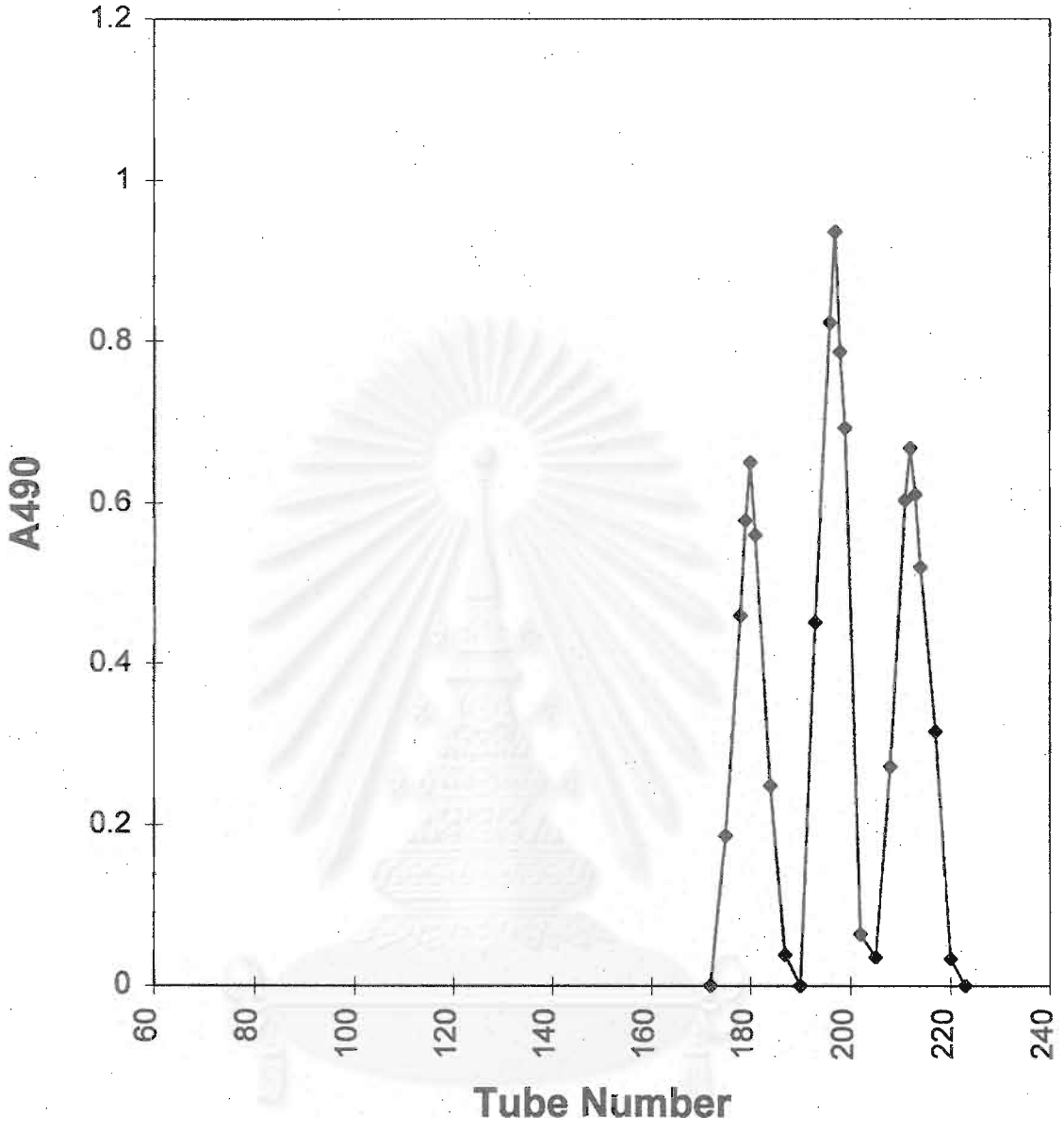


Figure 7.15 Separation of trisaccharide, disaccharide and monosaccharide (in order of elution) on Biogel P-2 superfine chromatography.

h.p.l.c (Aminex HPX 87 C column) พบว่าหลังจาก 7 วัน จะมีสารใหม่เกิดขึ้น 2 peak ดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยพบทั้งไดแซคคาไรด์ และ ไตรแซคคาไรด์

การศึกษาผลของ pH ต่อการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้วพบว่า เมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้ 33% โดยน้ำหนักของน้ำตาลกาแลคโตสที่อุณหภูมิ 50° ซ ใน McIlvaine บัฟเฟอร์ pH ระหว่าง 3-6 พบว่าหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน พบว่า pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 3-4 ดังแสดงในรูปที่ 7.16 เมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของปฏิกิริยาระหว่าง 40° ซ ถึง 80° ซ ในสารละลาย McIlvaine บัฟเฟอร์ pH 4.0 พบว่าอุณหภูมิไม่ค่อยมีผลต่อปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 7.17

ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์พบว่าหลังจากทำปฏิกิริยา 7 วัน ใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท 20-30 % โดยน้ำหนักของน้ำตาลกาแลคโตสจะมีโอลิโกแซคคาไรด์เกิดขึ้น 15% ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทมากกว่านี้จะมีโอลิโกแซคคาไรด์เกิดขึ้นน้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 7.18

เมื่อศึกษาผลของเวลาต่อการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์พบว่า โอลิโกแซคคาไรด์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อทิ้งไว้นานขึ้น และจะพบเกิดเป็นไดแซคคาไรด์มากเป็น 3 เท่าของไตรแซคคาไรด์ ดังแสดงในรูปที่ 7.19

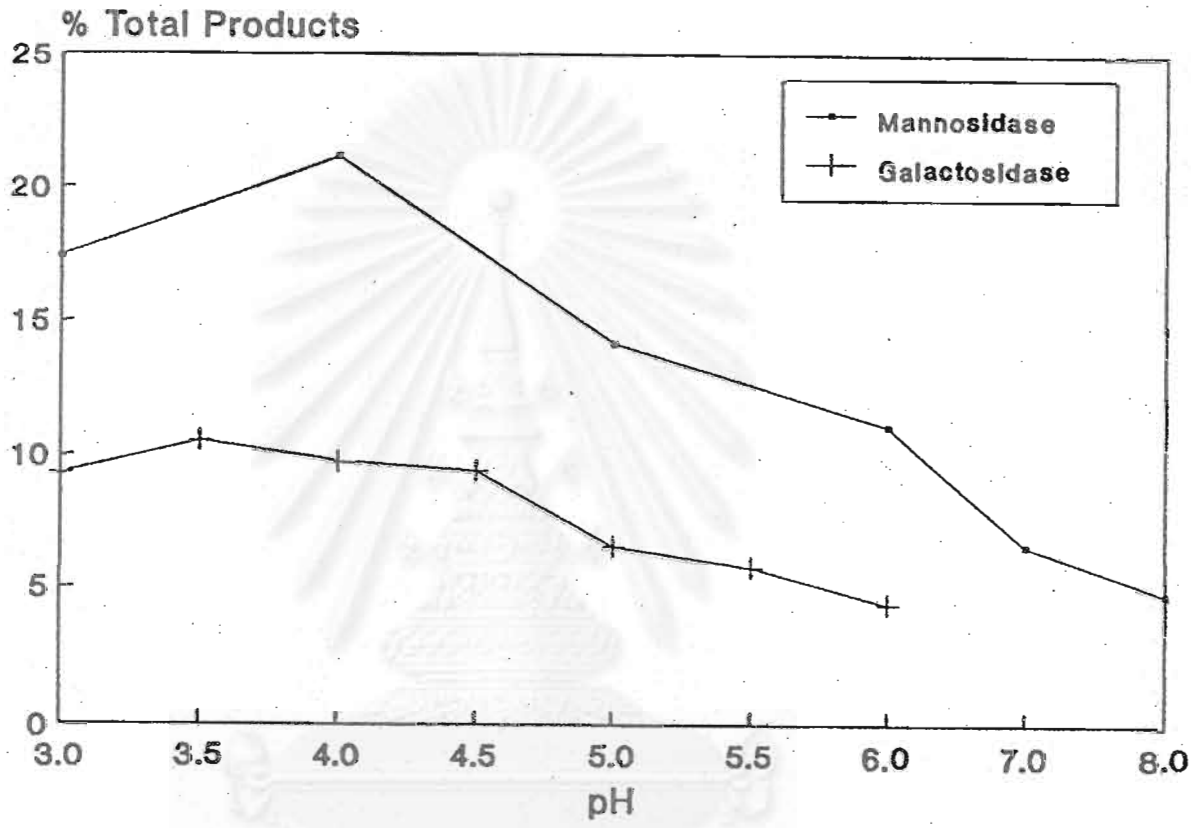


Figure 7.16 pH profiles of oligosaccharide synthesis by β-galactosidase and by α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima. β-Galactosidase was incubated with 33% (w/w) D-galactose in 0.1 M McIlvaine buffer at pHs 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0. 5.5, and 6.0 at 50°C for 7 days. α-Mannosidase was incubated with 50% (w/w) D-mannose in 0.1 M McIlvaine buffer at pHs 3.0, 4.0, 5.0. 6.6 and 7.0 for at 55°C for 7 days.

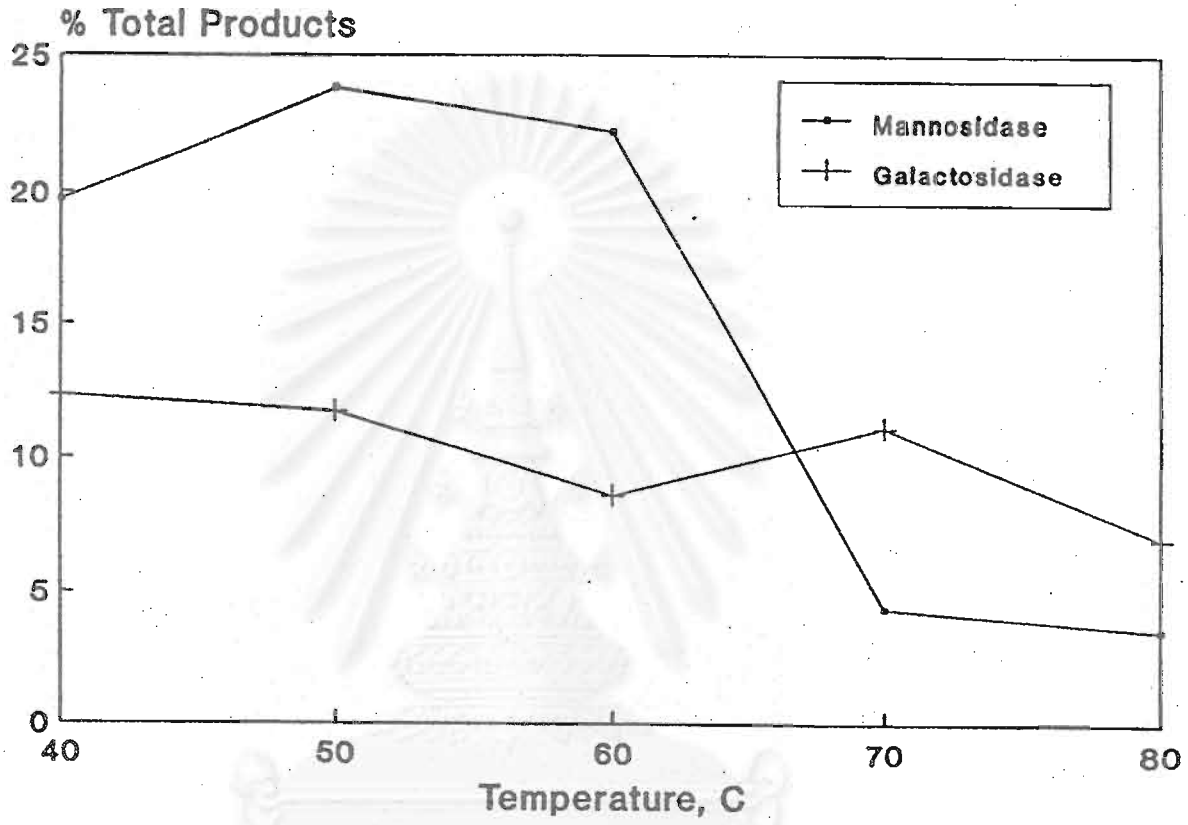


Figure 7.17 Temperature profiles of oligosaccharide synthesis by β-galactosidase and α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima. The reaction mixture containing enzyme solution (1.0 U) and 33% (w/w) of the appropriate sugar was incubated in 0.1 M McIlvaine buffer, pH 4.0 at various temperatures ranging from 40-80°C for 7 days.

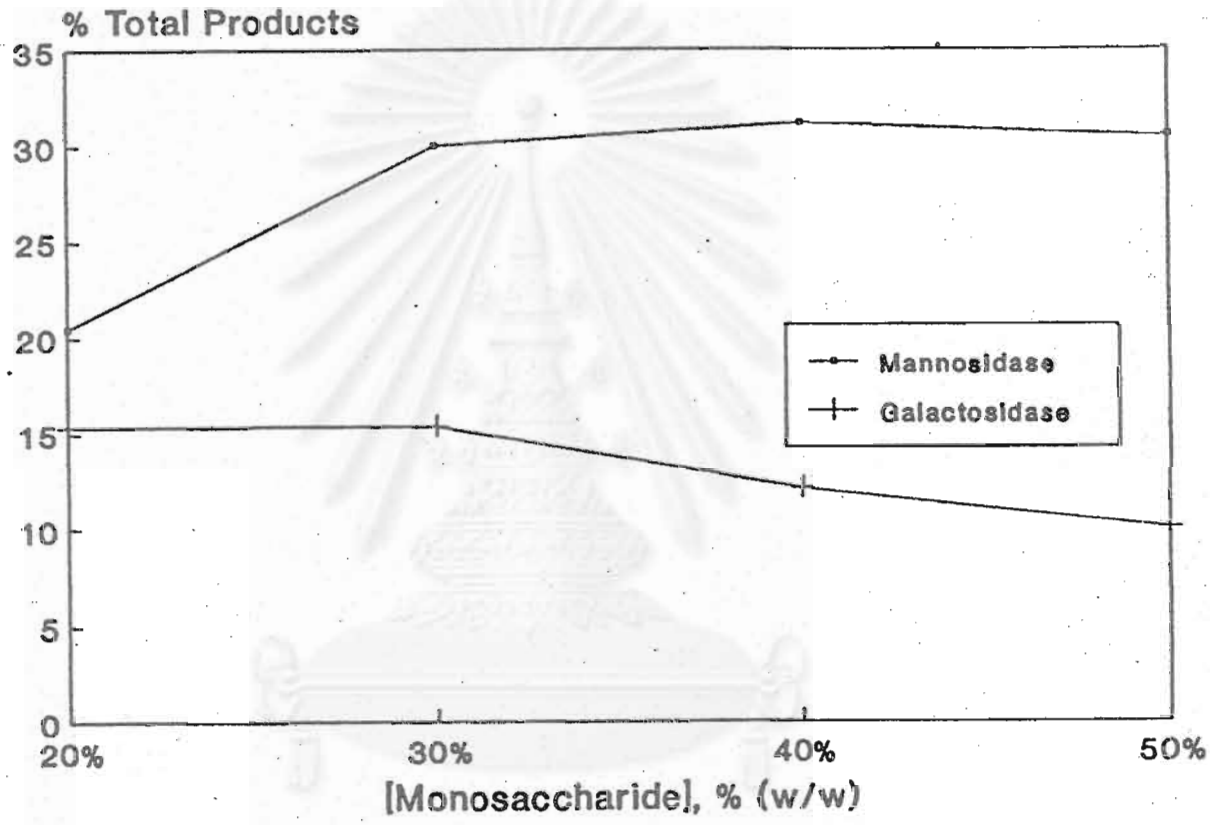


Figure 7.18 Effect of monosaccharide concentration on yield of synthesis by β-galactosidase and α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima. Enzyme (1.0 U) was incubated with various sugar concentrations, 20%, 30%, 40% and 50% (w/w) of D-galactose or D-mannose in 0.1 M McIlvaine buffer, pH 4.0 at 50°C for 7 days.

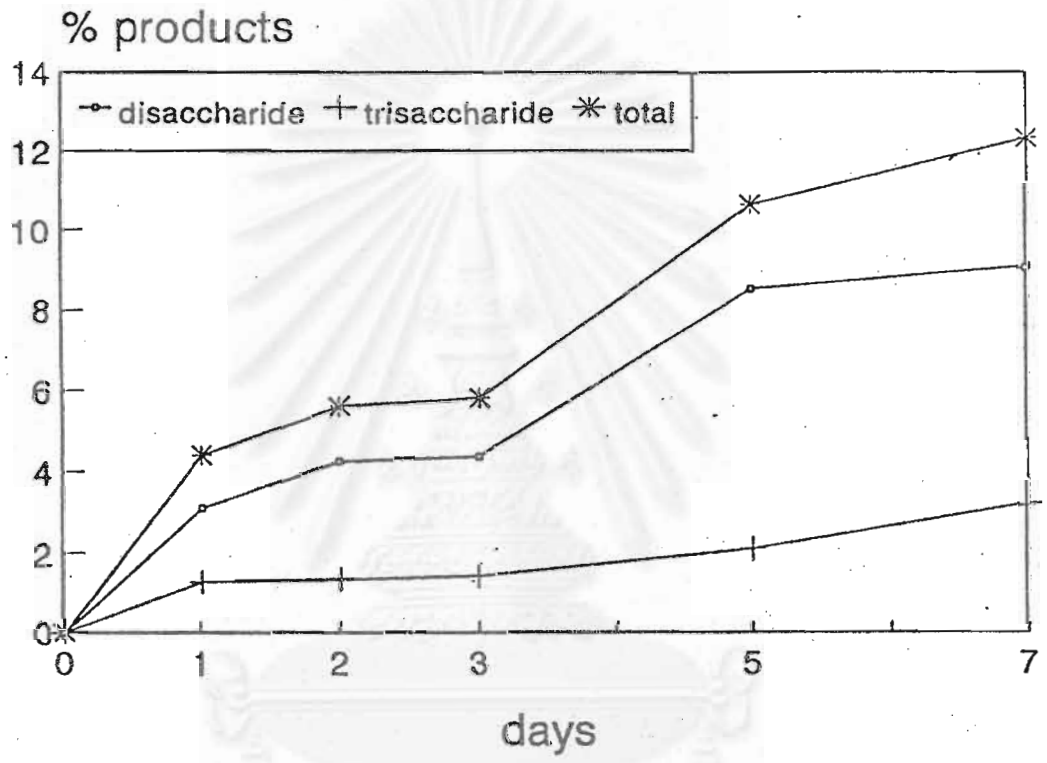


Figure 7.19 Time course of oligosaccharide synthesis by β-galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima. β-Galactosidase (1.0 U) was incubated with 33% D-galactose in 0.1 M McIlvaine buffer, pH 4.0 at 40°C for 1, 2, 3, 5 and 7 days.

7.3.3 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ อัลฟา-แมนโนซิเดส

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดปอแก้ว เมื่อใช้ partially purified enzyme จากเมล็ดปอแก้วที่แยกได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75% ตามด้วยคอลัมน์ DEAE-celluloseพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาที่มี 33% โดยน้ำหนักของน้ำตาล D-mannose ในสารละลาย 10 มิลลิโมลาร์โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 55°ซ เป็นเวลา 7 วัน จะพบว่ามีการสร้าง man(α1- 6) man และ man(α1-2) man หรือ man(α1- 3) man เกิดขึ้นและยังอาจมี trimannoside เกิดขึ้นด้วย ดังแสดงในรูปที่ 7.20 จากการศึกษา pH ที่เหมาะสมของปฏิกิริยาดังกล่าวพบว่า pH ที่มีการสังเคราะห์เกิดขึ้นได้สูงสุดคือที่ pH 4.0 (รูปที่ 7.16) อุณหภูมิที่มีการสังเคราะห์เกิดขึ้นสูงสุดคือที่อุณหภูมิ 40° ซ- 60° ซ (รูปที่ 7.17) และความเข้มข้นของน้ำตาลแมนโนสที่สูงกว่า 30 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อการเกิดผลิตผลของปฏิกิริยา ดังแสดงในรูปที่ 7.18 จะเห็นได้ว่าผลิตผลของปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเร็วในวันแรก โดยเฉพาะไดแซคคาไรด์และจะมีอัตราการเกิดช้าลงในวันถัดๆ มาและหลังจาก 7 วัน อัตราการเพิ่มของโอลิโกแซคคาไรด์จะเกิดขึ้นช้ามาก (รูปที่ 7.21) ผลการสร้างจะพบว่า ไดแซคคาไรด์เกิดขึ้นมากกว่าไตรแซคคาไรด์ ประมาณ 4-5 เท่า

การศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดถั่วนางแดง (*Vigna umbellata* Ohwi & Ohashi) ซึ่งเป็น partially purified enzyme ซึ่งได้จากการนำ crude extract มา dialyse กับ 1 มิลลิโมลาร์ $ZnSO_4$ ในสารละลาย glycine-NaOH บัฟเฟอร์ พีเอช 10 จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE- cellulose ตามด้วยคอลัมน์ hydroxyapatite จะได้เอนไซม์ที่มี yield 28 % และมีการเจือปนจากเอนไซม์อื่นอยู่บ้างเล็กน้อย คือ มี β-galactosidase 4.6 %, β-N- acetyl-glucosaminidase 4.3% และ N-acetyl-galactosaminidase 2.5% พบว่าสามารถสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้เมื่อใช้เอนไซม์ 0.5

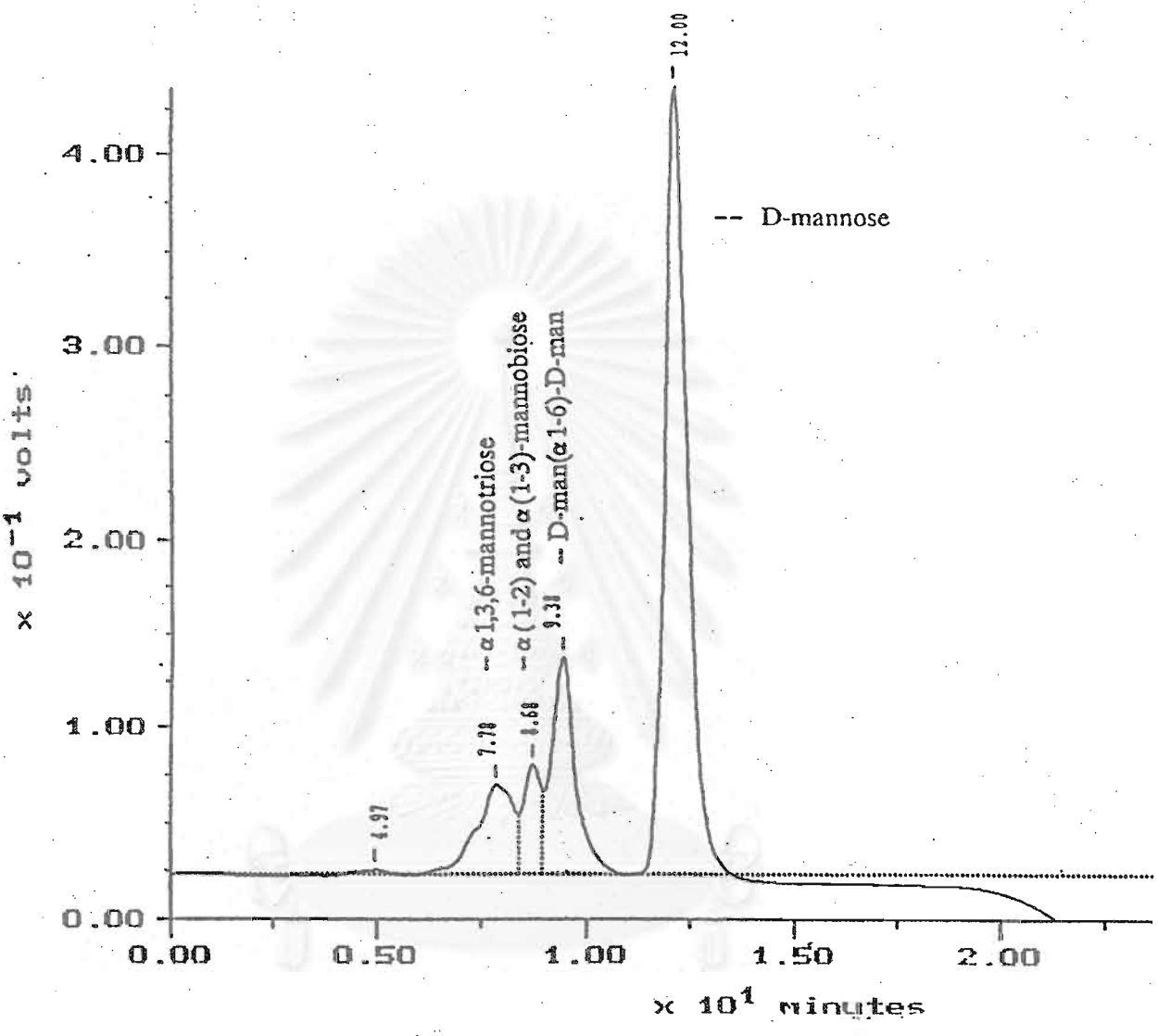


Figure 7.20 H.p.l.c. profile of the synthesis products obtained with α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima. α-Mannosidase was incubated with 33% w/w D-mannose at 55°C for 7 days. Products were compared to the retention times of standard markers.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

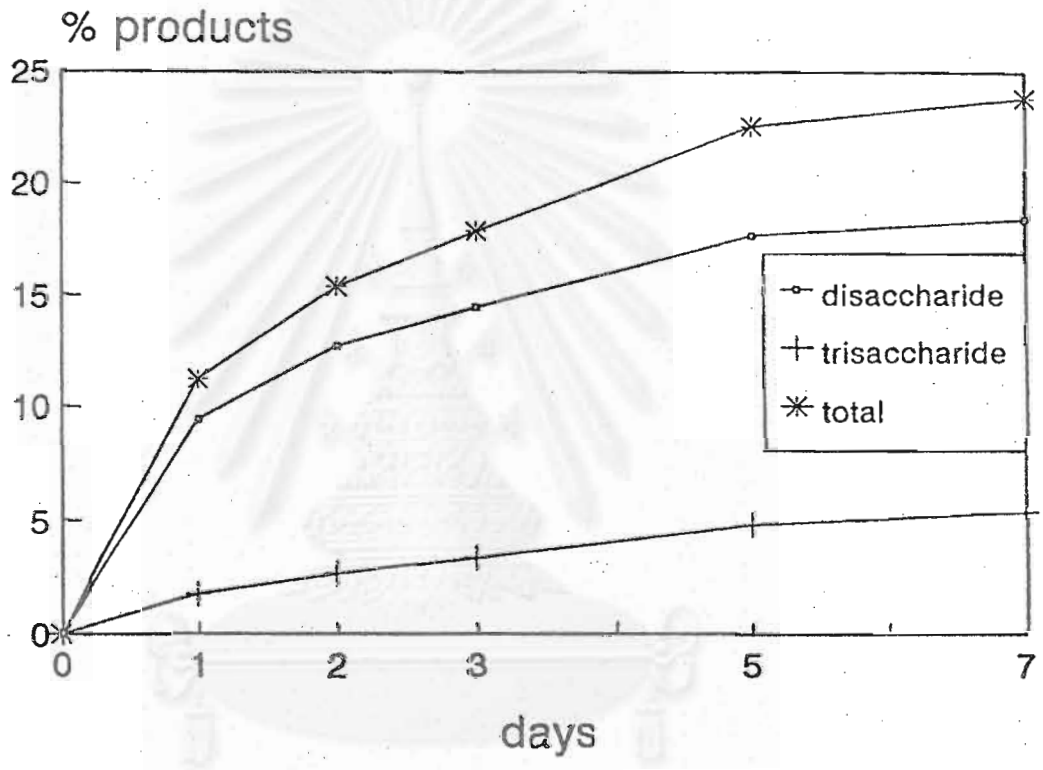


Figure 7.21 Time course of oligosaccharide synthesis by α-mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* var altissima. α-Mannosidase (1.0 U) was incubated with 33% D-mannose in 0.1 M McIlvaine buffer, pH 4.0 at 50°C for 1, 2, 3, 5 and 7 days.

หน่วย/ มิลลิลิตร บ่มในสารละลายน้ำตาลแมนโนส 50 เปอร์เซนต์ 50 ^{o}ซ เปรียบเทียบกับการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์อัลฟา- แมนโนซิเดสจากถั่วแจ๊คและเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดอัลมอนด์ พบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าวจะเกิดการสร้างแมนโนไบโอสขึ้น ซึ่งแมนโนไบโอสที่เกิดขึ้นสามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ High performance anion exchange chromatography (HPAEC) โดยใช้ Isocratic elution ด้วย 0.5 โมลาร์หรือ 0.75 โมลาร์ของ NaOH (eluent A) ซึ่งจะสามารถแยก man(α1-6)man ออกจาก man(α1- 2) man ซึ่งออกมาพร้อมกับ man (α1- 3) man ได้(รูปที่ 7.22a) และเมื่อเปลี่ยนตัวชะ (eluent B) จะสามารถแยก man(α1- 6)man ออกจาก man(α1- 2) man และ man(α1- 3) man ได้ แต่ผลการแยกยังต้องปรับปรุงให้ดีขึ้นอีก (รูปที่ 7.22b)

นอกจากนี้ตัวชะชนิดที่ 3 (eluent C) ยังสามารถแยก man(α1- 6)man และ man(α1- 2)man ออกจาก man(α1- 3)man (รูปที่ 7.22c) โดยใช้แมนโนซิเดสจากถั่วนางแดง ผลการสังเคราะห์พบว่าจะมีการสร้าง man (α1- 2) man ได้เร็วกว่า man(α1- 6) man ในระยะแรก แต่ในเวลาต่อๆมาระดับของ man(α1- 6) man จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (รูปที่ 7.23) การศึกษาการใช้สภาวะต่าง ๆ กันเพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์คือ 50-60 ^{o}ซ (รูปที่ 7.24a) pH ที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์คือ pH 4.0 (รูปที่ 7.24b) และความเข้มข้นของน้ำตาลแมนโนสที่ใช้ คือ 70% (น้ำหนัก / ปริมาตร) (รูปที่ 7.24c) ปริมาณของน้ำตาลที่มากกว่านี้จะไม่เพิ่ม yield และอัตราการเกิดปฏิกิริยา เมื่อศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะพบว่าถ้าใช้อุณหภูมิของปฏิกิริยาสังเคราะห์สูงกว่า 60 ^{o}ซ เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตี้ไปหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วัน

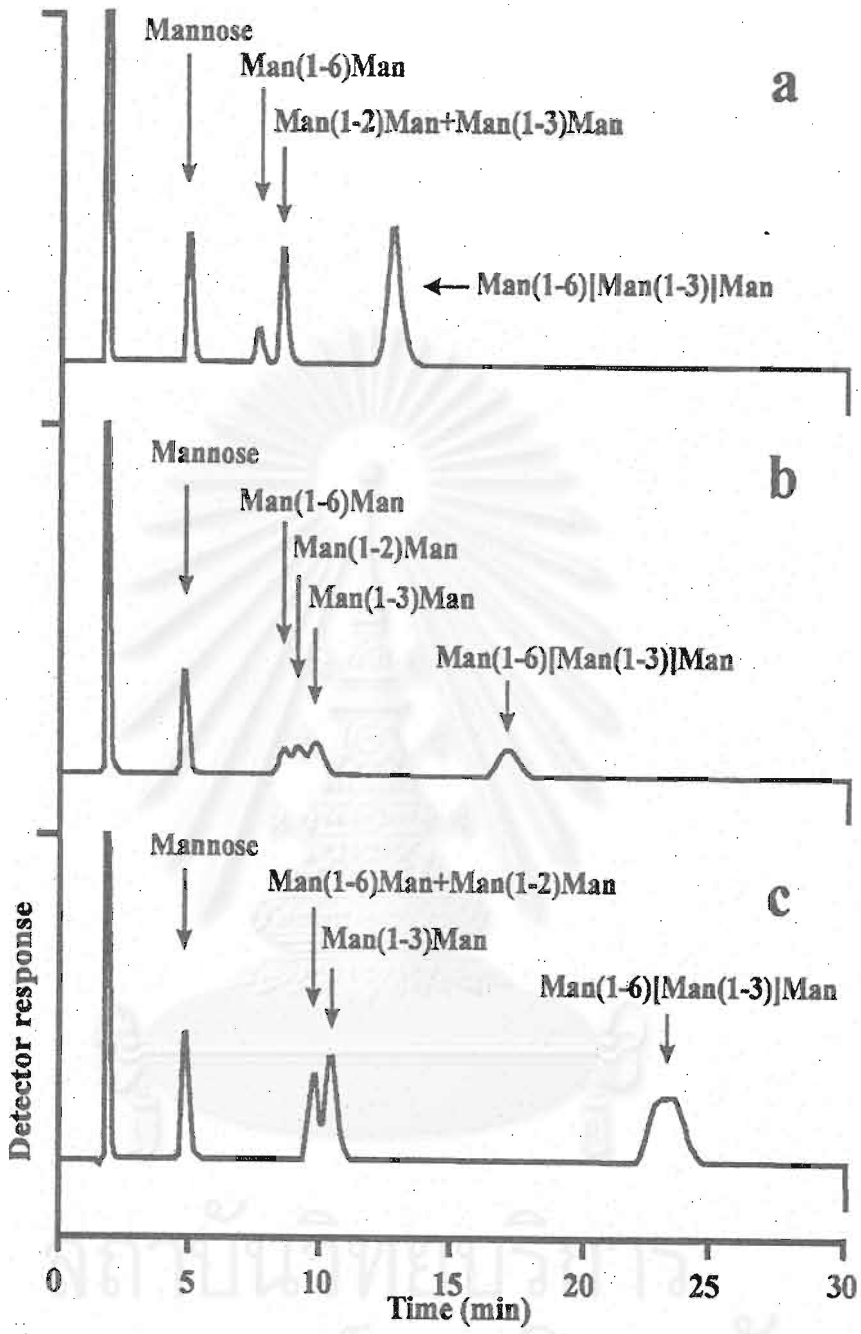


Figure 7.22 HPAEC profiles of various standards analysed on CarboPac PA1 column equipped with PAD using (a) **eluent A** (0.075 N NaOH), (b) **eluent B** (0.075 N NaOH + 0.164 mM zinc acetate), and (c) **eluent C** (0.1 N NaOH + 0.65 mM zinc acetate) as mobile phases. Standards are D(+)-mannose, Manα(1-6)Man, Manα(1-2)Man, Manα(1-3)Man, and Manα(1-6)[Manα(1-3)]Man.

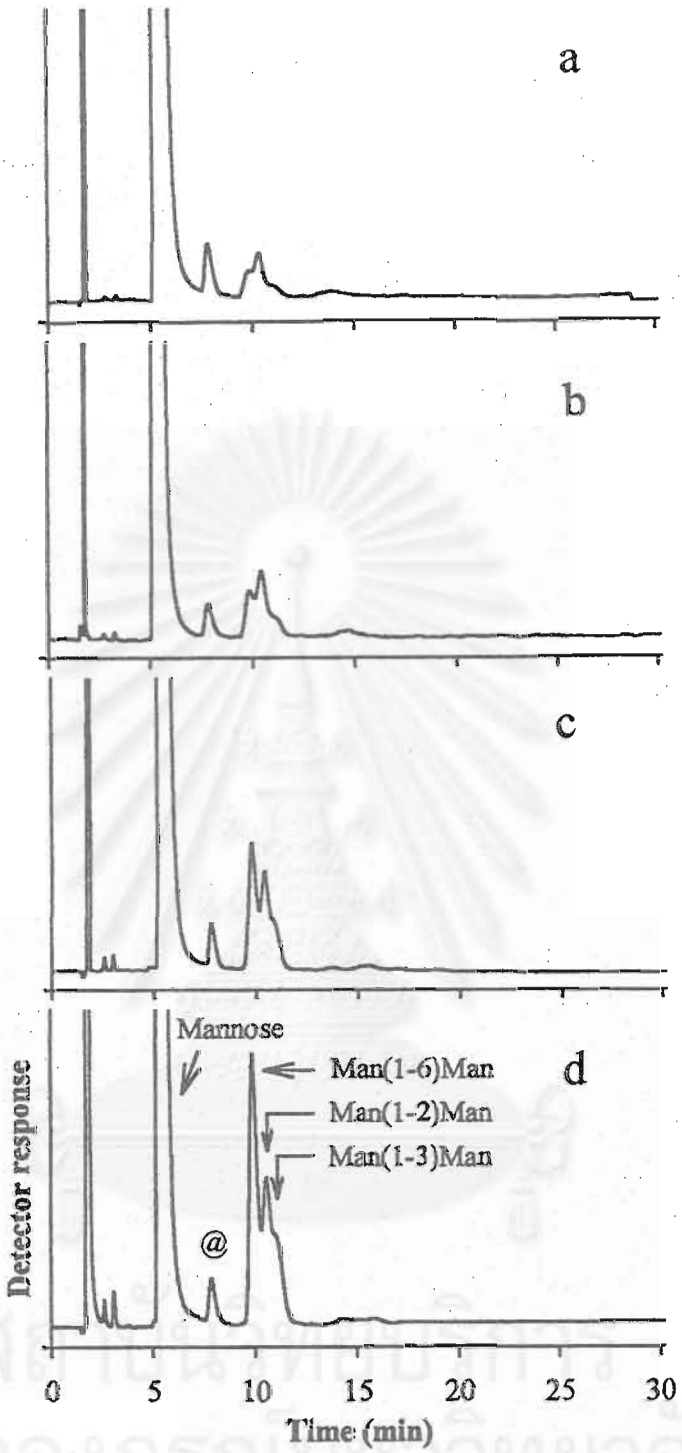


Figure 7.23 HPAEC profiles of products after synthesis for 1 (a), 3 (b), 5 (c), and 11 (d) days by α-mannnosidase from Vigna umbellata. Samples were analysed on CarboPac PA1 column using eluent B (0.075 N NaOH + 0.164 mM zinc acetate). Peak @ was believed to be the β-anomer of D (+)-mannose.

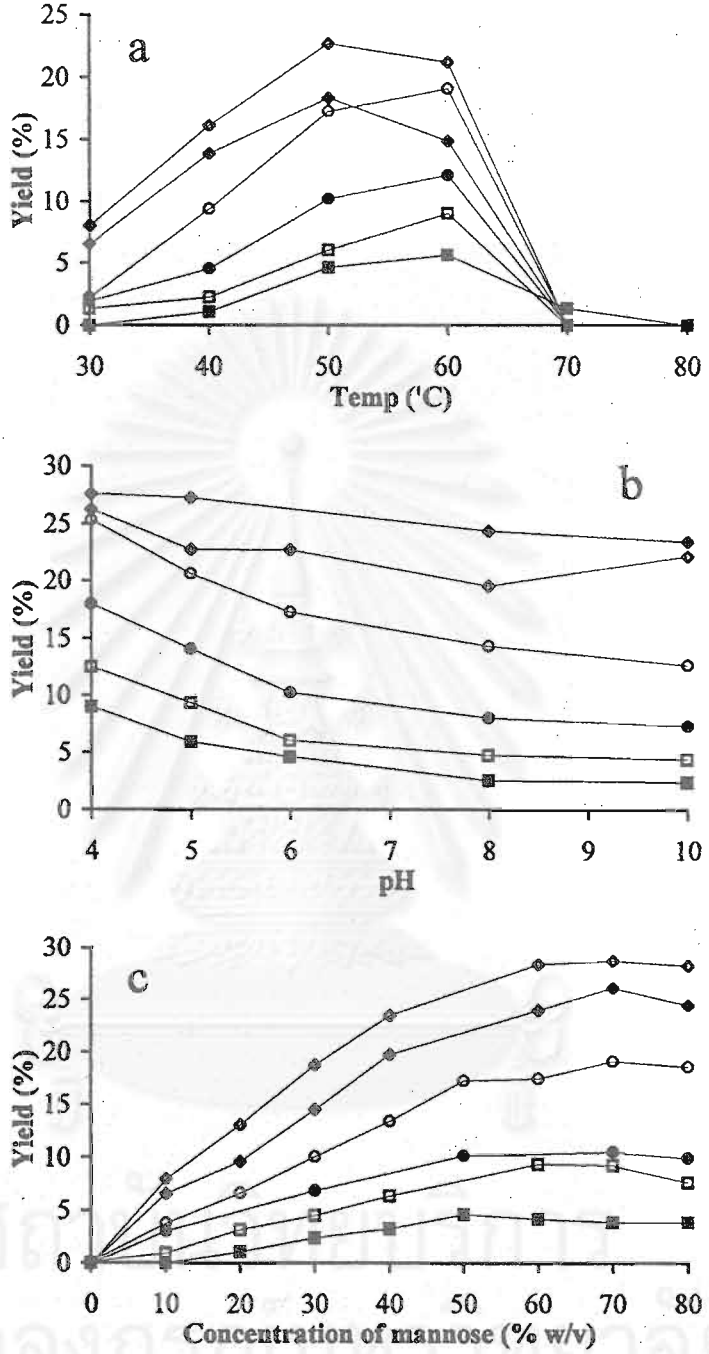


Figure 7.24 Yield of total mannobioses after synthesis for 1 (—■—), 2 (—□—), 3 (—●—), 5 (—○—), 8 (—◆—), and 11 (—◇—) days by incubation of Vigna umbellata α-mannosidase (0.5 U/ml) with mannose under various conditions as follows: (a) temperature varied from 30°-80 °C, (b) pH varied from 4.0-10.0, and (c) concentration of mannose from 10% - 80% w/v.

จากการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth) พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75 เปอร์เซนต์ จะพบว่าสามารถใช้สังเคราะห์โอลิโกแมนโนไซด์ได้ (รูปที่ 2.1) และเมื่อใช้ partially purified enzyme ที่มีแอคติวิตี้ของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสอื่น เจือปนอยู่น้อยกว่า 1% เมื่อบ่มปฏิกิริยาในสารละลายน้ำตาลแมนโนสที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก ในสารละลายซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 4.5 ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}ซ เป็นเวลา 4 วัน จะพบว่ามีการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณมาก (รูปที่ 7.25) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาการสังเคราะห์พบว่าอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์คือ อุณหภูมิ 50 ^{o}C (รูปที่ 7.26) และ pH 4.0-4.5 (รูปที่ 7.27) ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลแมนโนสที่เหมาะสมที่สุดคือ 50-60 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก (รูปที่ 7.28) ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลแมนโนส 60 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก ที่ pH 4.5 แล้วทำปฏิกิริยาที่ 50 ^{o}ซ ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วันจะพบว่ามีการสร้าง man(α1- 6) man 16.3%, man(α1- 2) man รวมกับ man(α1- 3) man 9.07% mannotriose และสายของน้ำตาลแมนโนสที่ยาวกว่า 3 หน่วย ประมาณ 9.45% ของน้ำตาลทั้งหมดในปฏิกิริยา

จากการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* var sabdariffa) พบว่า เมื่อใช้ partially purified enzyme ที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75% ตามด้วยคอลัมน์ DEAE -cellulose ตามด้วย Sephadex G-100 และ Sephadex G-200 จะพบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีเอนไซม์อื่นเจือปนอยู่น้อยกว่า 2 % ของเอนไซม์แอคติวิตี้ทั้งหมด สำหรับ

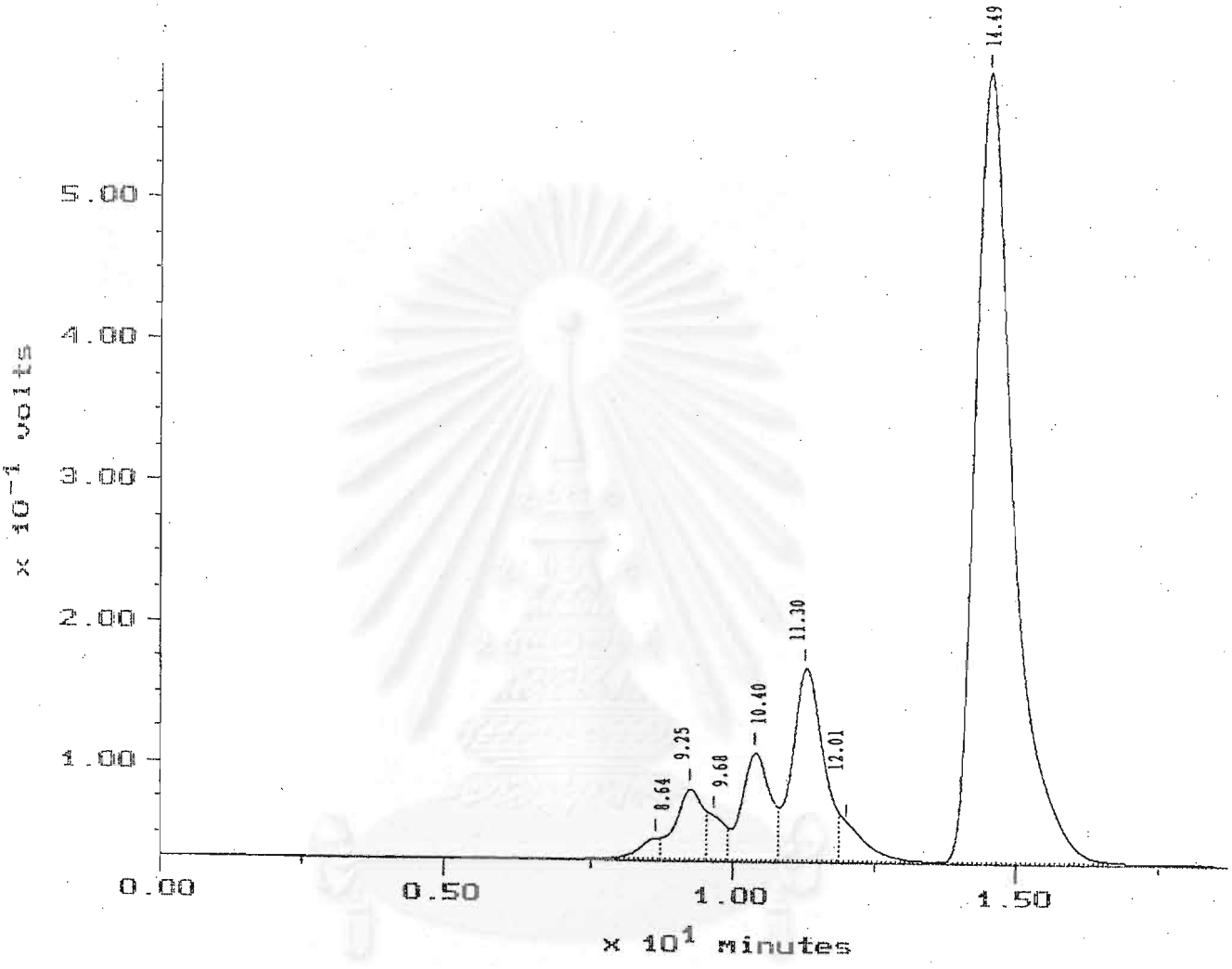


Figure 7.25 H.p.l.c. profile of oligosaccharide products obtained with partially purified α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth. Enzyme was incubated with 50% w/w D-mannose at pH 4.5, 50°C for 4 days. Peaks at 14.49 min, 11.30 min, 10.40 min and 9.25 min represent D-mannose, manα(1-6)man, mixture of manα(1-2) and manα(1-3), and trisaccharides respectively.

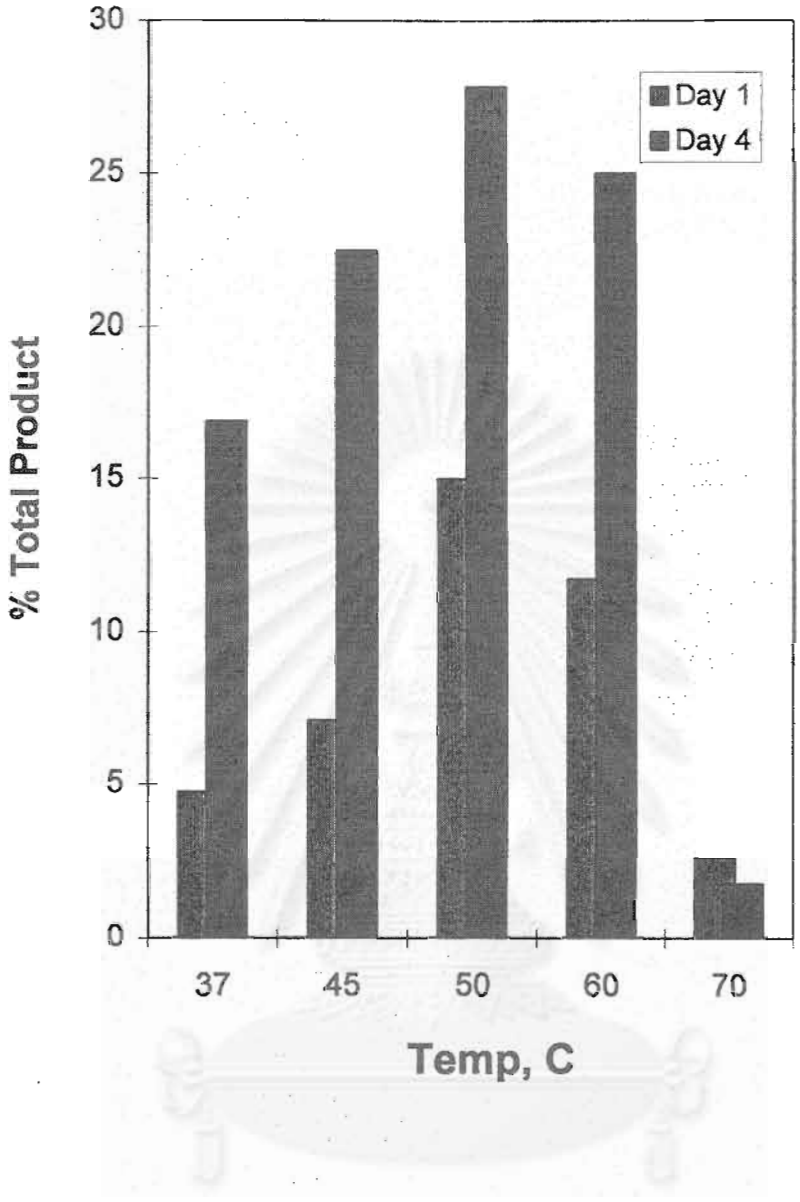


Figure 7.26 Effect of varying temperature on the synthesis of oligosaccharides by α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth. Enzyme was incubated with 50% w/w D-mannose at pH 4.5 at various temperature for 1-4 days.

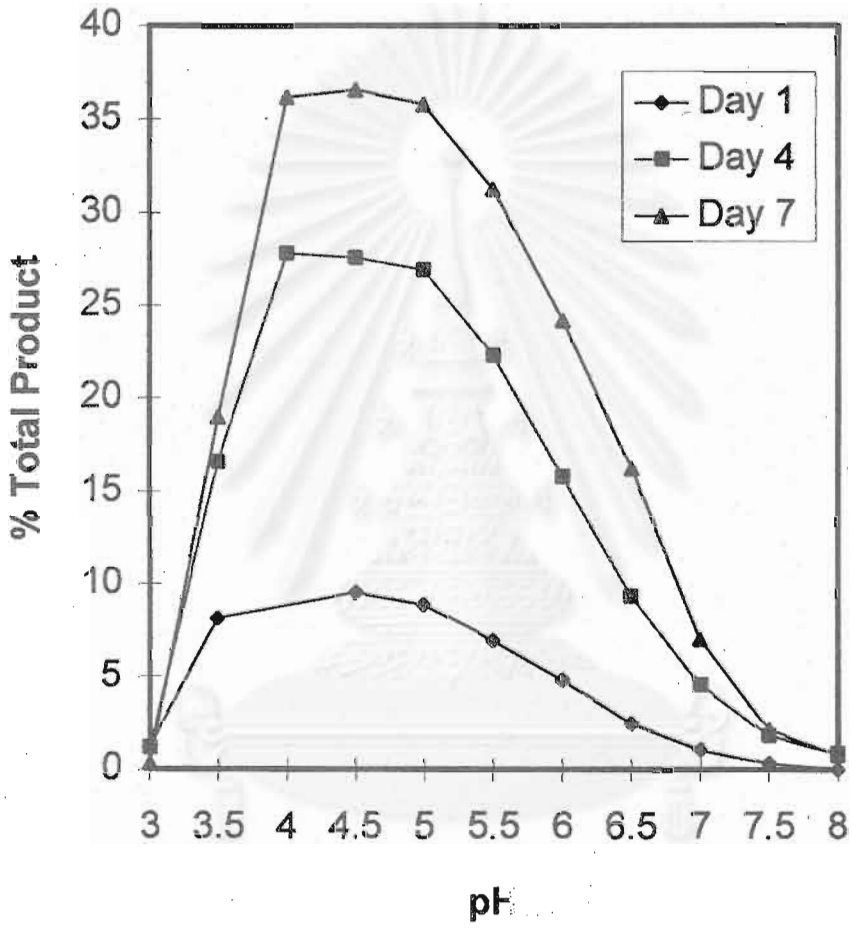


Figure 7.27 Effect of varying pH on the synthesis of oligosaccharides by α-mannosidase from *Albizzia procera* Benth. Enzyme was incubated with 50% w/w D-mannose at various pHs at 50°C for 1-7 days.

การศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ผลการศึกษายังอยู่ในระหว่างดำเนินการและปรับปรุง

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ลินามาเรสจากมันสำปะหลัง ความพยายามในการใช้ลินามาเรส เพื่อสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยพยายามศึกษาสภาวะปฏิกิริยาต่าง ๆ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูง (50-70% w/w) เป็นสับสเตรท โดยทำปฏิกิริยาที่ pH ต่าง ๆ คือ pH 6 หรือ pH 8 ที่อุณหภูมิ 50^{o} ซ และ 70^{o} ซ เป็นเวลา 48-96 ชม. แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ด้วย h.p.l.c โดยใช้ Aminex column พบว่าสามารถสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ได้แต่มีปริมาณน้อยมากคือ ประมาณ 2-5% ดังแสดงในรูปที่ 7.29

7.4 บทวิจารณ์

จากผลการศึกษาทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไกลโคซิเดสทุกชนิดที่ได้จากเมล็ดพืชในประเทศไทยที่ทำการศึกษาสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ เช่นเดียวกับที่ได้มีผู้รายงานไว้ คือ เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากถั่วแจ๊ค (17-19) เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนสจากเชื้อรา *Penicillium emersonii* (20) เอนไซม์กลูโคอะมิเลสจาก *Aspergillus niger* (21) โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะให้ผลิตผลชนิดใดจะขึ้นกับความจำเพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดไป และจากการศึกษาทั้งหมดจะเห็นว่าสภาวะของปฏิกิริยาควรต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเพื่อปรับให้เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด นอกจากนี้จะพบว่าส่วนใหญ่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ในการเร่งการสลายจะเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเร่งการสังเคราะห์ด้วย ตัวอย่างเช่นเอนไซม์ β-glucosidase จากเมล็ดพะยูงมี pH ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาการสลาย pNP-β-glucoside ที่ pH 5.0 จะมี pH ที่สามารถใช้สังเคราะห์สารได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 ด้วย เป็นต้น ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้อง

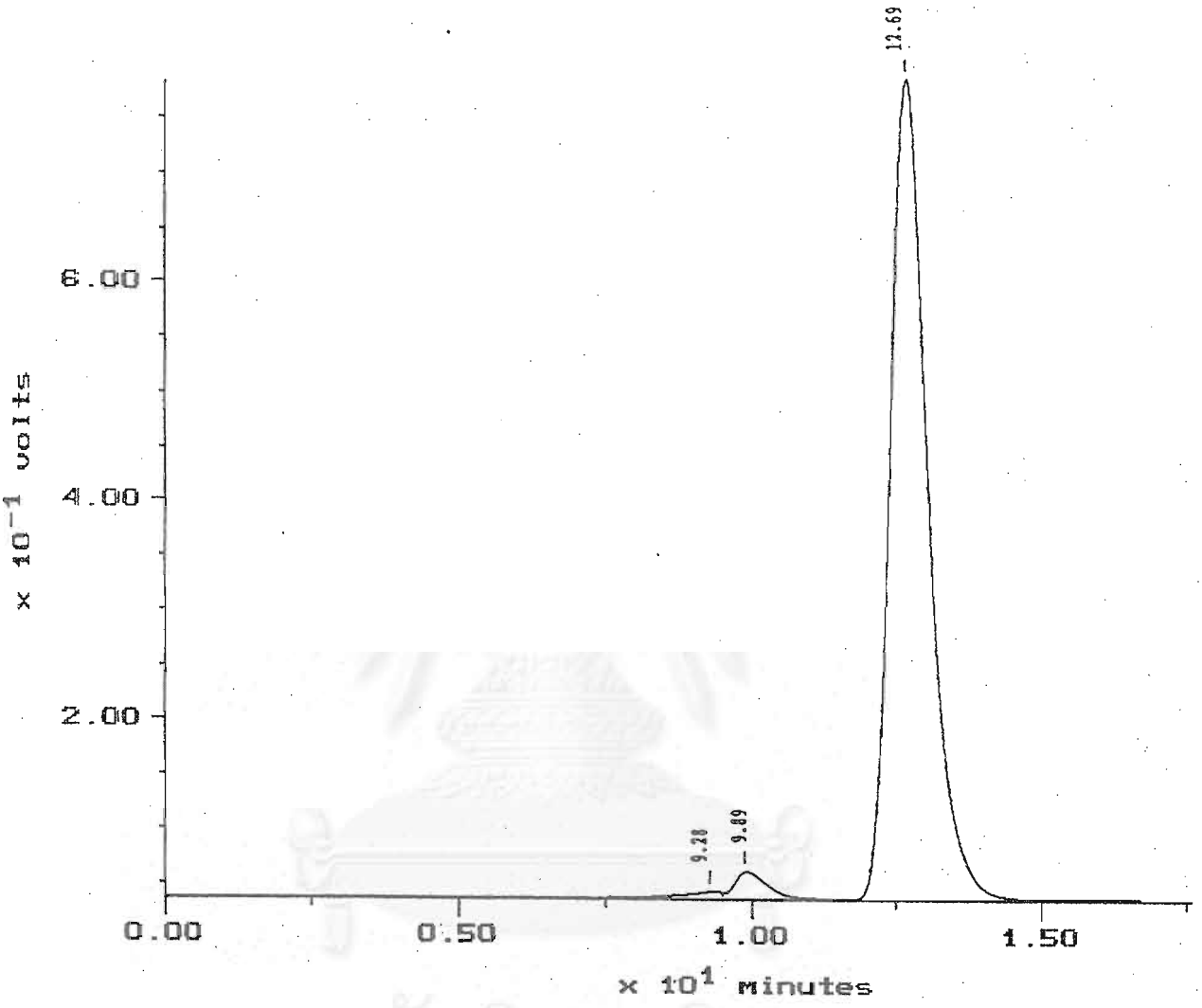


Figure 7.29 H.p.l.c. profile of synthesis using purified cassava linamarase. Enzyme was incubated with 50% w/w D-glucose at pH 5.5, 50°C for 7 days. Peaks at 12.69 min, and 9.89 are glucose and disaccharide respectively.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กับโครงสร้างของเอนไซม์ในระดับทุติยภูมิและตติยภูมิจะทำให้บริเวณเร่งของเอนไซม์อยู่ในสภาพที่พร้อมมากที่สุดสำหรับการทำงาน

จากผลการศึกษาเอนไซม์ β- glucosidase / β-fucosidase จากเมล็ดพะยูงจะพบว่าอาจสามารถสังเคราะห์ โอลิโกแซคคาไรด์ ชนิดใหม่ขึ้นด้วย (novel oligosaccharide) แต่เนื่องจากการวิเคราะห์สารดังกล่าวต้องใช้สารปริมาณมาก และต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ตลอดจนความชำนาญในการแยกและวิเคราะห์สารคาร์โบไฮเดรททางเคมี ขณะนี้การศึกษาโครงสร้างของสารที่สร้างขึ้นใหม่ยังคงอยู่ในระหว่างดำเนินการ คาดว่าจะต้องใช้เทคนิคของ nuclear magnetic resonance (n.m.r) และ gas chromatography-mass spectrometry (g.c.-m.s) ในการวิเคราะห์โครงสร้างสารดังกล่าว

ในส่วนของเอนไซม์ อัลฟา-แมนโนซิเดส มีเมล็ดพืชอื่นหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ อัลฟา-แมนโนซิเดส ได้นอกจากถั่วแจ๊ค ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีอยู่ในปัจจุบันและมีวางขายแล้ว เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะต่อพันธะไกลโคซิดิกที่ไม่แตกต่างกันมากนักทำให้การเกิดโอลิโกแซคคาไรด์ ค่อนข้างจะคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่ามักจะพบ man(α1-6)man ถูกสร้างขึ้นมากกว่าไดแซคคาไรด์ชนิดอื่นที่จุดสมดุลย์ ทั้งนี้จากการศึกษาโดยใช้ α-mannosidase จาก *Vigna umbellata* เสนอว่าอาจเป็นไปได้ที่การที่ตัวเอนไซม์ปกติจะมี regiospecificity ต่อพันธะ α1-2 ในปฏิกิริยาการสลายสับสเตรท (hydrolysis) ดังนั้นเมื่อมีการสังเคราะห์เกิดขึ้นจึงจะมีการสร้างพันธะ α1 - 2 ขึ้นก่อนและหลังจากทิ้งปฏิกิริยาไว้เป็นเวลานานขึ้น man (α1 - 2) อาจจะเข้าสู่สภาวะสมดุลย์ก่อนแล้ว จึงมี man (α1 - 6) man เกิดขึ้นต่อไป ซึ่งปรากฏการณ์นี้พบได้ในปฏิกิริยาอื่น ๆ เช่นกัน ดังนั้น

จากการศึกษานี้เสนอว่ามีความเป็นไปได้ที่การเกิดพันธะของแซคคาไรด์นอกจากจะขึ้นกับ regiospecificity ของเอนไซม์แล้วยังอาจขึ้นกับระยะเวลาของปฏิกิริยาด้วย

จากผลการศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสจากเมล็ดปอแก้วพบว่าระดับของการสังเคราะห์อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่น่าพอใจเท่าใดนัก ดังนั้นจึงไม่แนะนำการนำเอนไซม์ดังกล่าวไปใช้ต่อไป

นอกจากนี้เนื่องจากเอนไซม์จำพวก glucosidase เองก็ยังแบ่งออกไปอีกเป็นหลายจำพวกคือเป็น thioglucosidase, cyanogenic glycoside hydrolase หรือ glucohydrolase ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีความสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ไม่เท่ากัน โดยจะเห็นว่าในขณะที่เอนไซม์จากเมล็ดพะยูงมีศักยภาพสูงในการใช้สังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ลินามาเรสเอนไซม์จากหัวมันสำปะหลังจะไม่สามารถใช้ในการสังเคราะห์ได้เนื่องจากเกิดผลิตผลที่ได้น้อยเกินไป

สิ่งที่ควรจะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมคือ การใช้เทคนิค enzyme immobilization มาช่วยในการเพิ่มอัตราการสังเคราะห์ของโอลิโกแซคคาไรด์ และการทำ aqueous two phase system เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสังเคราะห์ของเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งเทคนิคทั้งสองนี้ได้มีผู้ศึกษาและรายงานไว้บ้างแล้ว แต่รายงานในเรื่องนี้ยังมีไม่มากนัก ตลอดจนเมื่อเอนไซม์ใช้ในการศึกษาเป็นเอนไซม์ใหม่ ยังไม่มีผู้ใดเคยศึกษามาก่อนจึงต้องทำการศึกษาเพื่อหาข้อมูลพื้นฐานทั้งหมดเสียก่อนเพื่อที่จะสามารถนำข้อมูลพื้นฐานที่ได้ไปปรับปรุงเปลี่ยนแปลงตัวเอนไซม์เพื่อการประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

บทที่ 8

สรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการสังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสในสภาวะแวดล้อมที่ปรับเปลี่ยนให้เหมาะสมต่อการสังเคราะห์มากที่สุดเป็นหลักสำคัญ เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับชนิดและปริมาณเอนไซม์ที่สามารถใช้ในการสังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ในพืชต่าง ๆ ที่มีในประเทศไทย โดยขอบเขตของการวิจัยครอบคลุมถึงการค้นหาเอนไซม์ไกลโคซิเดสจากพืชพื้นเมืองในประเทศไทยที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไกลโคซิเดสปริมาณสูง ศึกษารายละเอียดของเอนไซม์ที่ตรวจพบ และตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งงานวิจัยในสาขานี้เป็นงานที่ค่อนข้างใหม่และยังไม่มีผู้วิจัยมากนัก โดยคาดหวังว่าจะเป็นการเพิ่มพูนความรู้พื้นฐานในเรื่องของเอนไซม์ไกลโคซิเดสในพืชที่พบในประเทศไทย เรื่องของการสร้างสารใหม่ โดยวิธีการใช้เอนไซม์ เพื่อปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารโอลิโกแซคคาไรด์ให้ดียิ่งขึ้นกว่าที่มีอยู่ในปัจจุบัน

ผลการวิจัยพบว่า เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสหลายชนิด สามารถพบได้ในพืชในประเทศไทยดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องคัดเลือกเอนไซม์บางชนิดเท่านั้นเพื่อให้งานวิจัยสามารถบรรลุเป้าประสงค์ที่ตั้งไว้ในระยะเวลาที่กำหนด โดยอาศัยเกณฑ์การคัดเลือกดังนี้

1. พบในปริมาณมากในแหล่งที่ตรวจสอบ เพื่อให้สามารถแยกสกัดและเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้โดยไม่ยากนัก

2. หากพบในปริมาณที่ไม่สูงมากนัก แหล่งที่มาของเอนไซม์ควรจะหาได้ง่าย
3. มีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่แตกต่างกัน และมีความจำเพาะต่อพันธะที่ย่อยสูงมาก
4. ต้องมีความสามารถที่จะใช้สังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์ได้โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับ
5. ควรมีความคงตัวสูง เก็บไว้ได้นานโดยไม่มีการเสียสภาพ

จากการตรวจสอบพืชกว่า 60 ชนิดใน 17 ตระกูล และบางชนิดมีการตรวจสอบในหลายสายพันธ์ด้วยนั้นพบว่า สามารถพบเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส 6 ชนิดได้แก่ α-mannosidase, β- glucosidase, β- fucosidase, α- galactosidase, β-galactosidase และ β-D-N-acetyl glucosaminidase พบในปริมาณที่ถือได้ว่ามีนัยสำคัญคือมีปริมาณสูงกว่า 0.1 ไมโครโมล/ นาที / กรัมเมล็ดแห้ง ซึ่งใน 38 species ที่ตรวจสอบจะพบว่ามีเอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิด จากผลการศึกษานี้ทำให้พบว่ามีเอนไซม์หลายชนิดจากพืชต่าง ๆ กันที่น่าสนใจทำการศึกษาต่อในรายละเอียดได้แก่ เอนไซม์ β-glucosidase และเอนไซม์ β- fucosidase จากเมล็ดพะยูง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) เอนไซม์ α-D-mannosidase จากเมล็ดถ่อน (*Albizzia procera* Benth) และ ฉนวน (*Dalbergia nigrescens* Kurz) เอนไซม์ α-mannosidase จากเมล็ดถั่วนางแดง (*Vigna umbellata*) เอนไซม์ α-mannosidase และ β-galactosidase จากเมล็ดปอแก้ว (*Hibiscus sabdariffa* var altissima) และกระเจี๊ยบ (*Hibiscus sabdariffa* var sabdariffa) เอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase จากกระถินณรงค์ (*Acacia auriculaeformis*) และสีเสียดแก่น (*Acacia catechu*)

เมื่อศึกษาเอนไซม์บางชนิดในรายละเอียดพบว่า เนื่องจากเมล็ดพะยูงมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ β-glucosidase และ β-fucosidase สูงมาก จึงได้สนใจที่จะศึกษาเอนไซม์นี้ในราย

ละเอียด และพบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้วิธีการง่าย ๆ คือ ตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75% ตามด้วยเทคนิค preparative isoelectric focusing ใน Rotofor apparatus (Bio-Rad, U.S.A) โดยใช้ 2% ampholyte (อัตราส่วน pH 4-6: pH 3-10 เป็น 5:1) ตามด้วย Sephadex G-150 จะได้เอนไซม์บริสุทธิ์ ปรากฏเป็นแถบโปรตีนแถบเดียวเมื่อตรวจสอบด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis โดยมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 13 เท่าได้ yield ประมาณ 30% ไม่สามารถแยกเอนไซม์ β-glucosidase และ β-fucosidase ออกจากกันได้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเป็นเอนไซม์ตัวเดียวกันที่สามารถใช้สับสเตรทได้ 2 ชนิด เอนไซม์ที่เตรียมได้ประกอบด้วย 4-6 หน่วยย่อยที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน มีความคงตัวค่อนข้างสูง สามารถเก็บไว้ได้นานในรูปของ lyophilized form หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ โดยเกือบไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี้เลยเป็นเวลานานกว่า 6 เดือน

จากการศึกษาทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ β- glucosidase /β- fucosidase จากเมล็ดพะยูงพบว่ามีค่า Km ต่อ pNP-β-D-glucoside เป็น 5 มิลลิโมลาร์ และ Km ต่อ pNP-β-D-fucoside เป็น 0.54 มิลลิโมลาร์ และมีอัตราส่วน k_{cat} : K_m สูงสุดสำหรับ pNP-β-D-fucoside เอนไซม์ที่แยกได้มีความจำเพาะสูงต่อ พันธะเบต้า-ไกลโคซิดิก แต่พบแอคติวิตี้ต่อ pNP-β-D-galactoside, pNP-α-L-arabinoside, pNP-β-D-xyloside และ phenyl-β-D-glucoside เล็กน้อย เอนไซม์ถูกยับยั้งได้ด้วยสารประกอบของปรอท และ gluconolactone จากการศึกษาเกี่ยวกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ยืนยันว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้บริสุทธิ์จริงและเป็นโปรตีนชนิดเดียวที่สามารถเร่งปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ 2 ชนิดที่บริเวณเร่งเดียวกันนั้น แต่หลังจากตรวจสอบความสามารถในการย่อยไกลโคไซด์ธรรมชาติหลายชนิดยังไม่สามารถพบสับสเตรทธรรมชาติของเอนไซม์

เมื่อศึกษาความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ของเอนไซม์นี้พบว่า มีความเป็นไปได้ที่จะใช้เอนไซม์นี้สังเคราะห์สารโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับ เนื่องจากในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ๆ จะผลักดันให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในทางย้อนกลับในทางตรงกันข้ามกับการทำงานของเอนไซม์ตามปกติได้ และถ้ามีการเพิ่มอุณหภูมิของปฏิกิริยาจะยิ่งช่วยให้ปฏิกิริยาย้อนกลับเกิดขึ้นได้ดีขึ้นด้วย และผลการทดลองแสดงให้เห็นชัดเจนว่าปฏิกิริยาสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์จริง โดยพบว่าในความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ๆ หรือสภาวะที่มีน้ำอยู่น้อยจะช่วยให้เอนไซม์สามารถคงความสามารถในการทำงานอยู่ได้เป็นเวลานาน สภาวะที่เหมาะสมมากที่สุดสำหรับการนำเอนไซม์ β-glucosidase /β- fucosidase มาใช้ในการทำปฏิกิริยาย้อนกลับ คือ ที่ความเข้มข้นของสับสเตรท 50 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคส ที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 60 ^{o}ซ จากการตรวจสอบผลผลิตของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง h.p.l.c พบว่าจะเริ่มพบ peak ของสารจำพวกไดแซคคาไรด์หลังจากบ่มปฏิกิริยาไว้เป็นเวลา 2 วัน และเห็นได้ชัดขึ้นในวันที่ 4 เมื่อทิ้งเวลานานขึ้นจะมีโอลิโกแซคคาไรด์ถูกสร้างขึ้นได้มากขึ้น และจะเริ่มเกิดโอลิโกแซคคาไรด์สายยาวขึ้นเมื่อทิ้งไว้นานขึ้น ซึ่งถ้าใช้สภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสมนี้จะพบว่า โอลิโกแซคคาไรด์ที่สร้างขึ้น เมื่อตรวจสอบภายหลังบ่มปฏิกิริยาไว้เป็นเวลา 7 วัน จะมีสัดส่วนดังนี้คือ มี gentiobiose เกิดขึ้น 35 เปอร์เซนต์ มี sophorose และ laminaribiose เกิดขึ้น 11 เปอร์เซนต์ และไม่มี cellobiose เกิดขึ้นเลย เมื่อทิ้งเวลาไว้นานขึ้นจะมี trisaccharide เกิดขึ้นบ้างเล็กน้อย ที่น่าสนใจคือเอนไซม์ชนิดนี้สามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาการสลายได้ทั้ง glucoside และ fucoside แต่จากความพยายามในการสังเคราะห์ fucoside เกิดขึ้นน้อยg,njvเทียบกับการสังเคราะห์ glucoside เมื่อตรวจสอบด้วย h.p.l.c ใช้ Aminex columm HPX- 87 C วัดปริมาณสารคาร์โบไฮเดรทด้วยเครื่องวัดดัชนีการหักเหของแสง ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าจะต้องมี กลูโคสอยู่ก่อนจึงจะเกิดการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์

ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ glucose และ fucose ผสมกันทำปฏิกิริยาย้อนกลับดังกล่าว พบว่ามีสารที่คาดว่าจะเป็น glucose-fucose ต่อกันเป็นไดแซคคาไรด์ปรากฏขึ้น สารดังกล่าวนี้ยังไม่เคยมีผู้รายงานมาก่อน และเป็นที่น่าสังเกตว่าสารที่สร้างขึ้นใหม่นี้มีกลิ่นหอมด้วยอย่างไรก็ตามการเตรียมสารดังกล่าวในปริมาณมาก เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างในรายละเอียดควรต้องศึกษาต่อไป

เนื่องจากการตรวจสอบเมล็ดพืชต่าง ๆ แล้วพบว่าเมล็ดปอแก้ว *Hibiscus sabdariffa* var altissima น่าจะเป็นแหล่งของเอนไซม์ β-galactosidase ที่ดีได้ เนื่องจากปอแก้วเป็นพืชไร่ที่ปลูกกันมากในประเทศไทยเมล็ดปอแก้วสามารถหาได้ง่ายในปริมาณมาก และมีปริมาณของเอนไซม์ β-galactosidase อยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูง จึงน่าสนใจที่จะศึกษารายละเอียดของเอนไซม์จากเมล็ดปอแก้ว โดยได้พยายามเตรียมเอนไซม์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์มากที่สุดเท่าที่จะสามารถทำได้ เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่พบในเมล็ดปอแก้วไม่สูงเท่าเมล็ดพะยูง จึงทำการศึกษาผลของการงอกของเมล็ดต่อปริมาณเอนไซม์ในเมล็ดเพื่อหาเวลาที่เอนไซม์มีการสร้างขึ้นสูงที่สุด เป็นการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ที่จะนำมาเตรียมให้บริสุทธิ์ต่อไป จากผลการศึกษาในเรื่องการงอกของเมล็ดนี้พบว่าเมล็ดปอแก้วมีอัตราการงอกของเมล็ดอยู่ในเกณฑ์ดี เมล็ดส่วนใหญ่ที่นำมาศึกษาจะงอกเป็นต้นได้ในเวลาไม่นานนัก และปริมาณเอนไซม์จะสูงที่สุดหลังจากแช่น้ำทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วัน พบว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ β-galactosidase ให้บริสุทธิ์ได้โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 868 เท่า และได้ yield 13% แสดงแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis วิธีการเตรียมเอนไซม์ β-galactosidase จากเมล็ดปอแก้วให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 35-75 เปอร์เซนต์ตามด้วย DEAE- cellulose column chromatography, Sephadex G-100, lactosyl-Sepharose chromatography และ DEAE-

cellulose chromatography ตามลำดับ เอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 เมื่อใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเมื่อหาโดยวิธี gel filtration แสดงว่าเอนไซม์ β-galactosidase จากเมล็ดปอแก้วนี้ไม่มีหน่วยย่อย แต่ผลการศึกษาโดยใช้ isoelectric focusing และ chromatofocusing แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้ประกอบด้วยหลาย isozymes

เมื่อศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ β-galactosidase จากเมล็ดปอแก้วพบว่าค่า K_m ต่อสับสเตรทสังเคราะห์คืออนุพันธ์พาราไนโตรฟีนอลกลูโคไซด์ มีค่าอยู่ในช่วงเดียวกับเอนไซม์จำพวกเดียวกันที่พบในพืชชนิดอื่น ขณะที่ Km ต่ออนุพันธ์ของออโธไนโตรฟีนอลกลูโคไซด์มีค่าสูงกว่าที่พบในพืชชนิดอื่น และ Km ต่อ β- lactose สูงกว่าที่พบในพืชอื่นหลายชนิด แต่กลับไปมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในเชื้อรา *Aspergillus niger* เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยสารประกอบของปรอท, D- galactonolactone และ D- galactal เสนอแนะว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์นี้คาดว่าจะมีกรดอะมิโนชนิด acidic amino acid อยู่

เมื่อศึกษาคุณสมบัติในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ของเอนไซม์ β-galactosidase จากเมล็ดปอแก้ว พบว่าสามารถใช้เอนไซม์นี้เร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้โดยการทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับคือ ใช้น้ำตาล galactose ความเข้มข้น 33% โดยน้ำหนัก ที่ pH 4.5 และอุณหภูมิ 60 $^{\circ}$ซ จะเกิดการสร้างไดแซคคาไรด์ขึ้น และเมื่อทิ้งไว้เป็นเวลานานขึ้น จะพบว่ามีไตรแซคคาไรด์เกิดขึ้นด้วย แต่ปริมาณของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณไม่ค่อยสูงนัก แม้ว่าจะได้พยายามปรับสภาวะของปฏิกิริยาให้เกิดโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น ผลการสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ก็ยังไม่อยู่ใน

ระดับที่น่าพอใจ จึงควรมีการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่าง ๆ การทำ enzyme immobilization และ การใช้ acceptor อื่นที่ไม่ใช้น้ำตาลกาแลคโตส

เมล็ดปอแก้วนอกจากจะมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ β-galactosidase สูงแล้วยังมีแอคติวิตี้ของเอนไซม์ α-mannosidase ค่อนข้างสูงอีกด้วย และในระหว่างการแยกเตรียมเอนไซม์ β-galactosidase ให้บริสุทธิ์พบว่าเมื่อใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose ในครั้งแรก จะสามารถแยกเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้ โดยเอนไซม์ β-galactosidase จะออกมาก่อนในขณะที่ α-mannosidase ยังคงติดอยู่ในคอลัมน์ และเมื่อนำส่วนที่มี α-mannosidase ไปแยกต่อสามารถทำให้บริสุทธิ์ขึ้นได้อีกโดยลดการเจือปนจากเอนไซม์ไกลโคซิเดสอื่นลงเหลือน้อยกว่า 2% เอนไซม์ α-mannosidase ที่เตรียมได้เมื่อนำไปตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยอาศัยปฏิกิริยาย้อนกลับพบว่า สามารถใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแมนโนไซด์ได้ค่อนข้างดีเมื่อเปรียบเทียบกับการสังเคราะห์โอลิโกแมนโนไซด์ด้วยเอนไซม์อื่นที่เคยมีรายงานไว้ จากการสร้างโดยปฏิกิริยาที่อาศัยเอนไซม์ α-mannosidase ของถั่วแจ๊ค ดังนั้นเมล็ดปอแก้ว นอกจากจะเป็นแหล่งของเอนไซม์ β-galactosidase แล้วยังสามารถใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ α-mannosidase ได้ด้วย

ถ่อน (*Albizzia procera* Benth) เป็นพืชยืนต้นพื้นเมืองอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่สามารถเป็นแหล่งที่ดีที่จะใช้แยกสกัดเอนไซม์ α-mannosidase จากการสำรวจเมล็ดถ่อนพบว่าจะมีเอนไซม์ α-mannosidase สูง ส่วนเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดอื่นมีแอคติวิตี้ค่อนข้างต่ำ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะแยกเตรียม α- mannosidase จากเมล็ดถ่อนให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ชนิดนี้ต่อไป จากผลการศึกษาการเตรียมเอนไซม์ α-mannosidase จากเมล็ดถ่อนให้บริสุทธิ์พบว่า สามารถเตรียมเอนไซม์ได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ปราศจากเอนไซม์ไกลโคซิ

เดสซนิดอื่น ๆ โดยใช้การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ตามด้วย DEAE-cellulose chromatography column, Sephadex G-150 column และ Phenyl-Sepharose column ตามลำดับปรากฏว่าได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 35 เท่าและมีเอนไซม์ไกลโคซิเดสอื่นเจือปนอยู่น้อยกว่า 1 เปอร์เซนต์ เอนไซม์ α- แมนโนซิเดสที่เตรียมได้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่าง ๆ ตลอดจนคุณสมบัติเรื่อง pH อุณหภูมิและผลของสารบางอย่างต่อเอนไซม์แอคติวิตี้ยังมีลักษณะ เช่นเดียวกับเอนไซม์จากถั่วแจ๊ค และเมื่อศึกษาการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จากเอนไซม์ดังกล่าวจะพบว่า รูปแบบของโอลิโกแมนโนไซด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมีลักษณะเหมือนกับรูปแบบของโอลิโกแมนโนไซด์ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ α- mannosidase จากถั่วแจ๊ค เอนไซม์ α-mannosidase จากเมล็ดถ่อนนี้จึงอาจเป็นแหล่งของเอนไซม์นี้ที่สามารถใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้อีกแหล่งหนึ่ง

เอนไซม์ α-mannosidase จากถั่วนางแดงสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้เช่นเดียวกันแต่ yield ที่ได้ค่อนข้างต่ำ และการเตรียมต้องใช้ขั้นตอนในการทำที่ค่อนข้างยุ่งยาก อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอนไซม์ที่เตรียมได้มาตรวจสอบพบว่าเอนไซม์ที่เตรียมได้มีเอนไซม์ไกลโคซิเดสซนิดอื่นปนอยู่บ้างเล็กน้อยคือน้อยกว่า 5% การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ α-mannosidase จากเมล็ดถั่วนางแดงพบว่ามีการสร้างแมนโนไบโอสขึ้นในลักษณะที่คล้ายคลึงกับโอลิโกแมนโนไซด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากปฏิกิริยาของถั่วแจ๊ค และเมล็ดอัลมอนด์ โดยจะสร้างขึ้นเป็น man (α1-2) man ได้เร็วกว่า man (α1-6) man ในช่วงแรกของปฏิกิริยา ถ้าทิ้งไว้นานขึ้นจนเข้าสู่สภาวะสมดุลย์จะพบว่ามีปริมาณ man (α1-6) man มากกว่า

ลินามาเรสจากมันสำปะหลังเป็นเอนไซม์ที่ย่อย cyanogenic glycoside ในมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถเตรียมให้บริสุทธิ์ได้โดยไม่ยากนัก วัตถุดิบที่อาจนำมาใช้เตรียมเอนไซม์ดังกล่าวหาได้ง่ายและราคาถูก แต่เมื่อตรวจสอบความสามารถในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ลินามาเรสนี้พบว่าสามารถสังเคราะห์ไดแซคคาไรด์ได้แต่มีปริมาณน้อยมาก คือเกิดการสร้างได้ประมาณ 2-5 % เท่านั้น ดังนั้นเอนไซม์ชนิดนี้จึงไม่มีประโยชน์สำหรับการนำมาเป็นแหล่งของเอนไซม์เพื่อการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

จากผลการวิจัยทั้งหมดนี้อาจสรุปได้ว่า

1. จากการสำรวจเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสในเมล็ดพืชที่พบในประเทศไทยพบว่ามีเมล็ดพืชหลายชนิดที่สามารถนำมาแยกสกัดและเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ได้โดยเมล็ดพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณเอนไซม์แตกต่างกันไป และในเมล็ดพืชต่างชนิดกันจะมีอัตราส่วนของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสที่แตกต่างกันด้วย

2. เมล็ดพืชชนิดเดียวกัน ต่างสายพันธุ์ (Strain) จะมีปริมาณเอนไซม์ต่างกัน ทั้งนี้ระยะเวลาในการเก็บเมล็ดและลักษณะการเก็บจะมีส่วนกำหนดปริมาณเอนไซม์

3. เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสที่พบในเมล็ดพืชเหล่านี้มีความแตกต่างจากเอนไซม์ไกลโคซิเดสอื่น ๆ ที่เคยมีผู้รายงานมาแล้ว ผลการศึกษาที่รายงานนี้เป็นงานวิจัยใหม่ยังไม่เคยมีผู้ใดศึกษามาก่อนทั้งสิ้น

4. เมื่อศึกษาถึงความสามารถของเอนไซม์ไกลโคซิเดสเหล่านี้ในการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับ (reverse reaction) พบว่าเอนไซม์ไกลโคซิเดสทุกตัวที่ศึกษาสามารถเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับและสังเคราะห์เป็นไดแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ได้

5. ได้แยกเอนไซม์บางตัวให้บริสุทธิ์ ได้แก่ β-glucosidase/ β-fucosidase จากเมล็ดพะยูง และ β-galactosidase จากปอแก้ว

6. คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์บริสุทธิ์จะช่วยในการทำนายการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์นั้น ๆ

7. pH ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาสลาย (hydrolytic reaction) จะเป็น pH ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาสังเคราะห์ด้วย (synthesis reaction)

8. เอนไซม์จะคงแอคติวิตี้อยู่ได้เป็นเวลานานถ้าอยู่ในสภาวะที่มีน้ำน้อย (low water activity) และมีความเข้มข้นของสับสเตรทที่สูง

9. ถ้าต้องการศึกษาความจำเพาะของพันธะของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ควรทำในช่วงแรกของปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยาของพันธะที่จำเพาะจะเข้าสู่สภาพสมดุลย์ได้เร็วกว่าพันธะอื่นทำให้ผลิตผลสุดท้ายที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

10. ความสามารถในการสังเคราะห์ของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์ โดยพบว่าถ้าใช้เอนไซม์ปริมาณน้อยในการสังเคราะห์ ผลิตผลที่ได้จะต่างจากเมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณสูง ๆ

11. ผลการวิจัยนี้แสดงความเป็นไปได้ของการสร้าง novel oligosaccharide โดยใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสจากเมล็ดพืชโดยทั่วไป

ดังนั้นผลการวิจัยนี้ทำให้ได้ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับปริมาณของเอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดสจากเมล็ดพืชในประเทศไทย และได้รับความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการเตรียมเอนไซม์บางชนิดให้บริสุทธิ์มากและบริสุทธิ์บางส่วน คุณสมบัติทางจลนศาสตร์ต่าง ๆ ที่สำคัญสำหรับเอนไซม์ที่เตรียมได้ พัฒนาการวิจัยทางด้านการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ปฏิกิริยาการย้อนกลับอย่างจริงจัง พัฒนาความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์ ซึ่งคาด

ว่าจะเป็นประโยชน์แก่นักวิจัยอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ ยังขาดรายละเอียดเกี่ยวกับโครงสร้างของผลิตผลของการสังเคราะห์ที่เกิดขึ้น ซึ่งจะต้องมีการทำการวิจัยต่อไปโดยอาศัยวิธีการทางเคมีเพื่อพิสูจน์โครงสร้างของผลิตผลต่าง ๆ ของปฏิกิริยาเช่น การใช้เทคนิคของ nuclear magnetic resonance (n.m.r) และ gas liguid chromatography ร่วมกับ mass spectrometry (g.c.-m.s) เมื่อได้โครงสร้างของผลิตผลต่าง ๆ แล้วจะต้องมีการทดสอบคุณสมบัติอื่น ๆ ของผลิตผลที่สร้างได้เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ต่อไปและจะต้องมีการตรวจสอบความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณการผลิตสารโอลิโกแซคคาไรด์ใหม่ที่น่าสนใจให้สูงขึ้น โดยอาศัยเทคนิคของ protein engineering หรือวิศวกรรมโปรตีน ซึ่งรวมถึงการพัฒนาสายพันธ์ของพืชต่าง ๆ ด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

References

1. Yuthavong, Y. and Gibbons, G.C. (1994) *Biotechnology for Development*, National Science and Technology Development Agency, Bangkok.
2. Kennedy, J.F., Cabalda, V.M. and White, C.A. (1988) *Trends Biotechnol.* **6**, 184-189.
3. Welply, J.K. (1989) *Trends Biotechnol.* **7**, 5-10.
4. Rademacher, T.W., Parekh, R.B. and Dwek, R.A. (1988) *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 785-838.
5. McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C. and Albersheim, P. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 625-663.
6. Bundle, D.R. (1994) *Carbohydrates in Europe* **11**, 22-30.
7. Akiyama, H., Endo, T., Nakashita, R., Murata, K., Yonemoto, Y. and Okayama, K. (1992) *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 355-356.
8. Elbein, A.D. (1991) *Trends Biotechnol.* **9**, 346-352.
9. Paulsen, H. (1984) *Chem. Soc. Rev.* **13**, 15-45.
10. Schmidt, R.R. (1986) *Angew. Chem.* **98**, 213-236.
11 Nilsson, K.G.I. (1988) *Trends Biotechnol.* **6**, 256-264.
12. Bucke, C. and Rastall, R.A. (1990) *Chemistry in Britain*, pp 675-677.
13. Ichikawa, Y., Look, G. and Wong, C.H. (1992) *Analyt. Biochem.* **202**, 215-235.
14. Rabate, M. J. (1935) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 1715-1729.
15. Bourquelot, E. and Bridel, M. J. (1912) *J. Pharm. Chim. (Paris)* **7**, 569-573.
16. Paulsen, H. and Dessen, U. (1988) *Carbohyd. Res.* **175**, 283-293.
17. Rastall, R.A., Rees, N.H., Wait, R., Adlard, M.W. and Bucke, C. (1992) *Enz. Microb. Technol.* **14**, 53-57.
18. Johansson, E., Hedbys, L. and Larsson, P.-O. (1986) *Biotech. Letts.* **6**, 421-424.
19. Johansson, E., Hedbys, L., Mosbach, K., Larsson, P.-O., Gunnarson, A. and Svensson, S. (1989) *Enz. Microb. Technol.* **11**, 347-351.
20. Rastall, R.A., Pickett, S.F., Adlard, M.W. and Bucke, C. (1992) *Biotech. Letts.* **14**, 373-378.

21. Rastall, R.A., Adlard, M.W. and Bucke, C. (1991) *Biotech. Letts.* **13**, 501-504.

22. Ajisaka, K., Nishida, H. and Fujimoto, H. (1987) *Biotech. Letts.* **9**, 387-392.

23. Shinoyama, H., Kamiyama, Y. and Tsunio, Y. (1988) *Agric. Biol. Chem.* *52*, 2197-2202.

24. Montreuil, J., Bouquelet, S., Debray, H., Fournet, B., Spik, G., and Strecker, G. (1986) *in* Glycoproteins (Chaplin, M.F. and Kennedy, F., eds.) pp. 143-204, IRL Press, Oxford.

25. Esen, A. (1993) In *β-Glucosidases: biochemistry and molecular biology*, Esen, A., ed., pp. 1-14, American Chemical Society, Washington D.C.

26. Fan, T.W.-M. and Conn, E.E. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* **243**, 361-373.

27. Itoh-Nashida, T., Hiraiwa, M. and Uda, Y. (1987) *Phaseolus lunatus. J. Biochem (Tokyo)* **101**, 847-854.

28. Eksittikul, T. and Chulavatnatol, (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **266**, 263-269.

29. Pocsi, I., Kiss, L., Hughes, M.A. and Nanasi, P. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 496-506.

30. Ferreira, C. and Terra, W.R. (1983) *Biochem. J.* **213**, 43-51.

31. Sano, K., Amemura, A. and Harada, T. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* **377**, 410-420.

32. Podstolski, A. and Lewak, S. (1970) *Phytochem.* **9**, 289-296.

33. Kuroki, G.W. and Poulton, J.E. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 433-439.

34. Kuroki, G.W. and Poulton, J.E. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* **255**, 19-26.

35. Durham, P.L. and Poulton, J.E. (1989) *Plant Physiol.* **90**, 48.

36. Conn, E.E.. (1993) In *β-Glucosidases: biochemistry and molecular biology*, Esen, A., ed., pp. 15-26, American Chemical Society, Washington D.C.

37. Melgar, M.J., Cabezas, J.A. and Calvo, P. (1985) *Comp. Biochem. Physiol.* **80 B**, 149-156.

38. Giordani, R. and Noat, G. (1988) *Europ. J. Biochem.* **175**, 619-625.

39. Schep, G.P., Shepherd, M.G. and Sullivan, P.A. (1984) *Biochem. J.* **223**, 707-714.

40. Laemmli, U. (1970) *Nature* **227**, 680-685.

41. Cameo, M.S. and Blaquier, J.A. (1976) *J. Endocrinol.* **69**, 47-55.

42. Sermsuvityawong, K., Svasti, M.R.J., Sawangareetrakul, P., Kisamanonta, P. and Chulavatnatol, M. (1995) *J. Sci. Soc. Thailand.* **21**, 283-292.

43 Braun, H., Legler, G., Deshusses, J. and Semenza, G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 135-140.

44. Herrchen, M. and Legler, G. (1984) *Eur. J. Biochem.*, **138**, 527-531.

45. White, W.J., Jr., Schray, K.J., Legler, G. and Alhadeff, J.A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **873**, 198-203.

46. Dinur, T., Osiecki, K. M., Legler, G., Gatt, S. , Desnick, R.J. and Grabowski, G. A. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1660-1664.

47. Clarke, A.J., Bray, M.R. and Strating, H. (1993) In *β-Glucosidases: biochemistry and molecular biology* (Esen, A., ed.) pp. 27-41, American Chemical Society, Washington D.C.

48. Yeoh, H.-H. and Wee, Y.-C. (1994) *Phytochemistry* **35**, 1391-1393.

49. Yeoh, H.-H. (1989) *Phytochemistry* **28**, 721-724.

50. Keresztessy, Z., Kiss, L. and Hughes, M.A. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 142-152.

51. Swaminathan, N., Matta, L., Donoso, L.A. and Bahl. O.P. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1775-1779.

52. Yoshida, T., Inoue, T., and Ichisama, E. (1993) *Biochem. J.* **290**, 349-354.

53. Ajisaka, K., Matsuo, I., Isomura, M., Fujimoto, H., Shirakabe, M. and Okawa, M. (1995) *Carbohyd. Res.* **270**, 123-130.

54. Schneikert, J. and Herscovics, A. (1994) *Glycobiology* **4**, 445-450.

55. Li, Y.T. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 5474-5480.

56. Wallenfels, K. and Malhotra, O.P.(1961) In *Adv. Carbohydr. Chem.* (Wolform, M.L. and Tipson, R.S. eds.), vol 16, Academic Press, New York, pp. 239-298.

57. Steers, E., Jr. and Cuatrecasas, P. (1974) *Methods Enzymol.*. **34**, 350-358.

58. Dey, P.M. (1984) *Adv. Enzymol.* **56**, 141-249.

59. Wallenfels, K. and Weil, R. (1972) In *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), 3rd ed., Academic Press, New York, pp. 617-663

60. Neufeld, E.F. (1991) *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 257-280.

61. Bhalla, P.L. and Dalling, M.J. (1984) *Plant. Physiol.* **76**, 92-95.

62. Edwards, M., Bowman, Y.J.L., Dea, I.C.M. and Reid, J.S.G. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 4333-4337.

63. Pressey R. (1983) *Plant Physiol.* **71**, 132-135.

64. Sekimata, M., Ogura, K., Tsumuraya, Y., Hashimoto, Y. and Yamamoto, S. (1989) *Plant Physiol.* **90**, 567-574.

65. Li, S.C., Mazotta, M.Y., Chien, S.F. and Li, Y.T. (1975) *J. Biol. Chem.* **250**, 6788-6791.

66. Kundu, R.K., Kundu, P.D. and Banerjee, A.C. (1990) *Phytochem.* **29**, 2079-2082.

67. Biswas, T.K. (1987) *Phytochem.* **26**, 359-364.

68. Simos, G., Giannakouros, T. and Georgatsos, J.G. (1989) *Phytochem.* **28**, 2587-2592.

69. Widmer, F. and Leuba, J.L. (1979) *Europ. J. Biochem.* **100**, 559-567.

70. Franzl, S., Ackerman, I. and Nahrtedt, A. (1989) *Experientia* **45**, 712-719.

71. Fomunyam, R.T., Adegbola, A.A. and Ole, O.L. (1984) *Can. J. Microbiol.* **30**, 1530-1531.

72. Okafor, N. and Ejiofor, M.A.N. (1985) *J. Sci. Food. Agric.* **36**, 669-678.

73. Padmaja, G. and Balagopal, C. (1985) *Can. J. Microbiol.* **31**, 663-669.

74. Ikediobi, C.O., Ogundu, E.C. and Vkoha, A.I. (1985) *Process Biochem.* **22**, 99-102.

75. Ikediobi, C.O. and Onyike, E. (1982) *Process Biochem.* **17**, 2-5.

76. Cooke, R.D., Blake, G.G. and Battershill, J.M. (1978) *Phytochem.* **17**, 381-383.

77. Hughes, M.A., Brown, K., Pancoro, A., Murray, B.S., Oxtoby, E., Hughes, J. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **295**, 273-279.

78. Hedbys, L., Larsson, P.-O., Mosbach, K. and Svensson, S. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 8-15.

79. Larsson, P.-O., Hedbys, L., Svensson, S. and Mosbach, K. (1987) *Methods Enzymol.* **136**, 230-233.

80. Zilliken, F., Smith, P.N. and Rose, C.S. (1955) *J. Biol. Chem.* **217**, 79-82.

81. Nilsson, K.G.I. (1987) *Carbohyd. Res.* **167**, 95-103.

ผลงานที่ตีพิมพ์จากโครงการวิจัย

1. Surarit, R., Svasti, M.R. J., Srisomsap, C., Suginta, W., Khunyoshyeng, S., Nilwarangkoon, S., Harnsakul, P. and Benjavongkulchai, E. (1995) Possible Use of Glycosidase Enzymes from Thai Plant Seeds for Oligosaccharide Synthesis. *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. *et al.*, eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok., pp. 251-255.

2. Suginta, W., and Svasti, J. (1995) β-Galactosidase from Thai Jute: purification and characterization. In *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. *et al.*, eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, pp. 256-260..

3. Khunyoshyeng, S., Srisomsap, C., Champattana-chai, V., Boonpuan, K., Sawangareetrakul, P., Surarit, R. and Svasti, M.R.J. (1995) Purification and Properties of β-D-Glucosidase / β-D-Fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. In *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. *et al.*, eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, pp. 246-250.

4. Srisomsap, C., Khunyosheyeng, S., Surarit, R. and Svasti, M.R.J. (1995) Studies of Oligosaccharide Synthesis by Enzymes from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. In *Biopolymers and Bioproducts: structure, function and applications* (Svasti, J. *et al.*, eds.), Samakkhisan Public Co. Ltd., Bangkok, 241-245.

5. Svasti, J., Srisomsap, C., Surarit, R., Benjavongkulchai, E., Suginta, W., Khunyoshyeng, S., Champattanachai, V., Nilwarangkoon, S. and Rungvirayudx, S. (1995) Potential Applications of Plant Glycohydrolases for Oligosaccharide Synthesis. In *Protein Structure-Function Relationship* (Zaidi, Z.H. and Smith, D.L., eds.), Plenum Press, pp. 249-257.

6. Srisomsap, C., Khunyoshyeng, S., Boonpuan, K., Sawangareetrakul, P., Surarit, R. and Svasti, J. (1995) Hydrolytic and Synthetic Activity of β-Fucosidase / β-Glucosidase from Thai Rosewood Seeds. *Proceedings, 4th International Symposium on Protein Structure Function Relationship*, Karachi, Pakistan, 20-25 January, 1995, In Press.

7. Suginta W. and Svasti, M.R.J. (1995) Purification and Properties of β-Galactosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. *altissima*. *J. Sci. Soc. Thailand.* **21**, 183-186.

8. Sermsuvityawong, K., Svasti, M.R.J., Sawangareetrakul, P., Kisamanonta, P. and Chulavatnatol, M. (1995) Aggregation of Cassava Linamarase. *J. Sci. Soc. Thailand.* **21**, 283-292.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. Surarit, R., Svasti, M.R.J., Srisomsap, C., Suginta, W., Khunyoshyeng, S., Nilwarangkoon, S., Harnsakul, P., and Benjavongkulchai, E. (1995) Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. *J. Sci. Soc. Thailand.* **21**, 293-303.

10. Srisomsap, C., Svasti, M.R.J., Surarit, R. , Champattana-chai, V., Boonpuan, K., and Sawangareetrakul, P. (1996) Isolation and Characterization of β-D-Glucosidase/β-D-Fucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. *J. Biochem.* **119**, 585-590.

11. Svasti, M.R. J., Srisomsap, C., Surarit, R., Champattanachai, V., Boonpuan, K., Sawangareetrakul, P., Subhasitanont, P. and Chokchaichamnankit, D. (1996) Purification and Properties of Thai Rosewood β-Glucosidase/ β-Fucosidase. In *Proceedings, International Conference on Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development.* In Press.

12. Wongwithoonyaporn, P., Perry, D., Surarit, R., Bucke, C. and Svasti, M.R. J. (1996) Oligosaccharide Synthesis by α-D-Mannosidases from Thai Beans. In *Proceedings, International Conference on Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development.* In Press.