การโคลนและการศึกษาลักษณะเฉพาะของยีนแอมิโลมอลเทส ที่แยกดีเอ็นเอโดยตรงจากดิน

Cloning and Characterization of Amylomaltase Gene Isolated Directly from Soil DNA

คมกริช สวัสดี

หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ประกานต์ ฤดีกุลธำรง

ภาควิชาชีวเคมี วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า ถ.ราชวิถี แขวงราชเทวี เขตพญาไท กรุงเทพฯ 10400

จารุณี ควรพิบูลย์*

สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก สาขาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Komkrich Sawasdee

Biochemistry and Molecular Biology Program, Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Prakarn Rudeekulthamrong

Department of Biochemistry, Phramongkutklao College of Medicine, Phramongkutklao Hospital, Ratchawithi Road, Phayathai, Bangkok 10400

Jarunee Kaulpiboon*

Department of Preclinical Science (Biochemistry), Faculty of Medicine, Thammasat University, Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดแยกยีนแอมิโลมอลเทสโดยตรงจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ปนอยู่ในดิน โดยปราศจากการเลี้ยงเซลล์ สำหรับคู่ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์เพื่อคัดแยกและเพิ่มจำนวนยีนแอมิโล

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** jkaulpiboon@yahoo.com

มอลเทสได้ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิลิกของยีนแอมิโลมอลเทสในกลุ่มแบคทีเรียทนร้อน หลังจากเพิ่มจำนวนยีนแอมิโลมอลเทสแล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1.5 กิโลเบส เชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะชนิด pGEM®-T easy และเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยสายพันธุ์ *Escherichia coli* DH5α เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอ ผลการทดลองพบว่า open reading frame ของยีนแอมิโลมอลเทสมีขนาดเท่ากับ 1,503 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 500 ตัว โดยลำดับของกรดอะมิโนที่ได้นี้มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus thermophillus* ATCC 33923 ร้อยละ 99 จาก *Thermus aquaticus* ร้อยละ 86 และจาก *Thermus scotoductus* ร้อยละ 81 ตามลำดับ และเพื่อเพิ่มการแสดงออกของเอนไซม์แอมิโลมอลเทส จึงนำยีนแอมิโลมอลเทสในดีเอ็นเอพาหะชนิด pGEM®-T easy โคลนเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยสายพันธุ์ *Escherichia coli* BL21 (DE3) โดยใช้ pET-17b เป็นดีเอ็นเอพาหะ โดยการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสจากเซลล์ให้อาศัยสายพันธุ์ *E. coli* BL21 (DE3) มีค่าสูงสุดเมื่อเหนี่ยวนำการเลี้ยงเซลล์ด้วย 0.5 มิลลิโมลาร์ IPTG นาน 6 ชั่วโมง เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสชนิดหยาบ พบว่าค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 70°ซ และเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ขนาดตั้งแต่ CD23 ขึ้นไป โดยผลิต CD28 ในปริมาณสูงสุด

คำสำคัญ : ยีนแอมิโลมอลเทส, การคัดเลือกดีเอ็นเอ, การโคลนดีเอ็นเอ, ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่, ทรานสไกลโคซิลเลชัน

Abstract

The purpose of this study was to isolate amylomaltase gene directly from bacterial DNA present in the soil without prior culturing. The PCR degenerate primers were designed from N-and C-terminus conserved regions of thermophilic amylomaltase genes and used to amplify full-length amylomaltase gene. After PCR amplification, the 1.5 kb PCR product was observed. This PCR product was ligated with pGEM®-T easy vector and transformed into *Escherichia coli* DH5α for sequencing. The open reading frame of amylomaltase gene was 1,503 bp encoding an amylomaltase of 500 amino acid residues. The amino acid sequence showed 99% silmilarity with *Thermus thermophillus* ATCC 33923 amylomaltase gene, 86% similarity with *Thermus aquaticus* amylomaltase gene and 81% similarity with *Thermus scotoductus* amylomaltase gene, respectively. In order to overexpress the enzyme, the amylomaltase gene was cloned into *Escherichia coli* BL21 (DE3) using the pET-17b vector. The maximum activity was obtained when the cloned cell was cultured at 37°C for 6 h with 0.5 mM IPTG induction. When the biochemical characteristics of crude enzyme were investigated, they were found that the optimum pH and temperature were at pH 9.0 and 70°C, respectively. This enzyme could hydrolyze pea starch to yield the large-ring cyclodextrins with degrees of polymerization of 23 and higher. It is noted that CD28 was the product in the largest amount under all tested conditions.

Keywords: amylomaltase gene, DNA screening, DNA cloning, large-ring cyclodextrins (LR-CDs), transglycosylation

1. บทนำ

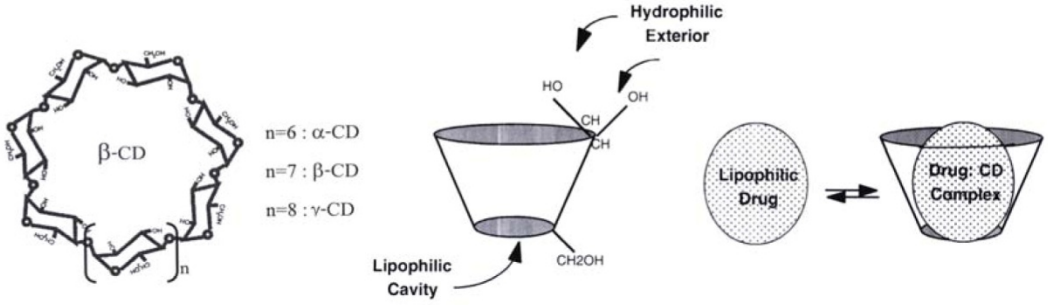
เอนไซม์แอมิโลมอลเทส (amylomaltase, AM; EC 2.4.1.25) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มแอลฟา-กลูคาโนทรานสเฟอเรส (α-glucanotransferase, α-GTase) เร่งปฏิกิริยาได้ 4 รูปแบบ [1] คือ รูปแบบที่ 1 เร่งปฏิกิริยา disproportionation โดยมีการโยกย้ายหมู่น้ำตาล D-glucan จากตัวให้ไปยังตัวรับดังสมการ $(\alpha\text{-1,4-glucan})_m + (\alpha\text{-1,4-glucan})_n \leftrightarrow (\alpha\text{-1,4-glucan})_{m-x} + (\alpha\text{-1,4-glucan})_{n+x}$

รูปแบบที่ 2 เอนไซม์แอมิโลมอลเทสสามารถเร่งปฏิกิริยา cyclization เพื่อโยกย้ายหมู่น้ำตาล D-glucan ภายในโมเลกุล α-1,4-glucan เดียวกันได้ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ (large-ring cyclodextrin, LR-CD) หรือเรียกอีกชื่อว่าไซโคลแอมิโลส (cyclic α-1,4-glucan; cycloamylose, CA) ปฏิกิริยา cyclization เกิดได้ดังสมการ $(\alpha\text{-1,4-glucan})_n \leftrightarrow \text{cyclic } (\alpha\text{-1,4-glucan})_x + (\alpha\text{-1,4-glucan})_{n-x}$

รูปแบบที่ 3 เอนไซม์แอมิโลมอลเทสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยา cyclization ได้ โดยเรียกปฏิกิริยาผันกลับนี้ว่าปฏิกิริยา coupling โดยปฏิกิริยา coupling นี้สามารถเปลี่ยนไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ให้เป็นออลิโกแซ็กคาร์ไรด์สายตรง แต่ปฏิกิริยา coupling ของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจะเกิดขึ้นในระดับที่ต่ำมาก เช่นเดียวกับปฏิกิริยารูปแบบที่ 4 คือ ปฏิกิริยา hydrolysis ซึ่งเร่งการสลายพันธะ α-1,4-glucan ของสับสเตรทด้วยน้ำ เอนไซม์แอมิโลมอลเทสมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase; EC 2.4.1.19) ในเชิงการเร่งปฏิกิริยาทั้ง 4 รูปแบบ คือ ปฏิกิริยา cyclization, disproportionation, coupling และ hydrolysis ได้เหมือนกัน แต่จุดแตกต่างเฉพาะอยู่ที่เอนไซม์แอมิโลมอสเทสเด่นในการเร่งปฏิกิริยา cyclization และ disproportionation ในขณะที่เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจะเร่งปฏิกิริยาทั้ง 4 ปฏิกิริยา ได้ดีพอๆ กัน และปัจจุบันเอนไซม์แอมิโลมอสเทสได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากเอนไซม์นี้สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ขนาด (degree of polymerization, DP) ตั้งแต่ 16 ขึ้นไป [2] ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสที่ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงเล็กขนาด (DP) 6-8 เท่านั้น

การที่ไซโคลเดกซ์ทรินทั้งชนิดวงใหญ่และวงเล็กได้รับความสนใจมากในระดับอุตสาหกรรม เนื่องมาจากโครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินเป็นกลุ่มของโฮโมโลกัสออลิโกแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยกลูโคสต่อกันเป็นวงแหวนปิดด้วยพันธะ α-1,4 ไกลโคซิดิก (รูปที่ 1) [3] ไซโคลเดกซ์ทรินที่แยกได้ในธรรมชาติมีหลายชนิดทั้งชนิดวงใหญ่และวงเล็ก ชนิดวงเล็กที่เป็นที่รู้จักดี คือ α-CD, β-CD และ γ-CD ซึ่งมีกลูโคสจำนวน 6, 7 และ 8 หน่วย ตามลำดับ จากการที่กลูโคสต่อกันเป็นวงแหวนนี้ทำให้เกิดโพรงตรงกลาง ภายในโพรงมีสมบัติเป็น hydrophobic ส่วนบริเวณผิวนอกมีสมบัติเป็น hydrophilic ส่งผลให้สารไซโคลเดกซ์ทรินสามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ที่มีโพลาริตี้และขนาดพอเหมาะต่อโพรงกลางโมเลกุล จะทำปฏิกิริยากับไซ

โคลเดกซ์ทรินเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ยังผลให้สมบัติทางเคมีหรือทางกายภาพของสารนั้นเปลี่ยนไป จึงมีผู้นำไซโคลเดกซ์ทรินมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ หลายประเภท เช่น ในอุตสาหกรรมยา ใช้ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นสารเพิ่มความเสถียร เพิ่มการละลาย และลดการระเหยของยา [4-6] โดยเฉพาะยาในกลุ่มสเตียรอยด์ นอกจากนี้แล้วไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ยังสามารถใช้เป็น artificial chaperone เพื่อปรับปรุงโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนในการม้วนพับ [7] ในทางการแพทย์มีการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ในการตรึงสารต่างๆ (immobilization) เพื่อทำชุด kit ทางการค้า จากประโยชน์ต่างๆ เหล่านี้ส่งผลให้ความต้องการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในอุตสาหกรรมเพิ่มสูงขึ้น นักวิจัยหลายกลุ่มสนใจในกระบวนการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน โดยมุ่งเน้นที่กระบวนการผลิตและปรับปรุงคุณภาพของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินเป็นสำคัญ โดยเฉพาะเอนไซม์แอมิโลมอสเทสที่ทำหน้าที่ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ซึ่งยังไม่มีขายทางการค้า ในขณะที่ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงเล็กและอนุพันธ์ได้มีการจำหน่ายทางการค้าแล้วในราคาที่ค่อนข้างสูง



รูปที่ 1 โครงสร้างของไซโคลเดกซ์ทรินและการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไซโคลเดกซ์ทรินและยา [3]

สำหรับเอนไซม์แอมิโลมอสเทสที่ใช้ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินนั้น มีการพบครั้งแรกใน *Escherichia coli* เป็น maltose-inducible enzyme มีบทบาทสำคัญในเมแทบอลิสมของน้ำตาลมอลโทส [8] ต่อจากนั้นได้มีการศึกษาเอนไซม์แอมิโลมอลเทสเพิ่มใน *Streptococcus pneumoniae* [9], *E. coli* [10], *Clostridium butyricum* NCIMB 7423 [11], hyper-thermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* [12], *Thermus aquaticus* ATCC 33923 [13], *Aquifex aeolicus* [2] และ *Pyrobaculum aerophilum* IM2 [14] อย่างไรก็ตามจากแหล่งผลิตของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสทั้งหมดมีเพียงเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus aquaticus* ATCC 33923 และ *Aquifex aeolicus* เท่านั้น ที่มีการพิสูจน์ยืนยันความสามารถในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ได้ ในพืชเอนไซม์แอมิโลมอลเทสมีชื่อเรียกเฉพาะว่า dispro-portionating enzyme หรือ D-enzyme พบครั้งแรกในหัวมันฝรั่ง [15] ต่อมาได้มีการพบในใบผักโขม [16] และใบอะราบิดอบซิส (*arabidopsis*) [17] เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิสมของแป้งในพืช

สำหรับงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมุ่งเน้นในการใช้เทคนิค genetic-based screening เพื่อค้นหาและสกัดแยกดีเอ็นเอของยีนแอมิโลมอลเทสจากเชื้อแบคทีเรียในดินโดยตรง โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเลี้ยงเชื้อ

(culturing process) ตามรูปแบบเดิมๆ ที่ใช้กันในอดีต ยีนของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสตัวใหม่ที่ได้จากเทคนิค genetic-based screening นี้ จะนำไปตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ก่อนที่จะทำการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยการโคลนยีนเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) โดยใช้ดีเอ็นเอพาหะชนิด pET-17b และนอกจากนี้ ยังมีการศึกษาลักษณะสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา cyclization ของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแป้งเป็นผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

2.1.1 นำตัวอย่างดินที่เก็บได้มาบ่มกับสับสเตรทแป้งที่อุณหภูมิ 70, 50, 40 และ 45°ซ (ขึ้นกับอุณหภูมิของแหล่งตัวอย่างดิน) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงชั่งตัวอย่างดิน 5 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์เพื่อสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ โดยกระจายตัวอย่างดินใน SET บัฟเฟอร์ และสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดินโดยตรงด้วยชุดสกัด DNA Isolation Kit (ISOIL Kit, Japan)

2.1.2 เซลล์ให้อาศัย (host strains) และพลาสมิด (plasmids)

ในการทดลองนี้ใช้ *Escherichia coli* DH5α เป็นเซลล์ให้อาศัยสำหรับการโคลนยีนเพื่อหาลำดับเบส ส่วน *Escherichia coli* BL21(DE3) ใช้สำหรับการโคลนยีนเพื่อการแสดงออกของเอนไซม์แอมิโลมอลเทส รีคอมบิแนนท์เซลล์ที่ได้จากการโคลนจะนำไปเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Luria-Bertani (อาหารเหลว LB, pH 7.2 ประกอบด้วย tryptone 1 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์, NaCl 1 เปอร์เซ็นต์ และ ampicillin 50-100 ไมโครกรัม/มล.) ที่ 37°ซ สำหรับพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ pGEM®-T easy (Promega, USA) ใช้ในการโคลนยีนเพื่อหาลำดับเบส ส่วนพลาสมิด pET-17b ใช้สำหรับเพิ่มการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทส

2.1.3 ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความสมบรูณ์ของดีเอ็นเอและพลาสมิดที่สกัดได้บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

2.2 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับคัดเลือกยีนแอมิโลมอลเทสจากตัวอย่างดิน

นำข้อมูลลำดับเบสที่ปลายด้านอะมิโนและด้านคาร์บอกซิลิกของยีนแอมิโลมอลเทสจาก GenBank มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo 4 โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบแบ่งเป็นไพรเมอร์สำหรับค้นหายีนของแบคทีเรียในกลุ่มเทอร์โมฟายด์ (thermophilic bacterial group) ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ AMY-F: 5′-ATG GAG CTT CCB CGC GCT TWY GGT CTG C-3′ และ AMY-R: 5′-YTA VAS CCK KYC CGT GGC CTC SGC C-3′ โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 1.5 กิโลเบส ส่วนคู่ไพรเมอร์สำหรับค้นหายีนของแบคทีเรียในกลุ่มมีโซฟายด์ (mesophilic bacterial group) ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ EF-1: 5′-TGC CGC GCW GGC GGC GGG-3′ และ EF-2: 5′-TTY ACI YYI TCA TCG GCR AAC AT-3′ โดยขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดหวังมีขนาดประมาณ 2.0 กิโลเบส

2.3 การเพิ่มจำนวนยีนแอมิโลมอลเทสโดยวิธีพีซีอาร์

ใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีนแอมิโลมอลเทสด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์ *Taq*

polymerase และคู่ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบไว้จากข้อ 2.2 ทำพีซีอาร์ที่สภาวะต่างๆ จากนั้นจึงตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เกิดขึ้นบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการจะนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากอะกาโรสเจลเพื่อโคลนเข้า pGEM®-T easy โดยใช้เซลล์ให้อาศัยชนิด *Escherichia coli* DH5α เลือกเฉพาะโคลนที่มียีนแอมิโลมอลเทสมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ pET-17b เพื่อการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทส

2.4 การเตรียมดีเอ็นเอพาหะชนิด pET-17b และชิ้นพีซีอาร์จำเพาะสำหรับการโคลนยีนเพื่อการแสดงออกของเอนไซม์

สกัดดีเอ็นเอพาหะชนิด pET-17b ตามวิธีของ Maniatis และคณะ [18] และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Eco*RI จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดของ pGEM®-T easy ที่ประกอบด้วยยีนแอมิโลมอลเทสมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำพีซีอาร์อีกครั้งด้วยคู่ไพร์เมอร์ชุดใหม่ที่ทำการต่อ linker ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Eco*RI ไว้ตามตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้ ดังนี้ ไพรเมอร์ AMYp13-forward: 5′-GGG AAT TCC ATA TGG AGC TTC CCC GCG CTT TCG G-3′ และไพรเมอร์ AMYp13-Reverse: 5′-CCG GAA TTC CTA GAG CCG TTC CGT GGC CTC GGC C-3′ ภายหลังจากการทำพีซีอาร์เสร็จ ให้ตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1.5 กิโลเบส ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกับที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอพาหะ pET-17b และใช้เป็น inserted amylomaltase gene สำหรับเตรียมเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pET-17b

2.5 การโคลนยีนแอมิโลมอลเทสเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21 (DE3)

นำชิ้นยีนแอมิโลมอลเทสที่ได้จากการทำพีซีอาร์ข้อ 2.4 มาเชื่อมเข้ากับดีเอ็นเอพาหะชนิด pET-17b ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase ต่อจากนั้นจึงเคลื่อนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21(DE3) โดยวิธี heat shock และเลี้ยงรีคอมบิแนนท์เซลล์ *E. coli* BL21(DE3) ในอาหารเหลว LB ที่ประกอบด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมง เพื่อให้รีคอมบิแนนท์เซลล์มีความแข็งแรงก่อนนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ประมาณ 24 ชั่วโมง เลือกเซลล์ที่โคลนได้จำนวน 24 โคโลนีมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB เพื่อสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Miniprep [19] และตรวจสอบขนาดของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่สกัดได้โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและวิเคราะห์ผลบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสและการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน

นำโคลนที่มีดีเอ็นเอลูกผสมซึ่งผ่านขั้นตอนการคัดเลือกจากข้อ 2.5 มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ซึ่งประกอบด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.4-0.5 ให้เติม IPTG ความเข้มข้น 0.3, 0.5, 0.7 หรือ 0.9 มิลลิโมลาร์ ลงไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปที่ระยะเวลาต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน โดยโคลนที่มีการแสดงออกของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสสูงที่สุดจะนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับเบส และใช้สำหรับเตรียมเอนไซม์แอมิโลมอลเทสชนิดหยาบ (crude amylomaltase)

2.7 การวัดแอคติวิตี disproportionation ของเอนไซม์แอมิโลมอลเทส ดัดแปลงจากวิธีของ Park และคณะ [20]

เติมสารละลายเอนไซม์ในปริมาณที่เหมาะสมลงในสารละลายแป้ง (soluble starch) 0.05 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และน้ำตาลมอลโทส 0.05 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ผสมให้เข้ากัน โดยปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยาเป็น 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 70°ซ เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการต้มในน้ำเดือด 10 นาที แบ่งสารละลายที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร เติมสารละลายไอโอดีน 1 มิลลิลิตร (0.02% (w/v) I_2 ใน 0.2% (w/v) KI) ปริมาตรสุดท้ายที่ได้เป็น 1.1 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยหลอดควบคุมจะใส่น้ำแทนเอนไซม์

กำหนดให้ 1 หน่วย เอนไซม์ คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ความเข้มของสีน้ำเงินของสารประกอบแป้ง-ไอโอดีนลดลง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

2.8 การวัดปริมาณโปรตีน

นำสารละลายโปรตีนตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสำหรับหาความเข้มข้นของโปรตีน (protein assay reagent) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ภายในเวลา 15-30 นาที ภายหลังจากการเติมสารละลาย protein assay reagent ซึ่งค่าที่ได้จะนำมาเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford [21,22] โดยใช้ BSA (1 มก./มล.) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.9 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่

นำเอนไซม์ชนิดหยาบที่ผลิตได้มาศึกษาหา ค่าพีเอช ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา และค่าความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งค้นหาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ โดยศึกษาตัวแปรต่างๆ ที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ ได้แก่ ชนิดของแป้งที่ใช้เป็นสับสเตรท ความเข้มข้นของสับสเตรท ความเข้มข้นของเอนไซม์ ค่าอุณภูมิ ค่าพีเอช และระยะเวลาในการทำงานของเอนไซม์ โดยผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ จะวิเคราะห์ชนิดและขนาดด้วยเครื่อง HPAEC-PAD

3. ผลการศึกษา

3.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่เก็บได้จากบริเวณแหล่งดินที่อุดมสมบรูณ์ จำนวน 4 แหล่งหลักๆ ตามตารางที่ 1 ได้นำมาบ่มกับสับสเตรทแป้งมันฝรั่ง (potato starch) ที่อุณหภูมิ 70, 50, 40 และ 45°ซ สำหรับตัวอย่างดินในกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ต่อจากนั้นจึงชั่งดิน 5 กรัม ใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ เพื่อสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้บนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส พบแถบดีเอ็นเอขนาด 23 กิโลเบส และการคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.2-2.4 และค่าเฉลี่ยของปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างดิน 5 กรัม มี

ความเข้มข้นดีเอ็นเอประมาณ 70-600 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดินแต่ละแหล่ง

3.2 การเพิ่มจำนวนยีนแอมิโลมอลเทสโดยวิธีพีซีอาร์

ผลการทดลองใช้คู่ไพรเมอร์ EF-1 และ EF-2 เพื่อเพิ่มจำนวนยีนแอมิโลมอลเทสกลุ่มแบคทีเรียมีโซฟิลิก และคู่ไพรเมอร์ AMY-F และ AMY-R เพื่อเพิ่มจำนวนยีนแอมิโลมอลเทสกลุ่มแบคทีเรียเทอร์โมฟิลิก ด้วยวิธีพีซีอาร์ภายใต้สภาวะดังนี้ 1 รอบ ของ Pre-denaturation ที่ 95°ซ นาน 5 นาที และ 25 รอบ ของ denaturation 95°ซ นาน 1 นาที annealing ที่ 55°ซ นาน 0.5 นาที extension ที่ 72°ซ นาน 2 นาที ตามด้วย 1 รอบ สุดท้ายของ final extension ที่ 72°ซ นาน 5 นาที หลังจากเพิ่มจำนวนยีนแล้ว นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบใน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟริซิส สำหรับคู่ไพรเมอร์ EF-1 และ EF-2 กับดีเอ็นเอแม่แบบจากดินทุกแหล่งไม่พบแถบดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ AMY-F และ AMY-R กับดีเอ็นเอแม่แบบ จากแหล่งดินที่บ่อน้ำพุร้อนบ้านหนองครก จ.เชียงใหม่ ให้แถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1.5 กิโลเบส จึงตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพื่อสกัดดีเอ็นเอขนาด 1.5 กิโลเบสนี้ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN, Germany) สำหรับใช้ในขั้นตอนการโคลนยีนต่อไป

ตารางที่ 1 แหล่งตัวอย่างดินและสมบัติทางกายภาพของตัวอย่างดินที่ใช้ในการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

แหล่งดิน	จำนวนตัวอย่างดิน	ลักษณะดิน	สี	อุณหภูมิ (°ซ)	พีเอช
กลุ่ม 1[ก]	14	ดินทรายและดินร่วนปนทราย	ขาว-น้ำตาล	70-75	7.0
กลุ่ม 2[ข]	10	ดินร่วนเหนียวปนทราย	เทา	50-56	8.0
กลุ่ม 3[ค]	40	ดินร่วน	น้ำตาล	37-45	7.3
กลุ่ม 4[ง]	40	ดินร่วน	น้ำตาล	45-55	7.0

[ก] บ้านหนองครก จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย
[ข] บ้านบ่อคลึง จังหวัดราชบุรี ประเทศไทย
[ค] จังหวัด Kawasaki ประเทศญี่ปุ่น
[ง] จังหวัด Kamakura ประเทศญี่ปุ่น

3.3 การโคลนยีนแอมิโลมอลเทส

3.3.1 การโคลนยีนแอมิโลมอลเทสเข้า pGEM®-T easy vector เพื่อหาลำดับดีเอ็นเอของยีน (DNA sequencing) ขั้นตอนแรกเป็นการเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1.5 กิโลเบส กับ pGEM®-T easy ขนาด 3.0 กิโลเบส (Promega, Netherland) ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase (New England Biolabs, USA) และเคลื่อนดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยชนิด *E. coli* DH5α ด้วยวิธี heat shock ผลการทดลองได้รีคอมบิแนนท์เซลล์ประมาณ 300 โคโลนี ทำการคัดแยกรีคอมบิแนนท์เซลล์ด้วยวิธี blue-white screening เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว จำนวน 24 โคลน สกัดพลาสมิดนำมาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส และพบว่ามีเพียง 5 รีคอมบิแนนท์เซลล์ ได้แก่ รีคอมบิแนนท์เซลล์หมายเลข 1, 7, 13, 14 และ 15 ให้ขนาดพลาสมิดประมาณ 4.5 กิโลเบส (linear form) ตามที่ต้องการ จึงทำการตรวจสอบลำดับเบส ผลการหาลำดับดีเอ็นเอของยีนแอมิโลมอล

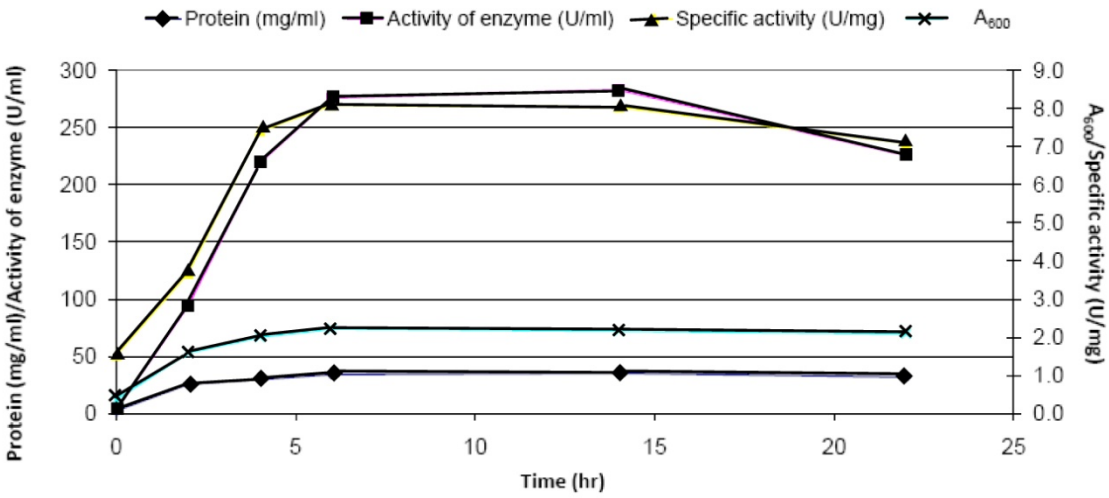
เทสจาก 5 รีคอมบิแนนท์เซลล์ พบว่ายีนแอมิโลมอลเทสมีขนาด 1,503 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 500 ตัว (รูปที่ 2) โดยลำดับของกรดอะมิโนที่ได้นี้มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus thermophillus* ATCC 33923 (เดิมรายงานเป็น *Thermus aquaticus* ATCC 33923) ร้อยละ 99 มีความเหมือนกับเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus aquaticus* YT-1 ร้อยละ 86 และเหมือนกับเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus scotoductus* ร้อยละ 81 ตามลำดับ แต่เมื่อทำการศึกษา plasmid mapping พบว่าทิศทางของยีนแอมิโลมอลเทสมีทิศตรงกันข้ามกับทิศทางของ P_{lac} promoter ของพลาสมิด pGEM®-T easy ทำให้ยีนไม่สามารถแสดงออกได้ จึงต้องทำการโคลนเข้า pET-17b เพื่อให้ยีนแสดงออกได้ โดยในการโคลนเข้าพลาสมิด pET-17b นั้น ได้กำหนดทิศทางของยีนที่แน่นอน โดยปลายด้านอะมิโน (N-terminus) มีตำแหน่ง linker ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde* I และปลายด้านคาร์บอกซิลิก (C-terminus) มีตำแหน่ง linker ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

3.3.2 การโคลนยีนเข้า pET-17b เพื่อการแสดงออกของเอนไซม์แอมิโลมอลเทส นำยีนแอมิโลมอลเทสมาเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ AMYp13-forward และ AMYp13-reverse ภายใต้สภาวะพีซีอาร์ คือ 1 รอบ ของ Pre-denaturation ที่ 95°ซ นาน 5 นาที และ 30 รอบ ของ denaturation 95°ซ นาน 1 นาที annealing ที่ 57°ซ นาน 0.5 นาที extension ที่ 72°ซ นาน 1.5 นาที ตามด้วย 1 รอบ สุดท้ายของ final extension ที่ 72°ซ นาน 5 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนแอมิโลมอลเทสไปตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide พบยีนแอมิโลมอลเทสขนาด 1.5 กิโลเบส จึงตัดแถบดีเอ็นเอนี้ เพื่อ

```
   1 atggagcttccgcgcgcttatggtctgcttctccaccccacgagc
     M  E  L  P  R  A  Y  G  L  L  L  H  P  T  S
  46 ctccccggcccctacggcgtcggcgtcctgggccaggaggcccgg
     L  P  G  P  Y  G  V  G  V  L  G  Q  E  A  R
  91 gacttcctccgcttcctcaaggaggcagggggcggtactggcag
     D  F  L  R  F  L  K  E  A  G  G  R  Y  W  Q
 136 gtcctcccctttgggccccacgggctatggcgactcccctaccag
     V  L  P  L  G  P  T  G  Y  G  D  S  P  Y  Q
 181 tccttcagcgccttcgccggaaacccctacctcatagacctgagg
     S  F  S  A  F  A  G  N  P  Y  L  I  D  L  R
 226 cccctcgcggaaaggggctacgtgcgcctggaggaccccggcttc
     P  L  A  E  R  G  Y  V  R  L  E  D  P  G  F
 271 ccccaaggccgggtggactacggcctcctctacgcctggaagtgg
     P  Q  G  R  V  D  Y  G  L  L  Y  A  W  K  W
 316 cccgccctgaaggaggccttccggggcttcaaggaaaaggcctcc
     P  A  L  K  E  A  F  R  G  F  K  E  K  A  S
 361 ccggaggagcgggaggccttcgccgccttcccggagagggaggcc
     P  E  E  R  E  A  F  A  A  F  R  E  R  E  A
 406 tggtggctcgaggactacgccctcttcatggccctgaaggggcg
     W  W  L  E  D  Y  A  L  F  M  A  L  K  G  A
 451 cacgggggggcttccctggaaccggtggcccccttcccctgcggaag
     H  G  G  L  P  W  N  R  W  P  L  P  L  R  K
 496 cgggaagagaagggcccttagggaggcgaaaagcgccttggccgag
     R  E  E  K  A  L  R  E  A  K  S  A  L  A  E
 541 gaggtggccttccacgccttcacccagtggctcttcttccgccag
     E  V  A  F  H  A  F  T  Q  W  L  F  F  R  Q
 586 tgggggggcttgaaggcggaggccgaggcgttgggcatccggatc
     W  G  A  L  K  A  E  A  E  A  L  G  I  R  I
 631 atcggggacatgcccatcttcgtggccgaggactccgccgaggtc
     I  G  D  M  P  I  F  V  A  E  D  S  A  E  V
 676 tgggcccaccccgagtggtttcacctggacgaggaggggccgcccc
     W  A  H  P  E  W  F  H  L  D  E  E  G  R  P
 721 acggtggtggcgggggtgcccccccgactacttctcggagacgggc
     T  V  V  A  G  V  P  P  D  Y  F  S  E  T  G
 766 cagcgctggggcaacccccttttaccgctgggacgttttggagcgg
     Q  R  W  G  N  P  L  Y  R  W  D  V  L  E  R
 811 gaggggttctcttctggatccgccgtctggagaaggccctggag
     E  G  F  S  F  W  I  R  R  L  E  K  A  L  E
 856 ctcttccacctggtgcgcatagaccacttccgcggctttgaggcc
     L  F  H  L  V  R  I  D  H  F  R  G  F  E  A
 901 tactgggagatccccgcaagctgccccacggcggtggaggggcgc
     Y  W  E  I  P  A  S  C  P  T  A  V  E  G  R
 946 tgggtcaaggccccggggagaagctcttccagaagatccaggag
     W  V  K  A  P  G  E  K  L  F  Q  K  I  Q  E
 991 gtcttcggcgaggtccccgtcctcgccgaggacctggggtcatc
     V  F  G  E  V  P  V  L  A  E  D  L  G  V  I
1036 acccccgaggtggaggccctgcgcgaccgcttcggccttcccggg
     T  P  E  V  E  A  L  R  D  R  F  G  L  P  G
1081 atgaaggtcctgcagttcgcctttgacgacgggatggaaaacccc
     M  K  V  L  Q  F  A  F  D  D  G  M  E  N  P
1126 ttcctcccccacaactaccctgcccacggccgggtggtggtctac
     F  L  P  H  N  Y  P  A  H  G  R  V  V  V  Y
1171 accggcacccacgacaacgacaccaccctgggctggtaccgcacg
     T  G  T  H  D  N  D  T  T  L  G  W  Y  R  T
1216 gccacccccccacgagaaggccttcatggcgcggtacctggcggac
     A  T  P  H  E  K  A  F  M  A  R  Y  L  A  D
1261 tggggggatcaccttccgggaagaggaggaggtgccctgggccctg
     W  G  I  T  F  R  E  E  E  E  V  P  W  A  L
1306 atgcacctggggatgaagtccgtggcccggctcgccgtctacccg
     M  H  L  G  M  K  S  V  A  R  L  A  V  Y  P
1351 gtgcaggacgtcctggccctgggcagcgaggcccggatgaactac
     V  Q  D  V  L  A  L  G  S  E  A  R  M  N  Y
1396 ccgggaaggccctcggggaactgggcctggcggctcctcccgggg
     P  G  R  P  S  G  N  W  A  W  R  L  L  P  G
1441 gagctttccccggagcacggggcgaggcttagggccatggccgag
     E  L  S  P  E  H  G  A  R  L  R  A  M  A  E
1486 gccacgggacggctgtaa 1503
     A  T  G  R  L  *
```

รูปที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนแอมิโลมอลเทส

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุด QIAquick Gel Extraction kit และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Eco*RI จากนั้นจึงเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอ 1.5 กิโลเบส ของยีนแอมิโลมอลเทสเข้ากับพลาสมิด pET-17b ด้วยเอนไซม์ T_4 DNA ligase และเคลื่อนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (pAMY17b) เข้าสู่เซลล์ให้อาศัย *E. coli* BL21 (DE3) ด้วยวิธี heat shock ผลการทดลองได้รีคอมบิแนนท์เซลล์จำนวน 100-200 โคโลนี สุ่มเลือกรีคอมบิแนนท์เซลล์ จำนวน 24 โคโลนี มาสกัดพลาสมิดพบว่ามีเพียง 4 รีคอมบิแนนท์เซลล์ ที่มีขนาดรีคอมบิแนนท์พลาสมิดประมาณ 4.8 กิโลเบส ตามที่ต้องการ ได้แก่ รีคอมบิแนนท์พลาสมิดหมายเลข 1-5, 1-11, 2-2 และ 2-5 ดังนั้นจึงตรวจสอบการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสของทั้ง 4 รีคอมบิแนนท์เซลล์ ด้วยการวัดกิจกรรม disproportionation ของเอนไซม์ และหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay ผลการทดลองพบว่ารีคอมบิแนนท์เซลล์หมายเลข 2-5 ให้ค่า specific activity (8.1 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน) สูงสุดที่การเหนี่ยวนำการเลี้ยงเซลล์ด้วย IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 การแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสจาก pAMY17b *E. coli* BL21(DE3) No. 2-5 หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย 0.5 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่เวลาต่างๆ

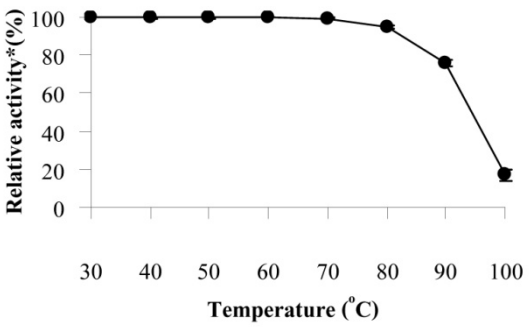
3.4 การผลิตเอนไซม์แอมิโลมอลเทสชนิดหยาบ

นำรีคอมบิแนนท์พลาสมิดหมายเลข 2-5 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เขย่าเชื้อที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงดูดเชื้อตั้งต้น 1% ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB (pH 7.2) ที่ประกอบด้วยแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดทดลอง (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 7 ขวด เขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จนเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วงทวีคูณ (log phase) คือวัดค่าความขุ่นของน้ำเลี้ยงเชื้อที่

ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.4-0.5 หน่วย จึงเติม IPTG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และเลี้ยงเซลล์ต่อไปเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ปั่นเก็บเซลล์ ล้างเซลล์ และทำให้เซลล์แตกด้วยการใช้คลื่นเสียงความถี่สูง ปั่นแยกเอนไซม์ชนิดหยาบออกจากเศษเซลล์ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง และตรวจวัดกิจกรรม disproportionation ของเอนไซม์ได้ 275 ยูนิต/มล.

3.5 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์แอมิโลมอลเทส

นำเอนไซม์ชนิดหยาบที่ผลิตขึ้นมาศึกษาหาค่าพีเอช อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอมิโลมอสเทสสูงที่สุดที่พีเอชเท่ากับ 9 และอุณหภูมิเท่ากับ 70°ซ เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ด้วยการบ่มเอนไซม์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 1 ชั่วโมง ก่อนวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ พบว่าหลังจากบ่มเอนไซม์ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 °ซ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์แอมิโลมอสเทสยังเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แต่พบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์ทิ้งไว้



รูปที่ 4 ผลกระทบของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์แอมิโลมอลเทส
(*disproportionation activity)

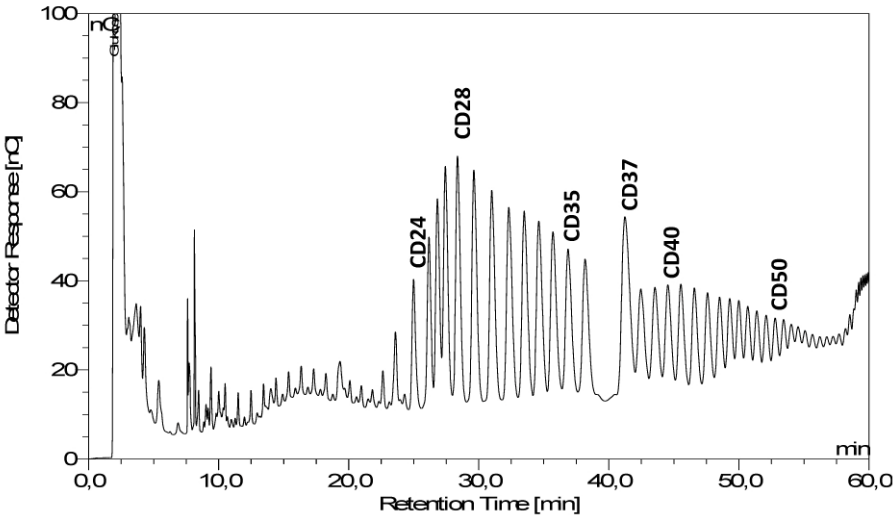
1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80, 90 และ 100°ซ ก่อนวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเสถียรภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง 5, 24 และ 83 เปอร์เซ็นต์ ตาม ลำดับ (รูปที่ 4)

3.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่

ผลการศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ ได้แก่ ชนิดของแป้ง ความเข้มข้นของสับสเตรท ปริมาณ (ยูนิต) ของเอนไซม์ เวลา และอุณหภูมิในการบ่มปฏิกิริยา พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่อยู่ที่การบ่มเอนไซม์ที่ 64 ยูนิต (วัดจาก disproportionation activity assay) กับ 2% (w/v) แป้งถั่ว (pea starch) ที่อุณหภูมิ 70°ซ พีเอช 9.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ที่สังเคราะห์ขึ้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสมด้วยเครื่อง HPAEC-PAD (รูปที่ 5) พบว่าเอนไซม์แอมิโลมอลเทสสามารถเร่งปฏิกิริยา cyclization เพื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ตั้งแต่ CD23 ขึ้นไป โดยพบว่าได้ผลิตภัณฑ์ CD28 ในปริมาณสูงที่สุด จากนั้นจึงแยกเก็บผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ในแต่ละขนาดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ (guest molecule) ที่มีขนาดพอเหมาะกับโพรง

4. วิจารณ์ผลการศึกษา

ด้วยเหตุที่ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่มีบทบาทสำคัญในการนำไปประยุกต์ใช้ทางเภสัชศาสตร์ อาหาร และเทคโนโลยีชีวภาพ [23] ดังนั้นเอนไซม์แอมิโลมอลเทสที่สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่จึงได้รับความสนใจอย่างยิ่ง โดยมีนักวิจัยหลายกลุ่มพยายามจะโคลนยีน



รูปที่ 5 การแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสจาก pAMY17b *E. coli* BL21(DE3) No. 2-5 หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย 0.5 มิลลิโมลาร์ IPTG ที่เวลาต่างๆ

แอมิโลมอลเทส ซึ่งประสบความสำเร็จในการโคลนยีนจาก *E. coli* [8], *Streptococcus pneumoniae* [9], *Clostridium butyricum* NCIMB 7423 [11], hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* [12], *Thermus aquaticus* ATCC 33923 [13], *Aquifex aeolicus* [2], *Pyrobaculum aerophilum* IM2 [14] และ *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 [24] ตามลำดับ โดยมีเพียงเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ATCC 33923 และ *Aquifex aeolicus* เท่านั้น ที่มีการพิสูจน์แล้วว่าสามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ได้ อย่างไรก็ตามขนาดยีนแอมิโลมอลเทสจากแหล่งผลิตที่แตกต่างกันจะมีขนาดแตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น ยีนแอมิโลมอลเทสในกลุ่มแบคทีเรียทนร้อน *Thermus* sp. ส่วนใหญ่จะมียีนขนาด 1,503 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 500 ตัว [13,20] ในขณะที่ยีนแอมิโลมอลเทสจากกลุ่มแบคทีเรียจำพวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic bacteria) เช่น *Corynebacterium glutamicum* หรือ *Escherichia coli* มียีนขนาดที่ใหญ่มากกว่าประมาณ 2,121 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 706 ตัว [10,24] ส่วนกลุ่มแบคทีเรียทนร้อนสูง (hyperthermophilic bacteria) เช่น *Pyrobaculum aerophilum* IM2 [14] มียีนขนาด 1,407 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 468 ตัว และ *Aquifex aeolicus* [2] มียีนขนาด 1,458 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 485 ตัว สำหรับยีนแอมิโลมอลเทสที่คัดแยกโดยตรงจากดินของบ่อน้ำพุร้อนบ้านหนองครกในการทดลองนี้มีขนาดยีน 1,503 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 500 ตัว เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนพบว่ามีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus thermophillus* ATCC 33923 ร้อยละ 99 [13] มีความเหมือนกับเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus aquaticus* YT-1 ร้อยละ 86 [20] และเหมือนกับเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus scotoductus* ร้อยละ 81 [25] ตามลำดับ

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสในงานวิจัยนี้ พบว่ารีคอมบิแนนท์ยีนที่โคลนได้ขาดโปรโมเตอร์ของตัวเอง ดังนั้นการแสดงออกของยีนจึงขึ้นกับ T7 โปรโมเตอร์บน pET-17b โดยทั่วไประบบ pET-17b หรือ pET ตัวอื่นๆ เป็นระบบที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบันสำหรับการผลิตโปรตีนใน *E. coli* เนื่องจากระบบนี้สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก ระบบมีความจำเพาะและง่ายต่อการควบคุม จัดเป็นระบบ indirect induction นั่นคือต้องมีการเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีนด้วยตัวเหนี่ยวนำ IPTG โดย IPTG จะเหนี่ยวนำการแสดงออกของยีน 2 ยีน คือ เหนี่ยวนำการสร้าง T7 RNA polymerase ของเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* และเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนที่ต้องการของยีนที่ถูกโคลนเข้าไปในดีเอ็นเอพาหะ pET เมื่อ T7 RNA polymerase จับที่ T7 promoterโดยปราศจากการขัดขวางของโปรตีน repressor ที่ *lacO* การแสดงออกของยีนจึงเกิดขึ้นได้ ดังนั้นปริมาณความเข้มข้นของ IPTG ที่ใช้จึงเป็นเรื่องสำคัญที่ต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม และโดยทั่วไปสภาวะการเหนี่ยวนำของยีนจะดีที่สุดเมื่อเซลล์รีคอมบิแนนท์อยู่ในช่วง log growth phase (A_{600} = 0.4-0.5) ซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ประมาณ 2 ชั่วโมง ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ โดยสภาวะการเหนี่ยวนำที่เหมาะสมที่สุดของยีนแอมิโลมอลเทสในการทดลองนี้ พบว่าอยู่ที่ความเข้มข้ม IPTG 0.5 มิลลิโมลลาร์ และระยะเวลาการเหนี่ยวนำ 6 ชั่วโมง โดยทั่วไป *Escherichia coli* BL21(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้านปกติ ที่มีการใช้สำหรับการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสจากแหล่งต่างๆ [2,11,13, 24] มากมาย อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสสามารถทำได้ในเซลล์เจ้าบ้านอื่นๆ เช่น *Bacillus subtilis* [26,27] แต่พบว่าการแสดงออกของยีนแอมิโลมอลเทสใน *Bacillus subtilis* อยู่ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับ *Escherichia coli* BL21(DE3) ดังนั้นในการโคลนยีนแอมิโลมอลเทสในระบบ pET vector จึงนิยมใช้ *Escherichia coli* BL21(DE3) เป็นเซลล์เจ้าบ้านมากกว่า

การศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจากตัวอย่างดินที่เก็บจากบ่อน้ำพุร้อนบ้านหนองครก ประเทศไทย พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรม disproportionation ของเอนไซม์อยู่ที่ 70°ซ โดยกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เริ่มสูญเสียเมื่อบ่มเอนไซม์ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 80 °ซ ขึ้นไป ดังนั้นผลที่ได้จากการทดลองสามารถอ้างได้ว่าเอนไซม์แอมิโลมอลเทสในการทดลองนี้จัดเป็นเอนไซม์ทนร้อน (thermostable enzyme) และการอ้างอิงจากรายงานอื่นๆ พบว่าเอนไซม์แอมิโลมอลเทสทนร้อนจากแบคทีเรียสายพันธุ์ทนร้อน (thermophilic bacteria) สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Thermus aquaticus* ATCC 33923 [13] และ *Thermotoga maritime* [28] มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ 75 และ 70°ซ ตามลำดับ และสามารถทนร้อนได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 85 °ซ สำหรับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรม disproportionation ของเอนไซม์อยู่ที่พีเอช 9.0 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ค่อนข้างสูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น เช่น *Thermus aquaticus* ATCC 33923 [13] มีพีเอชที่เหมาะสมที่ 5.5-6.0 *E. coli* IFO3806 [29] มีพีเอชเหมาะสมที่ 6.5 แต่อย่างไรก็ตามยังมีพวกกลุ่มแบคทีเรียทนเบส (alkali bacteria) เช่น *Pseudomonas stutzeri* [30] และ *Thermotoga maritime* [28] สามารถผลิตเอนไซม์แอมิโลมอลเทสทนเบสที่ทำงานได้ดีที่พีเอชสูงขึ้นถึง 7.7 และ 8.0 ตามลำดับ

เอนไซม์แอมิโลมอลเทสนอกจากเร่งปฏิกิริยา disproportionation แล้ว เอนไซม์ยังเร่งปฏิกิริยา cyclization เพื่อผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ โดยการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ทั้งชนิด (CD-LRs) และปริมาณ (peak area) ของไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ที่ผลิตขึ้นอยู่กับหลายๆ ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของสารตั้งต้นแป้ง ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ความเข้มข้นของเอนไซม์ ระยะเวลาในการบ่มเอนไซม์กับสารตั้งต้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา โดยผลการทดลองพบว่าแป้งที่มีองค์ประกอบของเปอร์เซ็นต์แอมิโลส (amylose; α-1,4-glucan) สูงจะให้ผลผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่สูงกว่าแป้งที่มีองค์ประกอบของเปอร์เซ็นต์แอมิโลเพกติน (amylopectin; α-1,4 และ α-1,6-glucan) สูง นอกจากนี้ยังพบว่ายิ่งเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์ปริมาณของผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ที่ได้จะสูงขึ้น และเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจากงานวิจัยในครั้งนี้ผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ได้ดีที่สุดที่อุณภูมิ 70°ซ การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการส่งถ่ายพลังงานให้แก่โมเลกุลของเอนไซม์ทำให้มีพลังงานมากพอที่จะข้าม energy barrier ทำให้การเร่งปฏิกิริยาประสบผลสำเร็จ สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นแป้งเป็นไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ได้ด้วยคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ แต่ถ้าอุณหภูมิที่สูงเกินไปจะส่งผลให้โครงสร้างเอนไซม์เสียสภาพทำให้การทำงานของเอนไซม์สูญเสียไป โดยสรุปสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ของเอนไซม์นี้ คือ การบ่มเอนไซม์ 64 ยูนิต กับ 2 % (w/v) pea starch substrate ที่อุณหภูมิ 70°ซ พีเอช 7.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเอนไซม์แอมิโลมอลเทสทนร้อนจากตัวอย่างดินที่เก็บจากบ่อน้ำพุร้อนบ้านหนองครกนี้ให้ผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ขนาด DP เท่ากับ 23 ขึ้นไป โดยผลิต CD28 ในปริมาณสูงที่สุด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus aquaticus* ATCC 33923 [13] พบว่าผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ที่มีขนาดเล็กกว่า คือตั้งแต่ CD17 ขึ้นไป แต่ทั้งนี้ก็มีความเป็นไปได้ว่าเอนไซม์แอมิโลมอลเทสทนร้อนในการทดลองนี้สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ที่มีขนาดเล็กกว่า CD23 ได้แต่ก็มีปริมาณที่ค่อนข้างน้อย (รูปที่ 5)

5. สรุปผลการศึกษา

เทคนิค genetic-based screening นำไปสู่การค้นพบยีนแอมิโลมอลเทสตัวใหม่จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ปนอยู่ในแหล่งดินตามธรรมชาติ โดยยีนแอมิโลมอลเทสที่ค้นพบมีขนาด 1,503 คู่เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 500 ตัว ลำดับกรดอะมิโนที่ได้นี้มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก *Thermus thermophillus* ATCC 33923 มากที่สุด แต่เมื่อศึกษาลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจากการทดลองนี้พบว่ามีหลายลักษณะแตกต่างจาก *Thermus thermophillus* ATCC 33923 และเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจากแหล่งอื่นๆ ที่เคยมีรายงานไว้ เช่น ค่าพีเอช ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งไปเป็นไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ โดยเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก pAMY17b *E. coli* BL21(DE3) สามารถสังเคราะห์ไซโคลเดกซ์ทรินขนาดตั้งแต่ CD23 ขึ้นไป และจากลักษณะจำเพาะเหล่านี้ของเอนไซม์จึงสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์แอมิโลมอลเทสจาก pAMY17b *E. coli* BL21(DE3) นี้เป็น

เอนไซม์แอมิโลมอลเทสทนร้อนตัวใหม่ที่สามารถผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิดวงใหญ่ที่อุณหภูมิสูงได้

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทางมหาวิทยาลัยที่ให้ทุนวิจัยในครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

[1] Takaha, T. and Smith, S.M., 1999, The functions of 4-α-glucanotransferases and their use for the production of cyclic glucans, Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 16: 257-280.

[2] Bhuiyan, S.H., Kitaoka, M. and Hayashi, K., 2003, A cycloamylose-forming hyperthermostable 4-α-glucanotransferase of *Aquifex aeolicus* expressed in *Escherichia coli*, J. Mol. Catal. B: Enzym. 22: 45-53.

[3] Szejtli, J., 1988, Cyclodextrin Technology, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 979 p.

[4] Bender, H., 1986, Production, characterization and application of cyclodextrins, Adv. Biotech. Proc. 6: 31-71.

[5] Strohmeier, K.W., 1998, Cyclodextrin formulations are commercially acceptable, Cyclopedia 1: 1-4.

[6] Kaulpiboon, J., 2005, Applications of cyclodextrins in food and drug, Thammasat Med. J. 5: 230-236.

[7] Machida, S., Ogawa, S., Xiaohua, S., Takaha, T., Fujii, K., and Hayashi, K., 2000, Cycloamylose as an efficient artificial chaperone for protein refolding, FEBs lett. 486: 131-135.

[8] Monod, J. and Torriani, A.M., 1950, Amylomaltase of *Escherichia coli*, Ann. Inst. Pasteur. (Paris) 78: 65-77.

[9] Stassi, D.L., Lopez, P., Espinosa, M. and Lacks, S.A., 1981, Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumonia*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7028-7032.

[10] Pugsley, A.P. and Dubreuil, C., 1988, Molecular characterization of *mal Q*, the structural gene for the *Escherichia coli* enzyme amylomaltase, Mol. Microbiol. 2: 473-479.

[11] Goda, S.K., Eissa, O., Akhtar, M. and Minton, N.P., 1997, Molecular analysis of a *Clostri-0dium butyricum* NCIMB 7423 gene encoding 4-alpha-glucanotransferase and characterization of the recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*, Microbiology 143: 3287-3294.

[12] Jeon, B.S., Taguchi, H., Sakai, H., Ohshima, T., Wakagi, T. and Matsuzawa, H., 1997, 4-alpha-glucanotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*: enzyme purification and characterization, and gene cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli*, Eur. J. Biochem. 248: 171-178.

[13] Terada, Y., Fujii, K., Takaha, T. and Okada, S., 1999, *Thermus aquaticus* ATCC 33923 amylomaltase gene cloning and expression and enzyme characterization: Production of

cycloamylose, Appl. Environ. Microbiol. 65: 910-915.

[14] Kaper, T., Talik, B., Ettema, T.J., Bos, H., van der Maarel, M.J. and Dijkhuizen, L., 2005, Amylomaltase of *Pyrobaculum aerophilum* IM2 produces thermoreversible starch gels, Appl. Environ. Microbiol. 71: 5098-5106.

[15] Peat, S., Whelan, W.J. and Ress, W.R., 1956, The disproportionating enzyme (D-enzyme) of the potato, J. Chem. Soc. 1956: 44-53.

[16] Okita, T.W. and Preiss, J., 1980, Starch degradation in spinach leaves: Isolation and characterization of the amylase and D-enzyme of spinach leaves, Plant Physiol. 66: 870-876.

[17] Lin, T.P. and Preiss, J., 1988, Characterization of D-enzyme (4-alpha-glucanotransferase) in arabidopsis leaf, Plant Physiol. 86: 260-265.

[18] Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., 1982, Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 1st Ed., Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Habor, N.Y., 545 p.

[19] Federick, M.A., Roger, B., Robert, E.K., David, D.M. Seidman, J.G., John, A.S. and Kevin, S., 1995, Short Protocols in Molecular Biology, 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc. USA, 1512 p.

[20] Park, J.H., Kim , H.J., Kim, Y.H., Cha, H., Kim, Y.W., Kim, T.J., Kim, Y.R. and Park, K.H., 2007, The action mode of *Thermus aquaticus* YT-1 4-a-glucanotransferase and its chimeric enzymes introduced with starch-binding domain on amylose and amylopectin, Carbohydr. Polym. 67: 164-173.

[21] Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the qualitatively of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72: 248-254.

[22] Weber, K. and Osborn, M., 1975, Proteins and SDS: Molecular Weight Determination on Polyacrylamide Gels and Related Procedures, pp. 179-233, In Neurath, H., Hill, R. L. and Border, C. (Eds.), The Proteins, Academic Press, New York.

[23] Endo, T., Zheng, M. and Zimmermann, W., 2002, Enzymatic synthesis and analysis of large-ring cyclodextrins, Aust. J. Chem. 55: 39-48.

[24] Srisimarat, W., Powviriyakul, A., Kaulpiboon, J., Krusong, K., Zimmermann, W. and Pongsawasdi, P., 2010, A novel amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the large-ring cyclodextrin products, J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. 70: 369-375.

[25] Seo, N.S., Roh, S.A., Auh, J.H., Park, J.H., Kim, Y.R. and Park, K.H., 2007, Structural characterization of rice starch in rice cake modified by *Thermus scotoductus* 4-alpha-glucanotransferase (TS alpha GTase), J. Food Sci. 72: 331-336.

[26] Kang, H.K, Jang, J.H., Shim, J.H., Park, J.T., Kim, Y.W. and Park, K.H., 2010, Efficient

constitutive expression of thermostable 4-α-glucanotransferase in *Bacillus subtilis* using dual promoters, World J. Microbiol. Biotechnol. 26: 1915-1918.

[27] Esposito, D. and Chatterjee, D.K., 2006, Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags, Curr. Opi. Biot. 17: 353-358.

[28] Leibl, W., Feil, R., Gabelsberger, J., Kellermann, J. and Schleifer, K.H., 1992, Purification and characterization of a novel thermostable 4-α-glucanotransferase of *Thermotoga maritime* cloned in *Escherichia coli*, Eur. J. Biochem. 207: 81-88.

[29] Kitahata, S., Murakami, H. and Okada, S., 1989, Purification and some properties of amylomaltase from *Escherichia coli* IFO3806, Agr. Biol. Chem. 53: 2653-2659.

[30] Schmidt, J. and John, M., 1979, Starch metabolism in *Pseudomonas stutzeri*. II. Purification and properties of a dextrin glucosyltransferase (D-enzyme) and amylomaltase, Biochem. Biophys. Acta. 566: 100-114.