



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความจำเพาะต่อการสังเคราะห์โอลิโก-
แมนโนไซด์ด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดส

โดย ดร. ภัชราพร วงศ์วิฑูรยาพร

กุมภาพันธ์ 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การศึกษาความจำเพาะต่อการสังเคราะห์
โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร. ภัชราพร วงศ์วิฑูรยาพร

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศ. ดร. ม.ร.ว. ชินธุสรวร สวัสดิวัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัยนี้ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ผลักดัน และความช่วยเหลือต่างๆ เพื่อให้งานวิจัยนี้ลุล่วง

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่กรุณาให้โอกาสทั้งเงินทุนวิจัย และแรงกระตุ้นในการทำงานวิจัย ถึงแม้จะประสบปัญหานานัปการในการทำงานวิจัย แต่ สกว. ก็ยังให้โอกาสอยู่เสมอ

ท้ายสุด ขอขอบคุณหน่วยงาน คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้การสนับสนุนเกี่ยวกับเครื่องมือและอุปกรณ์ พร้อมทั้งห้องปฏิบัติการในการทำงานวิจัยให้ลุล่วง

ดร. ภัชราพร วงศ์วิฑูรยาพร
กุมภาพันธ์ 2552

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF-42-2543

ชื่อโครงการ : การศึกษาความจำเพาะต่อการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วยเอนไซม์
อัลฟา-แมนโนซิเดส

ชื่อนักวิจัย : ดร. ภัชรพร วงศ์วิฑูรยาพร สำนักวิชาวิทยาศาสตร์เครื่องสำอาง
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

E-mail address : patjaraporn@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2543 – 28 กุมภาพันธ์ 2552

เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเชื่อมแมนโนสกับโอลิโกแซคคาไรด์ในไกลโคโปรตีนโดยเฉพาะไกลโคโปรตีนชนิดที่เชื่อมต่อการดะมิโนแอสปาราจีน (N-linked glycoprotein) นอกจากนี้ เอนไซม์ชนิดนี้ยังมีความสำคัญในการนำไปใช้เพื่อการตรวจวิเคราะห์แมนโนสในโอลิโกแซคคาไรด์ รวมทั้งการนำไปสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบ โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างของเอนไซม์และความจำเพาะต่อการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์ เนื่องจากการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีปริมาณมากพอต่อการศึกษาหลายปฏิกิริยา แต่เอนไซม์ที่สกัดแยกได้มีปริมาณน้อยมากๆ และไม่เสถียร (unstable) อีกด้วย ทำให้ผู้วิจัยไม่สามารถศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวตามวัตถุประสงค์ได้ จึงได้ทำการศึกษาสมบัติทางกายภาพ จลนศาสตร์ และความจำเพาะต่อการสลายและการสังเคราะห์ของเอนไซม์แทน

ได้สกัดและแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) โดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนแบบแยกลำดับส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 30-80 เปอร์เซ็นต์ และตามด้วยโครมาโทกราฟีชนิดต่างๆ ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุบวก (DEAE-52 cellulose) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุลบ (CM-52 cellulose) โครมาโทกราฟีแบบไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (hydroxyapatite) และโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน (Sephacryl HR S-200 และ HR S-300) พบว่าเมล็ดกระเจี๊ยบแดงมีเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส 2 ไอโซไซม์ โดยไอ

ไอโซไซม์ชนิดที่ I จะมีค่าพีไอที่ 4.8 ขณะที่ไอโซไซม์ชนิดที่ II มีค่าพีไอที่ 4.9-6.0 ไอโซไซม์ทั้ง 2 ต้องการ Zn^{2+} ช่วยในการคงแอกทิวิตีของเอนไซม์เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชเป็นกรด เนื่องจากไอโซไซม์ชนิดที่ II มีแอกทิวิตีต่ำมาก ไม่เพียงพอต่อการศึกษาต่อ จึงศึกษาสมบัติของ ไอโซไซม์ชนิดที่ I เท่านั้น จากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดเสียสภาพธรรมชาติ (SDS-PAGE) ได้แถบโปรตีน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 69.6 และ 56.6 กิโลดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสในสภาพธรรมชาติอยู่ในช่วงระหว่าง 357-481 กิโลดาลตัน ไอโซไซม์ชนิดที่ I ถูกแยกจากไอโซไซม์ชนิดที่ II โดยการใช้โครมาโทกราฟีชนิดเรซินเป็นประจุลบ (CM-52 cellulose) ด้วยค่าพีเอชที่ 4.4 ที่มีซิงค์คลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ และใช้เกรเดียนท์พีเอชแบบขั้นบันได (step pH gradient) เริ่มจากพีเอช 4.4 ถึง 5.0 ด้วยการเว้นช่วงพีเอช 0.2 หน่วย ได้โปรตีน 1 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 69.6 กิโลดาลตัน จาก SDS-PAGE จากตัวอย่างไอโซไซม์ชนิดที่ I ขณะที่ไอโซไซม์ชนิดที่ II ไม่สามารถเห็นได้จาก SDS-PAGE เนื่องจากความเข้มข้นของโปรตีนต่ำมากๆ ดังนั้น ไอโซไซม์ชนิดที่ I ควรประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดเดียวกัน 6 หน่วย นอกจากนี้ ยังพบว่าไอโซไซม์ชนิดที่ I มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสลายสับสเตรทสังเคราะห์พารา-ไนโตรเฟนิล-อัลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์ที่พีเอช 4.0-4.5 และ 60-70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ค่าทางจลนศาสตร์ K_m และ V_{max} ของไอโซไซม์ชนิดที่ I ต่อการสลายสับสเตรทสังเคราะห์พารา-ไนโตรเฟนิล-อัลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์เท่ากับ 1.05 มิลลิโมลาร์ และ 0.36 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ

เมื่อศึกษาการสังเคราะห์เบื้องต้นของโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีแมนโนสด้วยเอนไซม์ที่แยกให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วนจากโครมาโทกราฟีแบบไฮดรอกซีแอปทาไทต์ ซึ่งปราศจากเอนไซม์บีต้า-แมนโนซิเดสและเอนไซม์ไกลโคซิเดสหลักชนิดอื่นๆ ด้วยปฏิกิริยาการย้อนกลับการสลายพบว่าเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์แมนโนโบโอสที่ 4.0 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งคล้ายคลึงกับค่าที่ได้จากปฏิกิริยาการสลาย นอกจากนี้ เมื่อนำเอนไซม์ (5 หน่วยเอนไซม์ / มิลลิลิตร) บ่มกับแมนโนส 50 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอช 4.0 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3, 7 และ 10 วัน จะได้ $Man\alpha(1-6)Man$ เป็นผลิตภัณฑ์หลักเมื่อเทียบกับแมนโนโบโอสชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้น คือ $Man\alpha(1-2)Man$, $Man\alpha(1-3)Man$ และ $Man\alpha(1-4)Man$ การวิเคราะห์โดยโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบแสดงให้เห็นว่าไม่มีผลผลิตใดๆ จากตัวอย่างที่บ่มเอนไซม์กับแมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ และไซโลส 40 เปอร์เซ็นต์ หรือกลูโคส 40 เปอร์เซ็นต์ ณ สภาวะเหมาะสม ขณะที่ตัวอย่างที่บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทแมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ และกาแลกโตสหรืออะราบินอส 40 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลิตภัณฑ์บางอย่างที่ไม่ทราบแน่ชัด

จากผลการทดสอบปฏิกิริยาการสลายและการสังเคราะห์ของเอนไซม์ดังกล่าว สามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบแดงจัดอยู่ในเอนไซม์คลาสที่ II ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสและในแฟมิลีที่ 38 ของเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส

คำหลัก : อัลฟา-แมนโนซิเดส, การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์, สมบัติความจำเพาะ

Abstract

Project Code : PDF/42/2543

Project Title : Investigation of oligomannoside-synthetic specificity by α -mannosidase

Investigator : Dr. Patjaraporn Wongvithoonyaporn School of Cosmetic Science
Mae Fah Luang University

E-mail address : patjaraporn@yahoo.com

Project Period : 1 July, 2000 – 28 February, 2009

α -Mannosidase is an enzyme with an important function in linking a mannose to oligosaccharides in glycoproteins especially in N-linked glycoprotein. Moreover, this enzyme has been important in applying to analysis of mannose in oligosaccharides and syntheses of oligosaccharides containing mannose. This project had aimed to investigate the relationship between the enzyme structure and its oligomannoside-synthetic specificity. Since this study needed much amount of pure enzyme for many reactions but very tiny pure enzyme was obtained and it was also unstable. So the investigator could not study according to the project objective. Investigation of the physical properties, kinetics, and hydrolytic and synthetic specificity of the enzyme was studied instead.

The α -mannosidases were extracted and purified from roselle seed (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) by 30-80% ammonium sulfate fractionation and followed by various chromatographies, i.e., anion exchange (DEAE-52 cellulose), cation exchange (CM-52 cellulose), hydroxyapatite, and gel filtration (Sephacryl HR S-200 and HR S-300) chromatographies. It was found that roselle seed contained 2 isozymes of α -mannosidase in which the isozyme I had pI value of 4.8 whereas the isozyme II had the pI value of 4.9-6.0. Both isozymes required Zn^{2+} for retaining their activities while in the acidic solution. Since the isozyme II had very low activity, not enough for further study, the isozyme I was only studied for its properties. From denaturing gel electrophoresis

(SDS-PAGE), two protein bands were obtained, having the molecular weight of 69.6 and 56.6 kDa. The native molecular weight of the α -mannosidases is in the range of 357-481 kDa. The isozyme I was separated from the isozyme II by using anion exchange chromatography (CM-52 cellulose) with the pH value at 4.4 containing 1 mM ZnCl_2 and running step pH gradient starting from pH 4.4 to 5.0 at the intervals of 0.2 pH unit. Single band having the molecular weight of 69.6 kDa was obtained from SDS-PAGE with the isozyme I sample. Whereas the isozyme II could not be seen due to its very less protein concentration. So the isozyme I should comprise of 6 identical subunits. Moreover, it was found that the isozyme I had optimal pH and temperature for hydrolysis of synthetic substrate, *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside, at pH 4.0-4.5 and 60-70°C, respectively. The kinetic values, K_m and V_{max} , of isozyme I towards hydrolysis of such synthetic substrate, *p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside, are 1.05 mM and 0.36 $\mu\text{mol/min}$, respectively.

When the preliminary syntheses of mannose-containing oligosaccharides with partially purified enzyme, free from β -mannosidase and the other major glycosidases, from hydroxyapatite chromatography were studied using reverse hydrolysis reaction. It was found that the enzyme had optimal pH and temperature for mannobioses synthesis at 4.0 and 60°C, respectively, similar to the values obtained from hydrolytic reaction. In addition, when incubated the enzyme (5 U/ml) for 3, 7 and 10 days with 50% mannose at pH 4.0 and 60°C, $\text{Man}\alpha(1-6)\text{Man}$ was the major product comparing to the other mannobioses, i.e., $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1-3)\text{Man}$ and $\text{Man}\alpha(1-4)\text{Man}$. Analysis by thin-layer chromatography showed no product from the samples of enzyme incubated at optimal conditions with 10% mannose and 40% xylose or 40% glucose. Whereas the samples of enzyme incubated with 10% mannose and 40% either galactose or arabinose as substrates gave some unknown products.

From the results of hydrolytic and synthetic reactions of enzyme, it can be summarized that the α -mannosidases from roselle are in the class II of α -mannosidases and in the family 38 of glycoside hydrolases.

Keywords : α -Mannosidase, oligosaccharide synthesis, specificity property

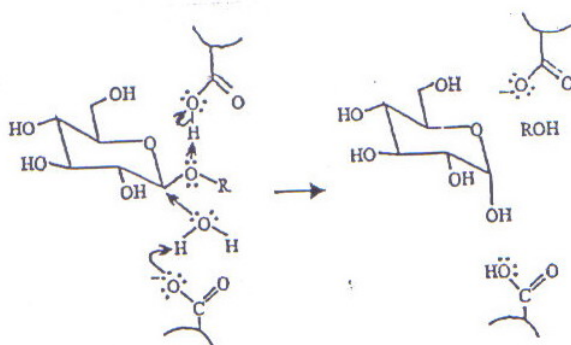
บทนำ

เอนไซม์ไกลโคซิเดส

เอนไซม์ไกลโคซิเดส (EC 3.2) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ของไกลโคไซด์ โอลิโกแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์และคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน เช่น ไกลโคลิพิดหรือไกลโคโปรตีนได้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 พวกใหญ่ ตามลักษณะของพันธะไกลโคซิดิกที่สามารถสลายได้แก่ (1) เอนไซม์ที่สลายคาร์โบไฮเดรตชนิดที่มีพันธะไกลโคซิดิกเชื่อมต่อกับอะตอมออกซิเจน (O-glycosyl; EC 3.2.1) (2) เอนไซม์ที่สลายคาร์โบไฮเดรตชนิดที่มีพันธะไกลโคซิดิกเชื่อมต่อกับอะตอมไนโตรเจน (N-glycosyl; EC 3.2.2) และ (3) เอนไซม์ที่สลายคาร์โบไฮเดรตชนิดที่มีพันธะไกลโคซิดิกเชื่อมต่อกับอะตอมซัลเฟอร์ (S-glycosyl; EC 3.2.3)

กลไกการทำงานของเอนไซม์ไกลโคซิเดส มี 2 รูปแบบ คือ

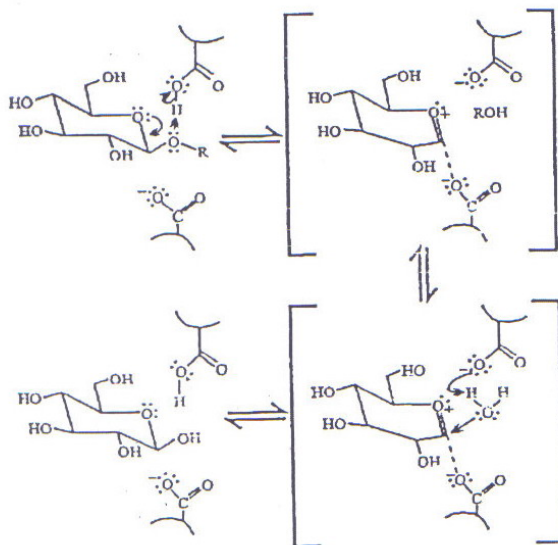
1. Inverting mechanism เป็นกลไกที่มีการดำเนินปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียว และจำเป็นต้องมีน้ำเป็นตัวช่วยในการทำปฏิกิริยา เมื่อเกิดการดำเนินปฏิกิริยา พันธะไกลโคซิดิกของผลิตภัณฑ์จะมีการเปลี่ยนรูปแบบจากสารตั้งต้น ดังรูปที่ 1 ตัวอย่างของเอนไซม์ที่มีกลไกเช่นนี้ได้แก่ เอนไซม์เทรฮาเลส (trehalase) และเอนไซม์บีต้า-อะไมเลส (β -amylase)



รูปที่ 1 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของกลไกชนิด inverting โดยเอนไซม์ไกลโคซิเดส

2. Retaining mechanisim เป็นกลไกการทำงานที่มีการดำเนินของปฏิกิริยา เมื่อเกิดการสลายสารตั้งต้นจะได้สารที่อยู่ในสภาพเปลี่ยน ซึ่งการเกิดปฏิกิริยานี้ไม่จำเป็นต้องมีน้ำเข้าช่วยในขั้นแรก ต่อมาจะเกิดปฏิกิริยาย้อนกลับได้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น พบว่าเมื่อเสร็จสิ้นการดำเนินปฏิกิริยา พันธะไกลโคซิดิกจะไม่มี การเปลี่ยนรูปแบบ ดังรูปที่ 2 ตัวอย่างของเอนไซม์ที่มีกลไก

เช่นนี้ ได้แก่ เอนไซม์บีต้า-กาแลกโทซิเดส (β -galactosidase) เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) และเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme)



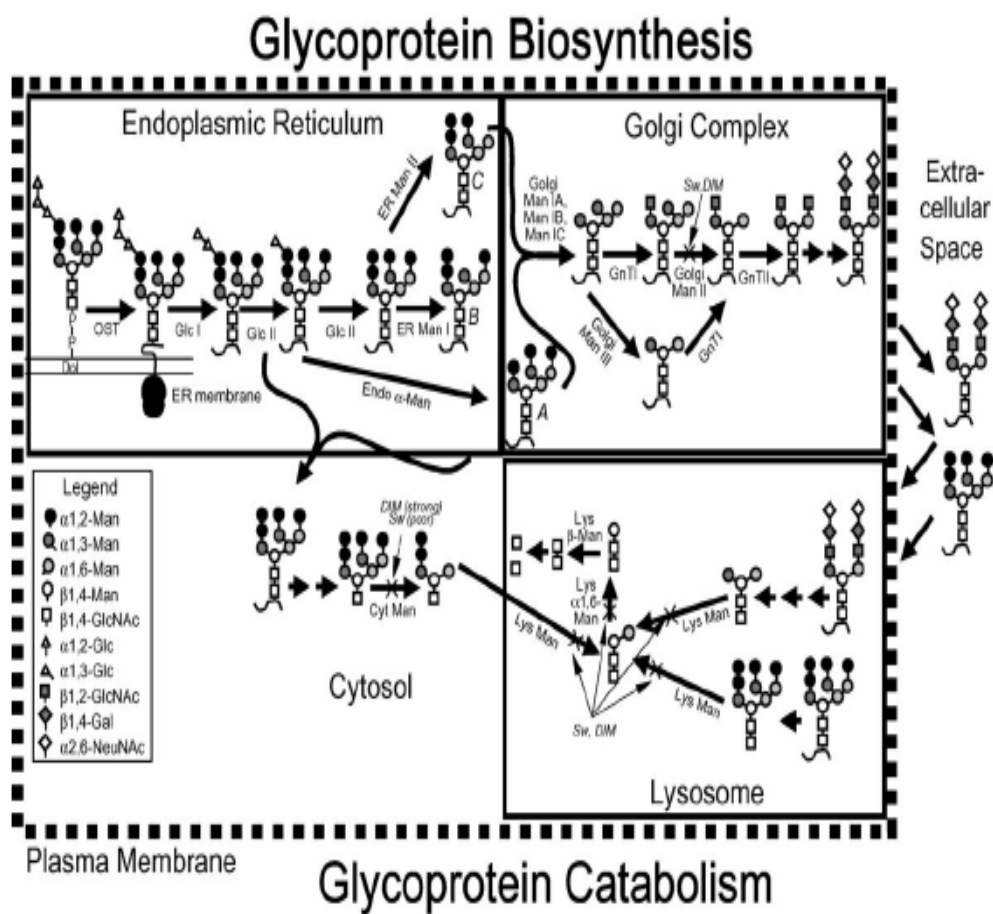
รูปที่ 2 ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาของกลไกชนิด retaining โดยเอนไซม์ไกลโคซิเดส

ประโยชน์ของเอนไซม์ไกลโคซิเดส

ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม ได้แก่ การนำเอนไซม์ไปใช้ในการสังเคราะห์น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในธรรมชาติที่สกัดแยกให้บริสุทธิ์ได้ยาก หรือนำเอนไซม์ไปใช้ในการตรวจวิเคราะห์ลำดับของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate engineering) สำหรับเอนไซม์ไกลโคซิเดสที่พบในสิ่งมีชีวิตพบว่าเอนไซม์ไกลโคซิเดสมีส่วนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ชนิด N-glycans ในออร์กาเนลของสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต (eukaryote) เช่น ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum หรือ ER) และกอลจิ (Golgi) เป็นต้น (Herscovics, 1999) ดังรูปที่ 3

เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส (α -mannosidase, α -D-mannoside mannohydrolase; EC 3.2.1.24) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดที่สลายพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมต่อกับอะตอมออกซิเจน (O-glycosyl) สามารถสลายน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ และทำหน้าที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนแอสพาราจिनของโอลิโกแซคคาไรด์ (Asn-linked oligosaccharide) สามารถตรวจพบเอกทิวทิของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสได้ในออร์กาเนลของยูคาริโอตทุกชนิด



รูปที่ 3 กระบวนการสร้างและสลายโอลิโกแซคคาไรด์ในไกลโคโปรตีน
ของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Glc I: glucosidase I

Glc II: glucosidase II

ER Man I: ER mannosidase I

ER Man II: ER mannosidase II

Endo α -Man: endo α -mannosidase

Golgi Man IA, Man IB, Man IC: Golgi mannosidase IA, IB, and IC

GnT I: GlcNAc transferase I

Golgi Man II: Golgi mannosidase II

GnT II: GlcNAc transferase II

Golgi Man III: Golgi α -mannosidase III

Cytosolic Man: Cytosolic mannosidase

Lys Man: broad-specificity lysosomal α -mannosidase

Lys α 1,6-Man: lysosomal α 1,6-mannosidase

Lys β -Man, lysosomal β -mannosidase

ที่มา: Moremen (2002)

ชนิดของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

การแบ่งกลุ่มเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสสามารถแบ่งกลุ่มได้หลายกลุ่มตามเกณฑ์ต่างๆ ดังนี้

1. อิงตามค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน (optimum pH) ของเอนไซม์ ซึ่งสามารถแบ่งเอนไซม์ออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1.1 acidic α -mannosidase สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 4.0–4.5 และต้องมีไอออนโลหะ Zn^{2+} ช่วยให้เอนไซม์มีเสถียรภาพ และทำงานได้ดียิ่งขึ้น

1.2 intermediate α -mannosidase สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลางและไม่ต้องการไอออนโลหะช่วยในการทำงาน

1.3 neutral α -mannosidase สามารถทำงานได้ที่พีเอช 5.5–6.0 และต้องมีไอออนโลหะ Co^{2+} หรือ Ca^{2+} ช่วยให้เอนไซม์มีเสถียรภาพและทำงานได้ดีขึ้น

2. อิงตามลักษณะความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ผลต่อสารยับยั้ง ชนิดของประจุบวกที่ต้องการ น้ำหนักโมเลกุล แหล่งของเอนไซม์ในออร์แกเนลล์ของเซลล์ และกลไกการทำงานของเอนไซม์ (Moremen, 2002) สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.1 ชนิดที่จำเพาะต่อการสลายแมนโนสของพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง $\alpha(1-2)$ เอนไซม์ในกลุ่มนี้จัดเป็นเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส แฟมิลีที่ 47 ซึ่งจะมีรูปร่างโดเมนของเอนไซม์ในการสลายน้ำตาลแมนโนสเป็นทรงกระบอกที่เกิดจากการรวมตัวของกรดอะมิโน 440–510 ตัว มักเป็นเอนไซม์ชนิด neutral α -mannosidase ต้องการไอออนโลหะชนิด Ca^{2+} ในการทำงาน สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารจำพวกไพแรโนส (pyranose) เช่น ไดออกซีแมนโนจิริมายซิน (deoxymannojirimycin) ทำหน้าที่หลักในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ชนิดที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนแอสพาราจีนให้สมบูรณ์ โดยตัดน้ำตาลแมนโนสออกจากสับสเตรท $Man_9GlcNAc_2$ ได้ผลผลิต $Man_5GlcNAc_2$ จะพบเอนไซม์กลุ่มนี้ได้เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและกอลจิ (Herscovics, 2001)

2.2 ชนิดที่จำเพาะต่อการสลายแมนโนสของพันธะไกลโคซิดิกได้ทั้งตำแหน่ง $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ และ $\alpha(1-6)$ เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส แฟมิลี 38 มีขนาดใหญ่ประมาณ 110–135 กิโลดาลตัน ต้องการ Zn^{2+} ในการทำงาน สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยสารจำพวกฟิวแรโนส (furanose) เช่น สเวนโซนิน (swainsonine) ทำหน้าที่ได้ทั้ง

สังเคราะห์และสลายโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนแอสปาราจีน พบได้ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ไลโซโซม และกอลจิ (Herscovics, 2001 และ Meremen, 2002)

3. อิงตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมิก (genomic) และ complementary DNA (cDNA) ระบบนี้มีข้อดีมากกว่าการอิงตามระบบที่ 1 และ 2 เนื่องจากสามารถเปรียบเทียบเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากแหล่งต่างๆ ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในฐานข้อมูล ทำให้สะดวกในการค้นคว้าหาลำดับเบสของเอนไซม์ เพื่อนำมาใช้ในการจำแนกโคลนและตรวจสอบหน้าที่ของยีนอัลฟา-แมนโนซิเดส สามารถใช้ตัวแทนของกลุ่มลำดับกรดอะมิโนในเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่หลากหลายเพื่อนำมาใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะและลำดับเบสของอัลฟา-แมนโนซิเดส ระบบนี้สามารถแยกเอนไซม์ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

3.1 Clade I ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่มีลำดับเบสในยูคาริโอตชนิดเชื้อราและเมตาซัว ซึ่งยังแบ่งเอนไซม์ใน Clade I ได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

(1) กลุ่มย่อยที่มีลำดับเบสที่ทราบหน้าที่กระจายอยู่ในจีโนม ทำหน้าที่ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและกอลจิคอมเพล็กซ์ จัดให้เป็นเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 47

(2) กลุ่มย่อยที่มีลำดับเบสที่ยังไม่ทราบหน้าที่กระจายอยู่ในจีโนม

3.2 Clade II ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่มีลำดับเบสในยูคาริโอตชนิดที่มีความหลากหลายมากขึ้น นอกจากเชื้อราและเมตาซัวแล้วยังมีกลุ่มของพืช ราเมือกและโปรโตซัวรวมอยู่ด้วย พบว่าเอนไซม์ใน clade นี้มีความหลากหลายในความจำเพาะทางชีวเคมีและมีลำดับเบสที่ทราบหน้าที่ซึ่งทำหน้าที่ในผนังไลโซโซมและกอลจิคอมเพล็กซ์ เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์กอลจิอัลฟา-แมนโนซิเดส (golgi α -mannosidase) ใน Clade I และ Clade II พบว่าเอนไซม์กอลจิอัลฟา-แมนโนซิเดสใน Clade II นี้สามารถตัดพันธะได้ทั้ง $\alpha(1-3)$ และ $\alpha(1-6)$ ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์กอลจิอัลฟา-แมนโนซิเดสใน Clade I ที่ตัดพันธะในแมนโนสได้เฉพาะ $\alpha(1-2)$ เท่านั้น ได้จัดเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสใน Clade II ให้เป็นเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีที่ 38

3.3 Clade III จัดอยู่ตรงกลางระหว่าง Clade I และ II ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่มีลำดับเบสในยูคาริโอตชนิดเมตาซัว เชื้อรา และ อาร์คี (archae) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสใน Clade III เทียบกับเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสใน Clade I และ II ได้จัดให้เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสใน Clade III เป็นเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสแฟมิลีใหม่ (Gonzalez and Jordan, 2000)

ความสำคัญของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

พบว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เมื่อขาดเอนไซม์ไลโซโซม อัลฟา-แมนโนซิเดสจะทำให้เกิดโรคแมนโนซิโดซิส (mannosidosis) ซึ่งพบได้ใน คน วัวและแมว โรคแมนโนซิโดซิสเกิดจากความผิดปกติในการสลายแมนโนสเป็นผลให้เกิดการสะสมของโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบอยู่ในเนื้อเยื่อและปัสสาวะของผู้ป่วยหรือสัตว์ป่วย โดยจะพบอาการปัญญาอ่อน หูหนวก ภูมิคุ้มกันบกพร่องและโครงร่างผิดปกติ (Berg and Hopwood, 2001)

แหล่งที่ค้นพบเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

ในธรรมชาติสามารถตรวจสอบพบเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ได้แก่

- (1) พีช อาทิ เมล็ดมะละกอ (Ohtani and Misaki, 1983) พีชตระกูลแตง (สุพัทธ์และคณะ, 2543) กระเจี๊ยบแดง (Dumrongkiet, 1997), Triticale (*Triticosecale wittmack*; Mahadevi *et al*, 2002) และถั่วนางแดง (Patjaraporn, 1997) เป็นต้น
- (2) สัตว์ เช่น หอยหวมวกเจ็ก (*Aplysia fasciatalimpets*; Andreotti *et al*, 2005) เป็นต้น
- (3) จุลินทรีย์ เช่น *Penicillium citrinum* (Yoshida *et al*, 1993) *Apergillus niger* (Itoh and Kamiyama, 1995) เป็นต้น

โอลิโกแซคคาไรด์

โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งประกอบไปด้วยโมโนแซคคาไรด์ตั้งแต่ 2 ถึง 10 หน่วย ชนิดที่สำคัญและพบได้มากในธรรมชาติ คือ

1. ไดแซคคาไรด์ (Disaccharide) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก เช่น แล็กโทส (lactose) และมอลโทส (maltose) เป็นต้น
2. ไตรแซคคาไรด์ (Trisaccharide) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ 3 โมเลกุล เช่น แรฟฟิโนส (raffinose) เป็นต้น

ความสำคัญของโอลิโกแซคคาไรด์ในสิ่งมีชีวิต

โปรตีนที่มีโอลิโกแซคคาไรด์เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนแอสปาราจีน (N-linked glycoprotein) จัดเป็นไกลโคโปรตีนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการปรับเปลี่ยนหลังการแปลรหัส (post-translational modifications) ส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เชื่อมต่อ จะมีความสำคัญในการเพิ่มความหลากหลายให้กับโปรตีน และมีผลต่อหน้าที่ โครงสร้าง สมบัติทางกายภาพและเป้าหมายในการขนส่งของโปรตีน ตัวอย่างเช่น เพิ่มความเสถียรให้แก่โปรตีนโดยทนต่อการสลายหรือทนต่อการเสียสภาพ เปลี่ยนสมบัติการละลายโดยเพิ่มความหนืด ลดจุดเยือกแข็งเพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการละลาย เปลี่ยนลักษณะสำหรับจดจำ (recognition) ช่วยในการม้วน (folding) ของโปรตีน โดยโปรตีนบางชนิดจะไม่สามารถม้วนได้ ถ้าไม่มีการเติมหมู่แซคคาไรด์ นอกจากนี้ ยังพบว่ากระบวนการเติมคาร์โบไฮเดรตหรือไกลโคซิเลชัน (glycosylation) มีความจำเป็นในการติดต่อกันระหว่างเซลล์ (Sears and Wong, 1998)

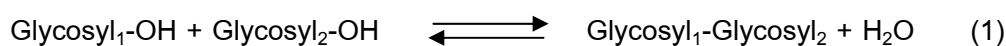
การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ มี 2 วิธี คือ (Flitsch, 2000)

1. การใช้วิธีทางเคมี (Chemical method) วิธีนี้ค่อนข้างมีข้อจำกัดหลายประการ คือ
 - 1.1 ขั้นตอนการสังเคราะห์จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อโอลิโกแซคคาไรด์มีขนาดใหญ่ขึ้น
 - 1.2 เมื่อต้องการสังเคราะห์ให้สารมีโครงสร้าง 3 มิติที่แน่นอน (regioselective synthesis) พบว่าขั้นตอนการติดหมู่พิเศษ ณ ตำแหน่งที่ไม่ต้องการเชื่อมพันธะ (protection) และการถอดหมู่พิเศษเหล่านั้นออก (deprotection) จะมีหลายขั้น
 - 1.3 การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ขนาดใหญ่จะให้ปริมาณผลผลิตสุดท้ายน้อย ทำให้การสังเคราะห์ระดับขนาดใหญ่เป็นไปได้ยาก
2. การใช้เอนไซม์ (Enzymatic method) วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการสังเคราะห์มากกว่า เนื่องจากไม่มีข้อจำกัดเหมือนการใช้วิธีทางเคมี วิธีการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์มี 2 ประเภทใหญ่ แบ่งตามชนิดของเอนไซม์ คือ การใช้เอนไซม์จำพวกไกลโคซิลทรานเฟอเรส (glycosyltransferase; EC 2.4) และการใช้เอนไซม์จำพวกไกลโคซิเดส (glycosidase; EC 3.2) แต่เนื่องจากเอนไซม์จำพวกไกลโคซิลทรานเฟอเรสจะใช้น้ำตาลชนิด nucleotide เป็นสารตั้งต้น ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ไม่เป็นที่นิยมในการใช้สังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ อีกทั้งในธรรมชาติ พบเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรสปริมาณต่ำมากและเอนไซม์เหล่านี้มักไม่เสถียร

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดส มี 2 วิธี คือ

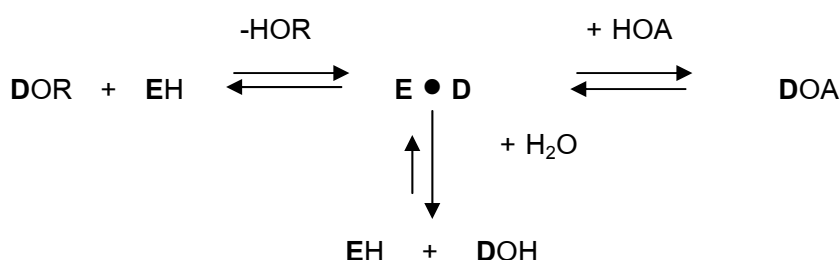
1. วิธีทางเทอร์โมไดนามิกส์หรือวิธีการควบคุมสมดุลของปฏิกิริยาหรือวิธีย้อนกลับของปฏิกิริยา (Thermodynamically-controlled synthesis หรือ equilibrium-controlled synthesis หรือ reverse hydrolysis) วิธีนี้ทำได้โดยการลดแอกทิวิตีของน้ำ (water activity) ลง ร่วมกับการเพิ่มอุณหภูมิในขณะที่ทำปฏิกิริยาหรือเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธีนี้จะมีสมการการดำเนินปฏิกิริยาดังนี้



2. วิธีการควบคุมทางจลนพลศาสตร์หรือวิธีการโยกย้ายหมู่ไกลโคไซด์ (Kinetically-controlled synthesis หรือ transglycosidation) วิธีนี้จะใช้สับสเตรทของคาร์โบไฮเดรตที่เชื่อมต่อกับหมู่ที่มีวงแหวนอะโรมาติก (aromatic) หรือหมู่อะลิเฟติก (aliphatic) เป็นตัวให้น้ำตาล (donor) ซึ่งเป็นสับสเตรทที่มีผลในการผลักดันให้เกิดปฏิกิริยาขึ้น การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธีทางเทอร์โมไดนามิกส์ คือ สารตั้งต้นไม่จำเพาะ และใช้เวลาน้อยกว่าในการเกิดปฏิกิริยาถ่ายทอดหมู่ไกลโคไซด์จากตัวให้ (donor) ไปยังตัวรับ (acceptor) ปฏิกิริยานี้จะสมบูรณ์และให้ผลผลิตสูงสุดหรือไม่ขึ้นอยู่กับความสมดุลของอัตราการสังเคราะห์ของตัวให้น้ำตาลและปฏิกิริยาการสลาย (hydrolysis) ของผลิตภัณฑ์

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธีนี้จะมีสมการการดำเนินปฏิกิริยาดังนี้



ปัจจัยที่มีผลต่อการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธีนี้ ได้แก่

- (1) ประสิทธิภาพของหมู่ให้ (leaving group)
- (2) อัตราส่วนของค่าทางจลนพลศาสตร์ของการสังเคราะห์ต่อการสลาย (kinetic synthesis / hydrolysis ratio)

- (3) ประสิทธิภาพของการโยกย้ายหมู่ไกลโคซิล (glycosyl transfer)
- (4) ความเข้มข้นของสารละลายหรือตัวทำละลาย (ถ้าใช้) ที่มีต่อแอกทิวิตีของเอนไซม์
- (5) ระบบของการทดลอง เป็นเฟสเดียวหรือสองเฟส (two-phase system)

การเลือกตัวให้น้ำตาลและตัวรับน้ำตาล (acceptor) มาใช้ในปฏิกิริยาเป็นสิ่งสำคัญ ดังนั้น ตัวให้น้ำตาลควรมีสมบัติที่สามารถทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว ทำให้เวลาในการดำเนินปฏิกิริยาถูกใช้ไปน้อย มีผลในการช่วยยับยั้งการสลายผลผลิต สำหรับตัวรับน้ำตาล พบว่าถ้าตัวรับน้ำตาลเป็นไกลโคไซด์ที่มีหมู่เอริล (aryl) หรือหมู่ไวนิล (vinyl) จะช่วยให้ผลผลิตได้ (yield) ของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น การใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวรับน้ำตาลเพื่อการผลิตอัลคิล-ไกลโคไซด์ พบว่าความยาวของคาร์บอนที่ใช้มีผลต่อผลผลิตได้ (yield) โดยหากใช้แอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยจะได้ผลผลิตดีกว่าแอลกอฮอล์ที่มีจำนวนคาร์บอนมาก ตัวอย่างเช่น การใช้เมทานอล (methanol) จะให้ผลผลิตถึง 81% แต่ถ้าใช้ 1-เฮปทานอล (1-heptanol) จะให้ผลผลิตเพียง 5% สำหรับผลของรูปร่างโครงสร้างต่อการเกิดปฏิกิริยา ยังไม่มีข้อสรุปที่แน่ชัด แต่ข้อมูลบางส่วนรายงานว่าปริมาณผลผลิตที่ได้ขึ้นกับความมีขั้วของตัวรับน้ำตาลมากกว่าขนาดของตัวรับ เนื่องจากไดออลแอลกอฮอล์ (diol-alcohol) มีแนวโน้มให้ปริมาณผลผลิตเทียบเท่ากับโมโนแอลกอฮอล์ (mono-alcohol) ที่มีจำนวนคาร์บอนเพียงครึ่งหนึ่ง

ความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสและการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ในสิ่งมีชีวิต

เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสมีความสามารถทั้งในการตัดและการต่อแมนโนสจึงมีประโยชน์ใช้ในการตรวจสอบพันธะของแมนโนสที่ถูกสลายจากโอลิโกแซคคาไรด์ (carbohydrate bioengineering) อีกทั้งใช้ในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ ที่มีแมนโนสเป็นองค์ประกอบ ไม่ว่าจะเป็นการสังเคราะห์ชนิดที่ใช้สับสเตรทสังเคราะห์หรือสับสเตรทธรรมชาติก็ตาม เช่น การสังเคราะห์สารให้ความหวานโดยการนำแมนโนสมาต่อกับสารอะไกลโคไซด์ชนิดต่างๆ หรือต่อกับสับสเตรทที่มีความจำเพาะของพันธะ ได้มีการค้นคว้าที่จะนำกลูโคส อัลฟา-แมนโนซิเดส II มาใช้ในการรักษามะเร็งด้วย (Elsen *et al.*, 2001)

ในปี 1997 Fujita และคณะได้ทำการทดลองด้วยวิธี site-directed mutagenesis ในยีนของอัลฟา 1,2- แมนโนซิเดส โดยทำการแทนที่กรดอะมิโนแอสพาเตทที่ตำแหน่ง 269 (Asp-269) ด้วยกรดอะมิโนกลูตาเมต ณ ตำแหน่งเดียวกัน (Glu-269) และแทนที่กรดอะมิโนกลูตาเมตที่ตำแหน่ง 273 (Glu-273), 411 (Glu-411), 414 (Glu-414) และ 474 (Glu-474) ด้วยกรดอะมิโนแอสพาเตท (Asp) ที่ตำแหน่ง 273, 411, 414, และ 474 ตามลำดับ พบว่าค่าแอกทิวิตีของ

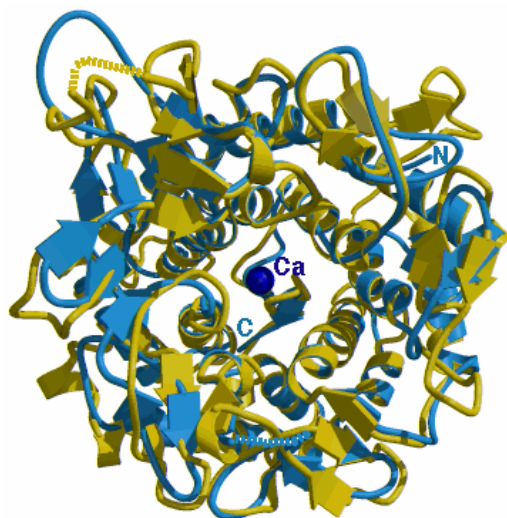
เอนไซม์ลดลงอย่างมาก และเกิดการเปลี่ยนแปลงค่า optimum pH นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาโครงสร้างของยีสต์เอนโด พลาสมิเกรติคิวลัม อัลฟา 1,2- แมนโนสซิเดส โดยใช้เทคนิคการตรวจผลึกด้วยเอ็กซ์เรย์ (x-ray crystallography) พบว่าเอนไซม์มีรูปร่างเป็นรูปถังเบียร์ทรงกระบอก (barrel) ข้างหนึ่งของถังต่อกับโครงสร้างปีต้า-แฮร์พิน (β -hairpin) ทำให้เกิดช่องขนาดประมาณ 15 อังสตรอม และมีไอออนของแคลเซียมอยู่เหนือส่วนของแฮร์พิน เมื่อตัดอะมิโนตัวที่ 367-371 ออกไปทำให้ส่วนของลูป (loop) สั้นขึ้น จึงสรุปได้ว่าการตกแต่งแมนโนสสามารถเกิดได้เฉพาะสับสเตรทหรือโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถเข้าไปในส่วนที่ทำหน้าที่ในการสลายซึ่งอยู่ลึกลงไปโครงสร้างของเอนไซม์รูปถังเบียร์ทรงกระบอก (Herscovics, 2001) ดังรูปที่ 4

การทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดสจำเป็นจะต้องเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิเพื่อให้เกิดส่วนของโดเมนต่างๆ ในการทำหน้าที่ เช่น โดเมนที่ทำหน้าที่ในการจับกับสับสเตรท และโดเมนที่ทำหน้าที่ในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น ในการปรับปรุงความสามารถของเอนไซม์พบว่าอาจทำได้โดยการเปลี่ยนโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้ความสามารถในการทำงานเปลี่ยนไป โดยอาจทำให้มีความจำเพาะมากขึ้น หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติบางอย่างดังตัวอย่างข้างต้น ซึ่งโครงสร้างทุติยภูมิของเอนไซม์นั้นก็เกิดจากการรวมตัวของโครงสร้างปฐมภูมิ นั่นก็คือลำดับกรดอะมิโน ดังนั้นการปรับปรุงความสามารถของเอนไซม์อาจทำได้เพียงเปลี่ยนลำดับกรดอะมิโนเท่านั้น

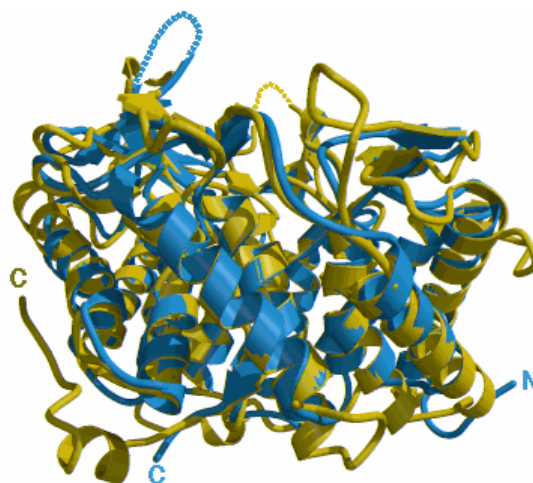
จากเหตุผลดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความจำเพาะต่อการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดส เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาในเรื่องดังกล่าว โดยได้ใช้เอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบแดงเป็นแม่แบบ (model) ในการศึกษา แต่เนื่องจากการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวจำเป็นต้องใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีปริมาณมากพอต่อการศึกษาหลายปฏิกิริยา แต่เอนไซม์ที่สกัดแยกได้มีปริมาณน้อยมากๆ และไม่เสถียร (unstable) ทำให้ไม่สามารถศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวตามวัตถุประสงค์ได้ ทำได้เพียงการศึกษาสมบัติทางกายภาพ จลนศาสตร์ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความจำเพาะต่อการสลายและการสังเคราะห์สับสเตรทของเอนไซม์แทน

รูปที่ 4 โครงสร้างของเอนไซม์เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม อัลฟา 1,2- แมนโนซิเดสจาก ยีสต์ ในมุมมองที่มองจากด้านบน (ก) และมองจากด้านข้าง (ข)

ก



ข



ที่มา: <http://bmbiris.bmb.uga.edu/moremen/ERManI/Structure/structure3.html> (21 กันยายน 2547)

วัตถุประสงค

เพื่อสืบค้นถึงความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความจำเพาะต่อการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

เนื่องจากการศึกษาความสัมพันธ์ที่ตั้งไว้ตามวัตถุประสงค จำเป็นต้องใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีปริมาณมากต่อการศึกษาหลายปฏิกิริยา แต่เอนไซม์ที่สกัดแยกได้มีปริมาณน้อยมากๆ และไม่เสถียร (unstable) ทำให้ไม่สามารถศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวตามวัตถุประสงคได้ ทำได้เพียงการศึกษาสมบัติทางกายภาพ จลนศาสตร์ และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความจำเพาะต่อการสลายและการสังเคราะห์สับสเตรทของเอนไซม์แทน

วิธีการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดสารสกัดดิบ (crude extract) จากเมล็ดกระเจี๊ยบแดง

1. นำเมล็ดกระเจี๊ยบแดงที่แช่น้ำเป็นเวลา 2 วัน ล้างให้สะอาดด้วยน้ำยาคลอรีน (0.01% hypochlorite) และน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง
2. นำเมล็ดกระเจี๊ยบแดงบดผสมกับ 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 ที่ประกอบด้วย 1 มิลลิโมลาร์ของสาร phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) และ 5 เปอร์เซ็นต์ ของ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักเมล็ด 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นเอากากออก
3. นำสารละลายที่เหลือไปปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็วสูงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. สารละลายส่วนใสที่ได้นำไปกวนกับ 8 เปอร์เซ็นต์ Dowex 2x8 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกรองเอา Dowex 2x8 ออก
5. นำสารละลายที่เหลือไปปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็วสูงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. สารละลายส่วนใสที่ได้ในขั้นตอนนี้จะเรียกว่าสารสกัดดิบ (crude extract)
7. ตรวจสอบเอกลักษณ์ของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนจากสารสกัดดิบที่สกัดได้

ขั้นตอนที่ 2 การแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส (α -mannosidase) ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนย่อยที่ 2.1 การตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตแบบแยกลำดับส่วน (ammonium sulfate fractionation)

1. เติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟตลงในสารสกัดดิบที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 1 โดยให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 30 เปอร์เซ็นต์
2. นำสารละลายสารสกัดดิบที่ได้จากข้อ 1 ไปปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็วสูงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ปั่นแยกได้มาเติมผลึกแอมโมเนียมซัลเฟต โดยให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เริ่มจาก 30 เปอร์เซ็นต์ เป็น 80 เปอร์เซ็นต์
3. นำสารละลายเอนไซม์ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตจากข้อ 3 ไปปั่น (centrifuge) ด้วยความเร็วสูงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้เก็บไว้ และเรียกว่าตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต 30-80 เปอร์เซ็นต์ (Am-30-80%)
4. ละลายตะกอน Am-30-80% ด้วย 0.2 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 ให้พอดี

5. ตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนจากสารละลายตะกอน แอมโมเนียมซัลเฟตที่ละลายได้

ขั้นตอนย่อยที่ 2.2 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วนด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุบวก (anion-exchange chromatography)

1. นำสารละลายตะกอน Am-30-80% ที่ละลายด้วย 0.2 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 ไปไดอะไลซ์ (dialyze) ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 และปั่นแยกเอาตะกอนเล็กๆ ออก ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. นำส่วนใสที่ได้ลงในคอลัมน์ DEAE-52 cellulose (ขนาดคอลัมน์ประมาณ 80 มิลลิลิตร) ที่อีควิลิเบรต (equilibrate) เรียบร้อยแล้วด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 โดยเก็บตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์ (fraction) หลอดละ 5 มิลลิลิตร และใช้อัตราเร็วของสารชะ (flow rate) เท่ากับ 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3. ทำการชะโปรตีนชนิดต่าง ๆ ทั้งโปรตีนชนิดไม่ตรึง (unbound protein) และโปรตีนชนิดตรึง (bound protein) ออกจากคอลัมน์ด้วยสภาวะ ดังนี้

3.1 ชะโปรตีนชนิดไม่ตรึงออกจากคอลัมน์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 ด้วยปริมาตรเป็น 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้ (10 column volume)

3.2 ชะโปรตีนชนิดตรึงและเอนไซม์แบบ linear gradient ด้วยส่วนผสมของ 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จาก 0 โมลาร์ ไปยัง 0.3 โมลาร์ ด้วยปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

3.3 ชะโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ผสมกับ 0.3 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 7.7 ด้วยปริมาตรเป็น 5 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

4. นำตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์แต่ละหลอดทำการหาปริมาณโปรตีน หาปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส และค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

5. รวมตัวอย่างที่ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสในปริมาณสูงพอประมาณ (DE-pool)

ขั้นตอนย่อยที่ 2.3 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วนด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุลบ (cation-exchange chromatography)

1. นำตัวอย่างที่เก็บได้จากขั้นตอนย่อยที่ 2.2 ข้อที่ 5 (DE-pool) ไปไดอะไลซ์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) และปั่นแยกเอาตะกอนเล็กๆ ออก ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. นำส่วนใสที่ได้ลงในคอลัมน์ CM-52 cellulose (ขนาดคอลัมน์ประมาณ 30 มิลลิลิตร) ที่อีควิลิเบรตด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ โดยเก็บตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร และใช้อัตราเร็วของสารชะเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3. ทำการชะโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากคอลัมน์ด้วยสภาวะ ดังนี้

3.1 ชะโปรตีนชนิดไม่ตรึงออกจากคอลัมน์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ ด้วยปริมาตรเป็น 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

3.2 ชะโปรตีนชนิดตรึงและเอนไซม์แบบ linear gradient ด้วยส่วนผสมของ 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ และมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จาก 0 โมลาร์ ไปยัง 0.3 โมลาร์ ด้วยปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

3.3 ชะโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ และ 0.3 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 4.4 ด้วยปริมาตรเป็น 5 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

4. นำตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์แต่ละหลอดทำการหาปริมาณโปรตีน หาปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส และค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์

5. รวมตัวอย่างที่ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสในปริมาณสูงพอประมาณ (CM-pool)

ขั้นตอนย่อยที่ 2.4 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (hydroxyapatite chromatography)

1. นำตัวอย่างที่เก็บได้จากขั้นตอนย่อยที่ 2.3 ข้อที่ 5 (CM-pool) ไปไดอะไลซ์ด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 และปั่นแยกเอาตะกอนเล็กๆ ออก ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. นำตัวอย่างที่ได้ ลงในคอลัมน์ไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (HTP; ขนาดคอลัมน์ประมาณ 15 มิลลิลิตร) ที่อีควิลิเบรตด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 เก็บตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร และใช้อัตราเร็วของสารชะเท่ากับ 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3. ทำการชะโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากคอลัมน์ด้วยสภาวะ ดังนี้

3.1 ชะโปรตีนชนิดไม่ตรึงออกจากคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 ด้วยปริมาตรเป็น 5 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

3.2 ชะโปรตีนชนิดตรึงและเอนไซม์แบบ linear gradient ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 จากความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ไปยัง 0.2 โมลาร์ ด้วยปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

3.3 โซเดียมโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ด้วย 0.2 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.7 ด้วยปริมาตรเป็น 5 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

4. นำตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอดทำการหาปริมาณโปรตีน หาปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส และค่าความเข้มข้นของฟอสเฟต

5. รวมตัวอย่างที่ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส (HTP-pool) ได้ 3 ส่วน ส่วนที่ 1 ใช้ในการทดสอบการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนที่ 2 และ 3 นำไปแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป

ขั้นตอนย่อยที่ 2.5 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (gel filtration)

1. นำ HTP-pool ที่ได้จากขั้นตอนย่อยที่ 2.4 ข้อที่ 5 ส่วนที่ 2 และ 3 ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) และใช้เมมเบรน (membrane) ที่คัตขนาดโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight cut-off) เท่ากับ 10,000 (PM-10; Amicon)

2. นำ HTP-pool ส่วนที่ 2 ไปลงในคอลัมน์เซฟาคริลเอชอาร์เอส-300 (Sephacryl HR S-300; ขนาดคอลัมน์ประมาณ 160 มิลลิลิตร) สำหรับ HTP-pool ส่วนที่ 3 นำไปลงในคอลัมน์เซฟาคริลเอชอาร์เอส-200 (Sephacryl HR S-200; ขนาดคอลัมน์ประมาณ 160 มิลลิลิตร) ทั้ง 2 คอลัมน์ถูกอีควิลิเบรตด้วย 0.05 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มี 0.15 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 7.7 เก็บตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์ทั้ง 2 ชนิดโดยเก็บหลอดที่ 1 ถึง 8 หลอดละ 5 มิลลิลิตร สำหรับหลอดต่อไปเก็บหลอดละ 1 มิลลิลิตร และใช้อัตราเร็วของสารชะเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3. นำตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอด หาปริมาณโปรตีนและหาปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

4. รวมตัวอย่างที่ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส เรียกว่า Sephacryl HR S-300-pool และ Sephacryl HR S-200-pool ตามลำดับ

ขั้นตอนย่อยที่ 2.6 การแยกไอโซไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีทางโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน ชนิดเรซินเป็นประจุลบ (cation-exchange chromatography)

1. นำตัวอย่างที่เก็บได้จากขั้นตอนย่อยที่ 2.5 ข้อที่ 5 (Sephacryl HR S-300-pool) ไปไดอะไลซ์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ และปั่นแยกเอาตะกอนเล็กๆ ออก ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2. นำส่วนใสที่ได้ลงในคอลัมน์ CM-52 cellulose (ขนาดคอลัมน์ประมาณ 5 มิลลิลิตร) ที่อีควิลิเบรตด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์

คลอไรด์ โดยเก็บตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และใช้อัตราเร็วของสารชะเท่ากับ 12 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

3. ทำการชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วยสภาวะ ดังนี้

3.1 เริ่มต้น ชะด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.4 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ ด้วยปริมาตรเป็น 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

3.2 ต่อมา ชะแบบ step gradient ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ เริ่มตั้งแต่ พีเอช 4.6, 4.8 และ 5.0 ด้วยปริมาตรบัฟเฟอร์เป็น 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้ (ค่าพีเอชห่างกัน 0.2 หน่วย)

3.3 ทำยสุด ชะโปรตีนที่หลงเหลืออยู่ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ และ 0.3 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 5.0 ด้วยปริมาตรเป็น 10 เท่าของปริมาตรของเจลที่ใช้

4. นำตัวอย่างที่ได้แต่ละหลอดทำการหาปริมาณโปรตีน หาปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส และวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

5. รวมตัวอย่างที่ประกอบด้วยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส (CM pH gradient-pool)

หมายเหตุ ทุกขั้นตอน ถ้ามีได้กล่าวไว้เป็นอย่างอื่น

(1) ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(2) หาปริมาณโปรตีน ด้วยการวัดค่าการดูดแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

(A_{280})

(3) หาปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในขั้นตอนที่ 3

(4) หาค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือฟอสเฟต โดยใช้เครื่องวัดค่า

conductivity (conductivity meter)

ขั้นตอนที่ 3 การตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสและเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดอื่น

ตรวจสอบแอกทิวิตีของเอนไซม์โดยใช้พารา-ไนโตรเฟนิลไกลโคไซด์ (*p*-nitrophenylglycoside) เป็นสับสเตรท ด้วยการนำเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มกับ 10 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรเฟนิลไกลโคไซด์ ถ้าต้องการหาแอกทิวิตีของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส ก็ใช้พารา-ไนโตรเฟนิล-อัลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์ (*p*-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside; *p*NP- α -D-Man) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ พารา-ไนโตรฟีโนล (*p*-nitrophenol) ที่ความยาว

คลื่น 400 นาโนเมตร และหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ พารา-ไนโตรฟีนอล (Montreuil *et al.*, 1994)

กำหนด เอนไซม์ 1 หน่วยเอนไซม์ (unit) เป็นปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการสลาย สับสเตรทพารา-ไนโตรฟีนอลไกลโคไซด์แล้วได้ผลิตภัณฑ์พารา-ไนโตรฟีนอลจำนวน 1 ไมโคร โมลต่อมิลลิลิตร ต่อหน่วยเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและพีเอช 5.0

ขั้นตอนที่ 4 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

ตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยวิธีการตรึงโปรตีนด้วยสีย้อม (dye-binding assay) โดย เติมน้ำยาที่เตรียมด้วยสีย้อมชนิดคูแมสซีบลูจี-250 (coomassie blue G-250; Bradford, 1976) 1.0 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที และทำการวัดค่าการดูดแสงที่ความ ยาวคลื่น 595 นาโนเมตร และหาปริมาณโปรตีนของตัวอย่างโดยเทียบจากกราฟมาตรฐาน ของอัลบูมินจากซีรัมวัว (bovine serum albumin)

ขั้นตอนที่ 5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส (α -mannosidase)

ขั้นตอนย่อยที่ 5.1 วิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเสียสภาพธรรมชาติ (denaturing gel electrophoresis; sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis หรือ SDS-PAGE; Laemmli, 1970)

1. ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 (crude enzyme) และขั้นตอนที่ 2 (ได้แก่ Am-30-80%, DE-pool, CM-pool, HTP-pool, Sephacryl HR S-300 pool, Sephacryl HR S-200-pool และ CM pH gradient-pool) ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบเสียสภาพธรรมชาติ โดยใช้แผ่นเจลที่ประกอบด้วย 4 เปอร์เซ็นต์ของ stacking gel (80 x 20 x 0.75 มิลลิเมตร) ที่อยู่ใน 0.125 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 6.8 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ SDS และ 7.5 เปอร์เซ็นต์ของ separating gel (80 x 60 x 0.75 มิลลิเมตร) ที่ อยู่ใน 0.375 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 8.8 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ SDS และผ่าน กระแสไฟลงแผ่นเจลที่อยู่ในอ่างบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ทริส - 0.192 โมลาร์ ไกลซีน พีเอช 8.3 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ SDS ด้วยค่าความต่างศักย์คงที่ ที่ 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที หรือจนกระทั่งเห็นแถบสีของสีย้อม (dye) ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 0.5 ซม.

2. ทำการตรวจสอบแถบโปรตีนที่แยกได้โดยนำแผ่นเจลแช่ลงในสารผสมของคูแมส ซีบลูอาร์-250 (coomassie blue R-250) ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ของคูแมสซีบลูอาร์-250 ใน 40 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล และ 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก

3. เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง และหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อย (subunit) ของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่หาคำควบคู่กับตัวอย่างเอนไซม์

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นโปรตีนที่รู้ค่าน้ำหนักโมเลกุลในรูปเสียดภาพธรรมชาติ คือ rabbit muscle myosin น้ำหนักโมเลกุล 212,000, *E.coli* maltose-binding protein- β -galactosidase น้ำหนักโมเลกุล 158,194, *E.coli* β -galactosidase น้ำหนักโมเลกุล 116,351, rabbit muscle phosphorylase *b* น้ำหนักโมเลกุล 97,184, อัลบูมินจากซีรัมวัว น้ำหนักโมเลกุล 66,409, glutamic dehydrogenase จากตับวัว น้ำหนักโมเลกุล 55,561, *E.coli* maltose-binding protein 2 (MBP 2) น้ำหนักโมเลกุล 42,710, lactate dehydrogenase M จากกล้ามเนื้อหมู น้ำหนักโมเลกุล 36,487 และ triosephosphate isomerase จากกล้ามเนื้อกระต่าย น้ำหนักโมเลกุล 26,625

ขั้นตอนย่อยที่ 5.2 วิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ (non-denaturing gel electrophoresis หรือ ND gel; Ornstein and Davis, 1964)

1. นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 (crude enzyme) และขั้นตอนที่ 2 (ได้แก่ Am-30-80%, DE-pool, CM-pool, HTP-pool, Sephacryl HR S-300 pool, Sephacryl HR S-200-pool และ CM pH gradient-pool) ไปตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ โดยใช้แผ่นเจลที่ประกอบด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ของ stacking gel (80 x 20 x 0.75 มิลลิเมตร) ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ 0.125 โมลาร์ ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 6.8 และ 5 เปอร์เซ็นต์ของ separating gel (80 x 60 x 0.75 มิลลิเมตร) ที่อยู่ในบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ทริส - 0.192 โมลาร์ ไกลซีน พีเอช 8.3 และผ่านกระแสไฟลงแผ่นเจลที่อยู่ในอ่างบัฟเฟอร์ 0.025 โมลาร์ ทริส - 0.192 โมลาร์ ไกลซีน พีเอช 8.3 ด้วยค่าความต่างศักย์คงที่ที่ 150 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 50 นาที หรือจนกระทั่งเห็นแถบสีของสีย้อม (dye) ห่างจากขอบเจลด้านล่างประมาณ 0.5 ซม. ในห้องเย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

2. ทำการตรวจสอบแถบโปรตีนที่แยกได้โดยนำแผ่นเจลแช่ลงในสารผสมของคูแมสซีบลูอาร์-250 (coomassie blue R-250) ที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ของคูแมสซีบลูอาร์-250 ใน 40 เปอร์เซ็นต์ เมทานอล และ 10 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก และตรวจตำแหน่งของเอนไซม์โดยการบ่มเจลกับ 1 มิลลิโมลาร์ ของ 4-เมทิลลัมเบลลิเฟอริล-อัลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์ (4-methylumbelliferyl- α -D-mannopyranoside; 4-Met- α -D-Man) ที่เตรียมใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปส่องภายใต้แสงอัลตรา-ไวโอเลต บันทึกผลโดยการถ่ายรูปเก็บไว้

3. เปรียบเทียบตำแหน่งของโปรตีนและเอนไซม์ที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 6 การตรวจสอบค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) หรือค่าพีไอ (pI) ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

ใช้ไอโซอิเล็กทริกโพรโทคัสซิงเจล (isoelectrofocussing gel หรือ IEF gel) ตามวิธีการของ Biorad แต่มีการดัดแปลงเล็กน้อย ดังนี้

1. นำตัวอย่าง Sephacryl HR S-300 pool และ CM pH gradient-pool ไปแยกด้วยวิธี ไอโซอิเล็กทริกโพรโทคัสซิงเจล โดยใช้แผ่นเจล (125 x 65 x 0.05 มิลลิเมตร) ที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ของอะกาโรส, 5 เปอร์เซ็นต์ของซอร์บิทอล, 10 เปอร์เซ็นต์ของกลีเซอรอล และ 2 เปอร์เซ็นต์ของแอมโฟไลท์ (ampholyte) โดยใช้ Ampholine (Pharmacia, Amersham Bioscience) ที่มีค่าความต่างของพีเอชตั้งแต่ 3-10 ด้วยความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Ampholine ที่มีค่าความต่างของพีเอชตั้งแต่ 4-6 ด้วยความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และผ่านกระแสไฟลงแผ่นเจลที่วางอยู่ในห้องเย็นด้วยค่าความต่างศักย์คงที่ ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยค่าความต่างศักย์ 200 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที และ 450 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งค่ามิลลิแอมแปร์คงที่

2. ทำการตรวจสอบแถบโปรตีนที่แยกได้โดยนำแผ่นเจลแช่ลงในสารผสมของคูแมส ซีบลูอาร์-250 ตามวิธีการของ BioRad โดยตรึงโปรตีนบนแผ่นเจลด้วย fixative solution (เตรียมโดยผสม 30 เปอร์เซ็นต์ของเมทานอล, 5 เปอร์เซ็นต์ของกรดไตรคลอโรอะซีติก และ 3.5 เปอร์เซ็นต์ของกรดซัลโฟซาลิไซลิก (sulfosalicylic acid) เข้าด้วยกัน) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล เป็นเวลา 30 นาที เพื่อลบแบ็คกราวนด์ (background) ของแผ่นเจล แล้วนำกระดาษกรองที่ชุบเอทานอลปิดแผ่นเจลไว้และวางหนังสือ น้ำหนักประมาณ 1 กิโลกรัม ทับแผ่นเจลไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นเจลแห้งที่ได้ไปแช่ในสารผสมของ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของคูแมสซีบลูอาร์-250 ที่เตรียมใน 28 เปอร์เซ็นต์ของไอโซโพรพานอล และ 14 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะซีติก เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้างสีย้อมส่วนเกินด้วย น้ำยา destaining solution (เตรียมโดยผสม 28 เปอร์เซ็นต์ของไอโซโพรพานอล และ 14 เปอร์เซ็นต์ของกรดอะซีติก) เป็นเวลา 30 นาที

3. ทำการตรวจสอบตำแหน่งของเอนไซม์โดยการบ่มแผ่นเจลกับ 1 มิลลิโมลาร์ ของ 4-Met- α -D-Man ที่เตรียมใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปส่องภายใต้แสงอัลตรา-ไวโอเลต นำเข็มฉีดยากดจุดตำแหน่งของเอนไซม์ไว้เพื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งของโปรตีนมาตรฐาน แล้วบันทึกผลโดยการถ่ายรูปเก็บไว้

4. เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง และหาค่าพีไอ (pI) ของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานที่รู้ค่าพีไอที่แน่นอน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานที่รู้ค่าพีไอแน่นอนซึ่งมีค่าพีไอตั้งแต่ 3.50 จนถึง 9.30 ดังนี้ amyloglucosidase มีค่าพีไอ 3.50, soybean trypsin inhibitor มีค่าพีไอ 4.55, β -lactoglobulin A มีค่าพีไอ 5.20, bovine carbonic anhydrase B มีค่าพีไอ 5.85, human

carbonic anhydrase B มีค่าพีไอ 6.55, horse myoglobin-acidic band มีค่าพีไอ 6.85, horse myoglobin-basic band มีค่าพีไอ 7.35, lentil lectin-acidic band มีค่าพีไอ 8.15, lentil lectin-middle band มีค่าพีไอ 8.45, lentil lectin-basic band มีค่าพีไอ 8.65 และ trypsinogen มีค่าพีไอ 9.30

ขั้นตอนที่ 7 การหาพีเอชที่เหมาะสม (optimal pH) ต่อการทำงานของเอนไซม์ อัลฟา-แมนโนสซิเดส

นำตัวอย่าง CM pH gradient-pool ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มกับ 10 มิลลิโมลาร์ของ pNP-a-D-Man ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และแมคคิลเวนบัฟเฟอร์ (McIlvaine buffer) ที่มีค่าพีเอช ตั้งแต่ 3.0-9.5 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ พารา-ไนโตรฟีนอล ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร (A_{400}) และหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล คำนวณหาค่าหน่วยของเอนไซม์ต่อ 1 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 8 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal temperature) ต่อการทำงานของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดส

นำตัวอย่าง CM pH gradient-pool ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มกับ 10 มิลลิโมลาร์ของ pNP-a-D-Man ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 จนถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ พารา-ไนโตรฟีนอล ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร (A_{400}) และหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล คำนวณหาค่าหน่วยของเอนไซม์ต่อ 1 มิลลิลิตร

ขั้นตอนที่ 9 การหาค่าคงที่ของไมเคิลลิส (K_m) และอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}) ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดส

สำหรับสับสเตรทชนิดสังเคราะห์ (synthetic substrate) ได้นำตัวอย่าง CM pH gradient-pool ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บ่มกับ pNP-a-D-Man ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0390625 จนถึง 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และ 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ทำการวัดค่าการดูดแสงของผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ พารา-ไนโตรฟีนอล ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร และหาปริมาณของผลิตภัณฑ์ดังกล่าวต่อเวลาและต่อมิลลิลิตร โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล

และสร้างกราฟไมเคิลลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten) โดยใช้ค่า v_o (หาได้จากปริมาณของ ผลิตภัณฑ์พารา-ไนโตรฟีนอลต่อหน่วยเวลาและต่อมิลลิลิตรที่คำนวณได้) และ $[S_o]$ (หาได้จากค่า ความเข้มข้นของพารา-ไนโตรฟีนอล-อัลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์ที่ใช้บ่มกับเอนไซม์) และ สร้างเส้นกราฟไลน์วีเวอร์เบอร์ค (Line-Weaver Burk plot) โดยใช้ค่า $1/v_o$ และ $1/[S_o]$ หาค่า K_m และ V_{max} จากกราฟทั้ง 2

ขั้นตอนที่ 10 การหาชนิดไอออนของโลหะที่ช่วยในการคงความเสถียร (stability) ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

นำตัวอย่าง HTP-pool ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4 ข้อย่อยที่ 5 ไปไดอะไลซ์เป็นเวลา 1 คืน ในบัฟเฟอร์ 4 ชนิดคือ

- (1) 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0
- (2) 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ เอธิลีนไดเอมีนเตตระอะซีติกแอซิด (ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA)
- (3) 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0
- (4) 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มี 1 มิลลิโมลาร์ EDTA

จากนั้น นำตัวอย่างที่ได้ทดสอบหาเอกลักษณ์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส ถ้าตัวอย่างไหนไม่มีเอกลักษณ์ของเอนไซม์ ก็นำตัวอย่างดังกล่าวบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กับบัฟเฟอร์ชนิดนั้นๆ แต่ไม่มี EDTA ผสมอยู่ โดยมี (1) 1 มิลลิโมลาร์ ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) (2) 1 มิลลิโมลาร์ โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) หรือ (3) 1 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) แล้วทำการหาเอกลักษณ์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสอีกครั้ง

ขั้นตอนที่ 11 การทดสอบสมบัติการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส

นำตัวอย่าง HTP-pool มาทดสอบสมบัติการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ดังนี้

ขั้นตอนย่อยที่ 11.1 การทดสอบหาพีเอชที่เหมาะสม (optimal pH) ต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์

นำตัวอย่าง HTP-pool จำนวน 5 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร บ่มกับแมนโนส (mannose) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 20 มิลลิโมลาร์ของบัฟเฟอร์ โดยมีปริมาตรสุดท้าย 0.3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3, 7 และ 10 วัน หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (thin-layer chromatography) ดังขั้นตอนที่ 12

บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดสอบคือ (1) โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 (2) โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 (3) โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 (4) โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 (5) ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 8.0 (6) ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอช 9.0 และ (7) ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอช 10.0

ขั้นตอนย่อยที่ 11.2 การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal temperature) ต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์

นำตัวอย่าง HTP-pool จำนวน 5 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร บ่มกับแมนโนสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 โดยมีปริมาตรสุดท้าย 0.3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3, 7 และ 10 วัน หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (thin-layer chromatography) ดังขั้นตอนที่ 12

ขั้นตอนย่อยที่ 11.3 การสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมด้วยน้ำตาลแมนโนส

นำตัวอย่าง HTP-pool จำนวน 10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร บ่มกับแมนโนสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ และ 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 โดยมีปริมาตรสุดท้าย 0.3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 7 วัน หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (thin-layer chromatography) ดังขั้นตอนที่ 12

ขั้นตอนย่อยที่ 11.4 การสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมด้วยน้ำตาลแมนโนสและโมโนแซคคาไรด์ชนิดอื่น

นำตัวอย่าง HTP-pool จำนวน 10 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กับแมนโนสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ และโมโนแซคคาไรด์ชนิดอื่น ได้แก่ (1) 40 เปอร์เซ็นต์ ไซโลส (xylose) (2) 40 เปอร์เซ็นต์ กาแลกโตส (galactose) (3) 40 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส (glucose) และ (4) 40 เปอร์เซ็นต์ อะราบินอส (arabinose) ใน 20 มิลลิโมลาร์ โซเดียมอะซีเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 โดยมีปริมาตรสุดท้าย 0.3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 และ 7 วัน หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (thin-layer chromatography) ดังขั้นตอนที่ 12

ขั้นตอนที่ 12 การวิเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ (thin-layer chromatography, TLC)

นำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์จากขั้นตอนที่ 11 มาวิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ ด้วยการจุดสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบพร้อมกับสารมาตรฐานลงบนแผ่นเคลือบ (Kieselgel 60, Merck) แล้วนำแผ่นเคลือบไปแช่ลงในอ่างแก้ว (TLC tank) ที่มีสารผสมของ 2-โพรพานอล บิวทานอล และ กรดแลกติก ในอัตราส่วน 3 : 1 : 1 เมื่อระดับของสารขึ้นถึงเกือบสุดแผ่น นำแผ่นเคลือบไปอบแห้งและไปตรวจจุดของน้ำตาลแต่ละชนิดโดยการพ่นละอองของกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เตรียมในเอทานอลและอบที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกตจุดของน้ำตาลที่เกิดขึ้น ทำการวัดค่าระดับสีเทา-ดำ (grey scale) ณ ตำแหน่งกึ่งกลางของจุดน้ำตาล แล้วนำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้แมนโนไบโอสชนิดเชื่อมต่อด้วยพันธะ $\alpha(1-3)$ หรือ $\text{Man}\alpha(1-3)\text{Man}$ เป็นสารมาตรฐาน

สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ (1) แมนโนไบโอสชนิดเชื่อมต่อด้วยพันธะ $\alpha(1-2)$ หรือ $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$ (2) แมนโนไบโอสชนิดเชื่อมต่อด้วยพันธะ $\alpha(1-3)$ หรือ $\text{Man}\alpha(1-3)\text{Man}$ (3) แมนโนไบโอสชนิดเชื่อมต่อด้วยพันธะ $\alpha(1-4)$ หรือ $\text{Man}\alpha(1-4)\text{Man}$ (4) แมนโนไบโอสชนิดเชื่อมต่อด้วยพันธะ $\alpha(1-6)$ หรือ $\text{Man}\alpha(1-6)\text{Man}$ (5) แมนโนส (6) โซโลส (7) กลูโคส (8) กาแลกโตส และ (9) อะราบิโนส

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การสกัดและแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสให้บริสุทธิ์จากเมล็ดกระเจี๊ยบแดงและสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์

จากการนำตัวอย่าง HTP-pool ของเอนไซม์ไปไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ที่มีและไม่มี EDTA และบ่มสารตัวอย่างที่ไม่มีแอกทิวิตีด้วยไอออนของโลหะ 3 ชนิดคือ Zn^{2+} , Ca^{2+} และ Co^{2+} พบว่าได้ค่าแอกทิวิตีของตัวอย่างเอนไซม์ดังตารางที่ 1 ทำให้สรุปได้ว่าเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสต้องการ Zn^{2+} ช่วยในการคงเสถียรภาพ (stability) แอกทิวิตีของเอนไซม์เมื่อเอนไซม์อยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชเป็นกรด ผู้วิจัยจึงได้เติม $ZnCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ลงในบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชน้อยกว่า 7.0 แต่สำหรับบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 7.0 หรือมากกว่า มิได้เติม

ผู้วิจัยได้สกัดและแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนแบบแยกลำดับส่วนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 30-80% (Am 30-80%) และผ่านโครมาโทกราฟีชนิดต่างๆ ได้แก่ โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุบวก (anion-exchange chromatography, DEAE-52 cellulose), โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุลบ (cation-exchange chromatography, CM-52 cellulose), โครมาโทกราฟีแบบไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (hydroxyapatite chromatography, HTP Biogel), โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) โดยใช้เจลชนิด Sephacryl HR S-200 และ Sephacryl HR S-300 และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุลบ (cation-exchange chromatography, CM-52 cellulose) ได้ค่า specific activity และ purification fold แสดงในตารางที่ 2

เมื่อนำสารสกัดดิบของเมล็ดกระเจี๊ยบแดงผ่านขั้นตอนต่างๆ ตั้งแต่การตกตะกอนแบบแยกลำดับส่วนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจนกระทั่งถึงโครมาโทกราฟีแบบไฮดรอกซีแอปพาไทต์ ตัวอย่างในขั้นตอนนี้จะปราศจากเอนไซม์ไกลโคซิเดส 4 ชนิดที่มีปริมาณสูงในสารสกัดดิบ ได้แก่ เอนไซม์บีต้า-เอ็น-อะเซทิล-ดี-กลูโคซามินิเดส (β -N-acetyl-D-glucosaminidase) เอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) เอนไซม์บีต้า-กาแลกโตซิเดส (β -galactosidase) เอนไซม์อัลฟา-กาแลกโตซิเดส (α -galactosidase) โดยเฉพาะเอนไซม์บีต้า-เอ็น-อะเซทิล-ดี-กลูโคซามินิเดส ซึ่งแยกด้วยวิธีการอื่นๆ ได้ยากนอกจากวิธีการนี้ อาจเป็นเพราะเอนไซม์นี้มีสมบัติที่คล้ายกับเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสมาก นอกจากนี้สารสกัดดิบที่สกัดได้มีปริมาณของเอนไซม์บีต้า-ดี-แมนโนซิเดส (β -D-mannosidase) ปนเปื้อนน้อยมาก เมื่อผ่านถึงขั้นตอนโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนในขั้นตอนที่ 2 (CM-cellulose) พบว่าไม่มีการปนเปื้อน

เลย ตัวอย่างเอนไซม์จากโครมาโทกราฟีแบบไฮดรอกซีแอมป์ไฮโดรเจนจะเหมาะที่จะนำไปศึกษาสมบัติของการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ เนื่องจากตรวจพบว่าไม่มีการปนเปื้อนของเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดอื่นๆ ผู้วิจัยจึงได้แบ่งตัวอย่างเอนไซม์ออกเป็น 3 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ที่มีปริมาณเอนไซม์มากที่สุด ถึงแม้จะไม่ใช่ว่าเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แต่มีค่า specific activity และ purification fold อยู่ในเกณฑ์ดีเพียงพอที่จะนำไปศึกษาสมบัติการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ได้ สำหรับส่วนที่ 2 และ 3 ผู้วิจัยได้นำเอนไซม์ไปแยกให้บริสุทธิ์ต่อด้วยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน โดยใช้คอลัมน์ 2 ชนิด คือ เซฟาคริลเอชอาร์เอส-200 (Sephacryl HR S-200) และเซฟาคริลเอชอาร์เอส-300 (Sephacryl HR S-300) ซึ่งคัดขนาดโมเลกุลของโปรตีนได้ต่างกัน พบว่าค่า specific activity ของตัวอย่างที่ได้จากคอลัมน์เซฟาคริลเอชอาร์เอส-200 มีค่าลดลง เมื่อเทียบกับตัวอย่าง HTP-pool III เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่ได้มีค่าลดลง ขณะที่ปริมาณโปรตีนที่ได้แทบไม่ต่างจากตัวอย่าง HTP-pool III ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอลัมน์เซฟาคริลเอชอาร์เอส-200 ไม่สามารถแยกโปรตีนปนเปื้อนที่เหลือในขั้นตอนนี้ได้ ผู้วิจัยจึงได้นำตัวอย่างจากขั้นตอนดังกล่าวนี้ไปผ่านเซฟาคริลเอชอาร์เอส-300 อีกครั้ง (HR S-200 – S-300) พบว่าได้ค่า specific activity และ purification fold ใกล้เคียงกับตัวอย่าง HTP-pool II ที่นำไปผ่านเซฟาคริลเอชอาร์เอส-300 (ดูค่าจากตัวอย่าง HR S-300) เมื่อนำตัวอย่าง HR S-200 – S-300 ดังกล่าวไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเสียสภาพธรรมชาติ (SDS-PAGE) พบว่า ได้แถบโปรตีน 2 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 69,600 และ 56,600 ดาลตัน (รูปที่ 5)

นอกจากนี้ เมื่อนำตัวอย่างสารสกัดดิบ Am 30-80%, DE-pool, CM-pool, HTP-pool (I, II และ III) และ HR S-300 ตรวจสอบแถบเอนไซม์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบสภาพธรรมชาติ (non-denaturing gel) และบ่มใน 1 มิลลิโมลาร์ 4-เมทิลอัมเบลลิเฟอรอล-อัลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์ (4-methylumbelliferyl- α -D-mannopyranoside) พร้อมตรวจแถบสว่างของตัวอย่างภายใต้แสงอัลตรา-ไวโอเลต และเทียบกับแถบโปรตีนที่ถูกตรึงด้วยคิวแมสซีบลูอาร์-250 (รูปที่ 7 ก และ ข) พบว่าทุกตัวอย่างมีแถบสว่าง 2 ตำแหน่ง โดยจะเห็นแถบสว่างอันบนได้จางๆ แต่จะเห็นได้ชัดเจนที่สุดทั้ง 2 แถบสำหรับตัวอย่าง HR S-300 แสดงว่าเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่แยกได้ประกอบด้วย 2 ไอโซไซม์ และเมื่อนำตัวอย่าง HR S-200 – S-300 ไปผ่านโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุลบ แต่จะเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างกัน เริ่มตั้งแต่พีเอช 4.4 จนถึง 5.0 โดยมีพีเอชห่างกัน 0.2 หน่วย (ดูวิธีการขั้นตอนที่ 2.6) พบว่าไอโซไซม์ชนิดที่ I แยกออกจากชนิดที่ II แต่เนื่องจากความไม่เสถียรอย่างมากของไอโซไซม์ชนิดที่ II ทำให้ไม่สามารถนำไอโซไซม์ชนิดที่ II มาศึกษาต่อได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบไอโซไซม์ชนิดที่ 1 ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเสียสภาพธรรมชาติ พบว่า ได้แถบโปรตีน 1 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุล 69,600 ดาลตัน (รูปที่ 6)

ตารางที่ 1 ปริมาณเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างที่นำไป
ไตอะไลซ์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีและไม่มี EDTA

ตัวอย่างที่ไตอะไลซ์ใน บัฟเฟอร์	ไอออนของ โลหะ	หน่วยเอนไซม์ (unit/ml)	% relative activity
pH 5.5	-	4.61	100 ¹
pH 5.5 + 1 mM EDTA	-	2.44	53 ¹
pH 5.5 + 1 mM EDTA	Zn ²⁺	5.11	111 ¹
pH 5.5 + 1 mM EDTA	Ca ²⁺	2.57	56 ¹
pH 5.5 + 1 mM EDTA	Co ²⁺	2.78	60 ¹
pH 7.0	-	3.50	100 ²
pH 7.0 + 1 mM EDTA	-	3.23	92 ²

¹ เปรียบเทียบจากบัฟเฟอร์ pH 5.5

² เปรียบเทียบจากบัฟเฟอร์ pH 7.0

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนและเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่แยกได้จากขั้นตอนการ
ทำให้บริสุทธิ์

ตัวอย่าง	Total unit of enzyme	% Recovery of enzyme	Total mg protein	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold
สารสกัดดิบ	3106	100	6750	0.46	1.0
Am 30-80%	2412	78	932	2.58	5.6
DE-52	1187	38	49	24.22	52.6
CM-52	1145	37	20	57.25	124.5
Hydroxyapatite-I	426	14	2.11	201.89	438.9
Hydroxyapatite-II	124	4	1.30	95.38	207.3
Hydroxyapatite-III	81	2.6	2.25	36.00	78.3
HR S-300	37	1.2	0.26	142.31	309.4
HR S-200	52	1.7	2.53	20.55	44.7
HR S-200 – S-300	15	0.5	0.10	150.00	326.1
CM, pH gradient	4.6	0.14	0.04	115.00	250.0

รูปที่ 5 SDS-PAGE ของตัวอย่างเอนไซม์ HR S-200 – S-300

HR : ตัวอย่าง HR S-200 – S-300

รูปที่ 6 SDS-PAGE ของตัวอย่างเอนไซม์ CM pH-gradient

Std : โปรตีนมาตรฐาน (SDS molecular weight marker; BioLab)

CM : ตัวอย่าง CM pH-gradient

เนื่องจากก่อนนำเอนไซม์ผ่านคอลัมน์เซฟาคริลเอ็ซอาร์เอส-300 ได้ทำการแคลิเบรต (calibrate) คอลัมน์ด้วยโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ ไธโรโกลบูลินจากต่อมไทรอยด์ของวัว (bovine thyroid thyroglobulin; น้ำหนักโมเลกุล 669,000 ดาลตัน) เฟอริตินจากม้ามของม้า (horse spleen ferritin; 440,000 ดาลตัน) แคทตะเลสจากตับวัว (bovine liver catalase; น้ำหนักโมเลกุล 232,000 ดาลตัน) อะโดเลสจากกล้ามเนื้อของกระต่าย (rabbit muscle adolase; น้ำหนักโมเลกุล 158,000 ดาลตัน) และอัลบูมินจากซีรัมของวัว (bovine serum albumin; น้ำหนักโมเลกุล 66,000 ดาลตัน) เมื่อผ่านตัวอย่างเอนไซม์เพื่อการแยกในคอลัมน์ดังกล่าว จึงสามารถคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ได้ พบว่าอยู่ในช่วง 357,000-481,000 ดาลตัน จึงพอสรุปได้ว่า ไอโซไซม์ชนิดที่ I ควรประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดเดียวกันรวม 6 หน่วย นอกจากนี้ เมื่อนำตัวอย่าง CM pH-gradient ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟลิสซิงเจล (รูปที่ 8 ก และ ข) พบว่าไอโซไซม์จาก CM pH-gradient มีค่าพีไอที่ 4.8 เมื่อเทียบกับตัวอย่าง Am 30-80% ซึ่งจะให้ค่าพีไอ 2 ช่วงใหญ่ๆ คือที่ พีไอ 4.8 และที่ 4.9-6.0 (รูปที่ 9) แสดงว่าไอโซไซม์ชนิดที่ II มีค่าพีไอที่ 4.9-6.0

เมื่อทำการตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์ พบว่าไอโซไซม์ชนิดที่ I สามารถสลาย สับสเตรทพารา-ไนโตรเฟนิล-อัลฟา-ดี-แมนโนไพแรนโนไซด์ได้ดีที่พีเอช 4.0-4.5 และที่ อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส (รูปที่ 10 ก และ ข ตามลำดับ)

เมื่อศึกษาค่าทางจลนศาสตร์ของไอโซไซม์ชนิดที่ I พบว่าในการสลายสับสเตรท pNP-a-D-Man ที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไอโซไซม์ชนิดที่ I มีค่า K_m เท่ากับ 1.05 มิลลิโมลาร์ และค่า V_{max} เท่ากับ 0.36 ไมโครโมลต่อนาที (รูปที่ 11)

สมบัติการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดส

ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดสโดยใช้ตัวอย่างเอนไซม์ HTP-pool I เนื่องจากมีค่า specific activity และ purification fold อยู่ในเกณฑ์ที่ดีเพียงพอต่อการศึกษา โดยนำเอนไซม์บ่มกับแมนโนสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอชต่างๆ กันหรือที่อุณหภูมิต่างๆ กัน เป็นเวลา 3, 7 และ 10 วัน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ และหยุดปฏิกิริยาตัวอย่างด้วยการต้มเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบและเทียบค่าระดับสีเทา-ดำ (grey scale) โดยแบ่งการวิเคราะห์เป็น 2 รูปแบบ คือ (1) กลุ่มของ $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$ และ $\text{Man}\alpha(1\rightarrow4)\text{Man}$ และ (2) $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ เนื่องจากระบบตัวชะที่ใช้ สามารถแยก $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ ออกจากแมนโนโบโอสชนิดอื่นได้

จากการวิเคราะห์พบว่าอุณหภูมิและพีเอชที่ให้ผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 กลุ่ม สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 4.0 ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่า อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์ของเอนไซม์อยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 12 และ 14) และพีเอช 4.0 (รูปที่ 13 และ 15) ตามลำดับ

เมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวไปบ่มกับแมนโนสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ หรือความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ผสมกับโมโนแซคคาไรด์ชนิดอื่น 4 ชนิด ที่สามารถพบได้ในโอลิโกแซคคาไรด์ที่อยู่ในไกลโคโปรตีน ได้แก่ ไซโลส กาแลกโตส กลูโคส หรืออะราบินอสความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 4.0 ได้ผลดังรูปที่ 16 และตารางที่ 3

พบว่าการบ่มเอนไซม์กับแมนโนส 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม จะให้ผลิตภัณฑ์แมนโนโบโอสสูงสุด ซึ่งผลผลิตที่ได้มีทั้ง $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1\rightarrow4)\text{Man}$ และ $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลิตภัณฑ์ได้จากกลุ่มของ $\text{Man}\alpha(1\rightarrow2)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1\rightarrow3)\text{Man}$ และ $\text{Man}\alpha(1\rightarrow4)\text{Man}$ เทียบกับปริมาณของ $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ ที่ได้ พบว่าปริมาณของ $\text{Man}\alpha(1\rightarrow6)\text{Man}$ เกิดขึ้นมากกว่า ไม่ว่าจะใช้เวลาบ่ม 3 หรือ 7 วัน (ตารางที่ 3)

เมื่อบ่มเอนไซม์กับแมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ และโมโนแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ ที่มีความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ จะได้ผลที่แตกต่างกัน กล่าวคือ เมื่อบ่มเอนไซม์กับแมนโนสและไซโลส หรือกลูโคสจะไม่พบผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น แต่เมื่อบ่มเอนไซม์กับแมนโนสและกาแลกโตสเกิดผลิตภัณฑ์มีตำแหน่งจุดผลิตผลไม่ตรงกับสารมาตรฐานแมนโนโบโอสใดๆ ผลิตภัณฑ์ได้นี้มีแนวโน้มจะเป็น

ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่เกิดจากการเชื่อมต่อของแมนโนสและกาแลกโตส และ/หรือกาแลกโตไบโอส และปริมาณที่เกิดขึ้นจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของการบ่ม สำหรับการบ่มเอนไซม์กับแมนโนสและอะราบินอสจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีตำแหน่งจุดผลิตผลตรงกับ $\text{Man}\alpha(1\text{--}6)\text{Man}$ เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ผลิตภัณฑ์ที่น่าจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเชื่อมต่อของแมนโนสกับอะราบินอส และ/หรือ $\text{Man}\alpha(1\text{--}6)\text{Man}$ อย่างไรก็ดี คงต้องยืนยันผลว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการบ่มเอนไซม์กับแมนโนสและกาแลกโตสหรืออะราบินอสเป็นผลิตภัณฑ์ใดด้วยการพิสูจน์ด้วยวิธีการต่างๆ เพิ่มมากขึ้น

รูปที่ 7 Non-denaturing gel ของตัวอย่างเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านโครมาโทกราฟี

ก. ตรวจตำแหน่งของเอนไซม์ โดยการบ่มเจลด้วย 1 มิลลิโมลาร์ ของ 4-Met- α -D-Man ที่เตรียมใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปส่องภายใต้แสงอัลตรา-ไวโอเลต

ข. ตรวจโปรตีนโดยการย้อมเจลด้วย coomassie blue R-250

ก

ข

คอลัมน์ที่ 1 : สารสกัดดิบ

คอลัมน์ที่ 3 : ตัวอย่างเอนไซม์ DE-pool

คอลัมน์ที่ 5 : ตัวอย่างเอนไซม์ HTP-pool I

คอลัมน์ที่ 7 : ตัวอย่างเอนไซม์ HTP-pool III

คอลัมน์ที่ 2 : ตัวอย่างเอนไซม์ Am 30-80%

คอลัมน์ที่ 4 : ตัวอย่างเอนไซม์ CM-pool

คอลัมน์ที่ 6 : ตัวอย่างเอนไซม์ HTP-pool II

คอลัมน์ที่ 8 : ตัวอย่างเอนไซม์ HR S-300

I : ไอโซไซม์ชนิดที่ 1

II : ไอโซไซม์ชนิดที่ 2

รูปที่ 8 Isoelectrofocussing gel ของตัวอย่างเอนไซม์ CM pH-gradient

ก. ตรวจตำแหน่งของเอนไซม์ โดยการบ่มเจลด้วย 1 มิลลิโมลาร์ ของ 4-Met- α -D-Man ที่เตรียมใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปส่องภายใต้แสงอัลตรา-ไวโอเลต

ข. ตรวจโปรตีนโดยการย้อมเจลด้วย coomassie blue R-250

ก

ข

คอลัมน์ที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน (IEF molecular weight marker; Pharmacia)

คอลัมน์ที่ 2-6 : ตัวอย่างเอนไซม์ CM pH-gradient

I : ไอโซไซม์ชนิดที่ 1

รูปที่ 9 Isoelectrofocussing gel ของตัวอย่างเอนไซม์ CM pH-gradient และ Am 30-80%

ทำการตรวจตำแหน่งของเอนไซม์ โดยการบ่มเจลด้วย 1 มิลลิโมลาร์ ของ 4-Met- α -D-Man ที่เตรียมใน 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 เป็นเวลา 30 วินาที และนำไปส่องภายใต้แสงอัลตรา-ไวโอเล็ต

คอลัมน์ที่ 1, 2 : ตัวอย่างเอนไซม์ CM pH-gradient

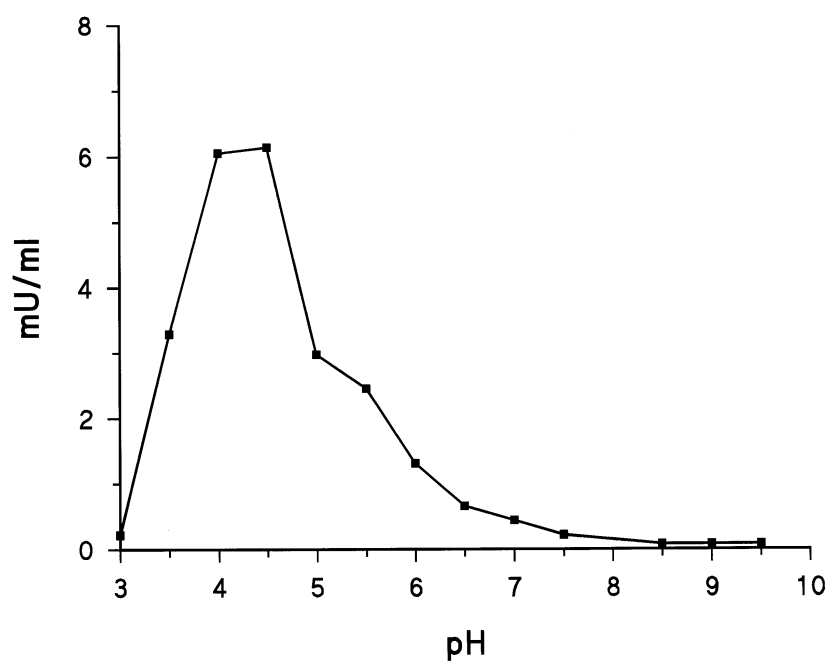
คอลัมน์ที่ 3, 4 : ตัวอย่างเอนไซม์ Am 30-80%

I : ไอโซไซม์ชนิดที่ 1

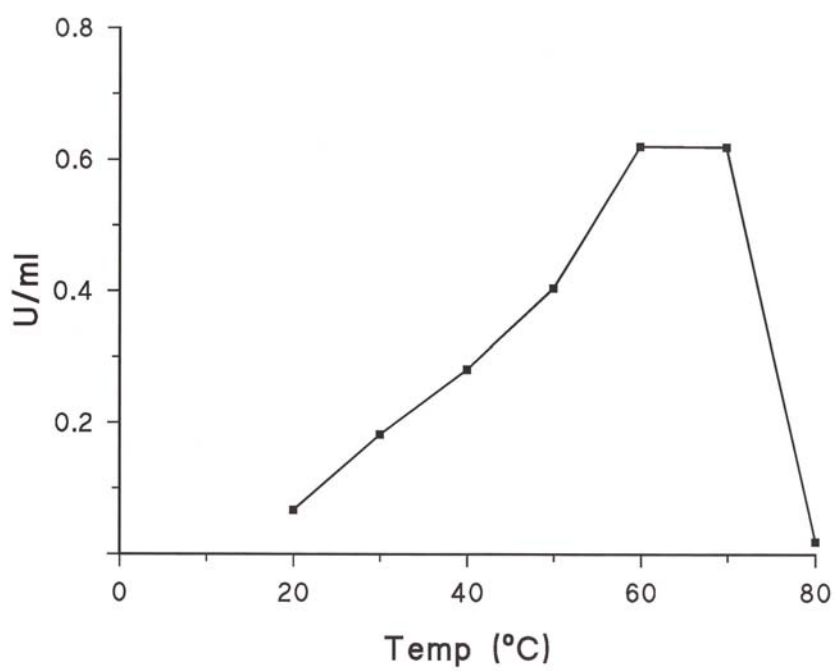
II : ไอโซไซม์ชนิดที่ 2

รูปที่ 10 พีเอช (ก) และอุณหภูมิ (ข) ที่เหมาะสมต่อการสลายสับสเตรท *p*NP-a-D-Man ของไอโซไซม์ชนิดที่ I

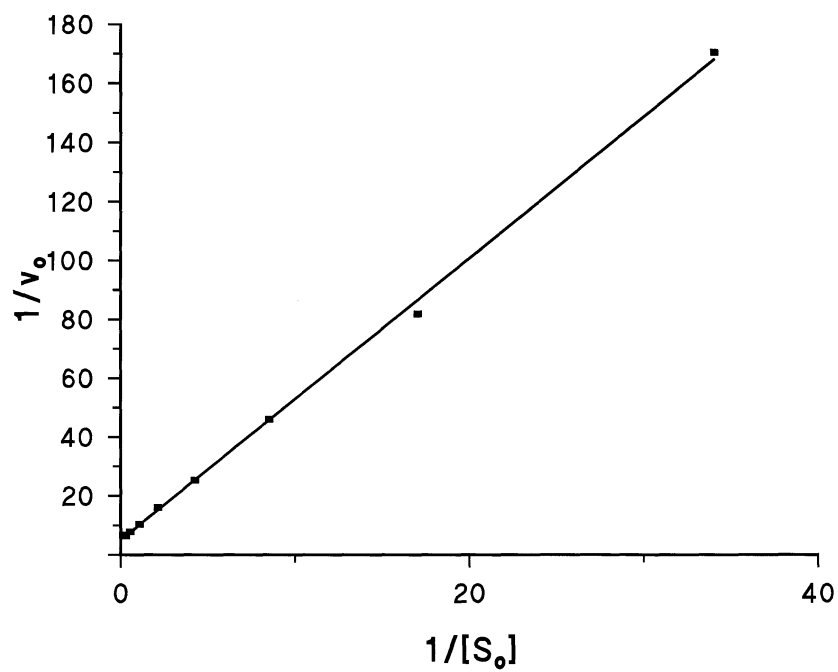
ก



ข



รูปที่ 11 Line-Weaver Burk Plot ของไอโซไซม์ชนิดที่ I ในการสลายสับสเตรท *p*NP-a-D-Man ที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

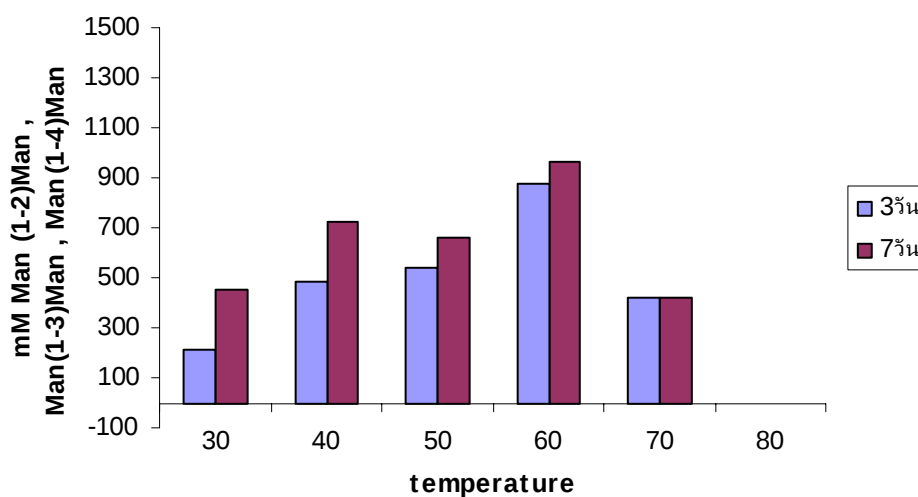


รูปที่ 12 แผ่นเคลือบแสดงผลิตผลที่ได้จากการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วย
เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส

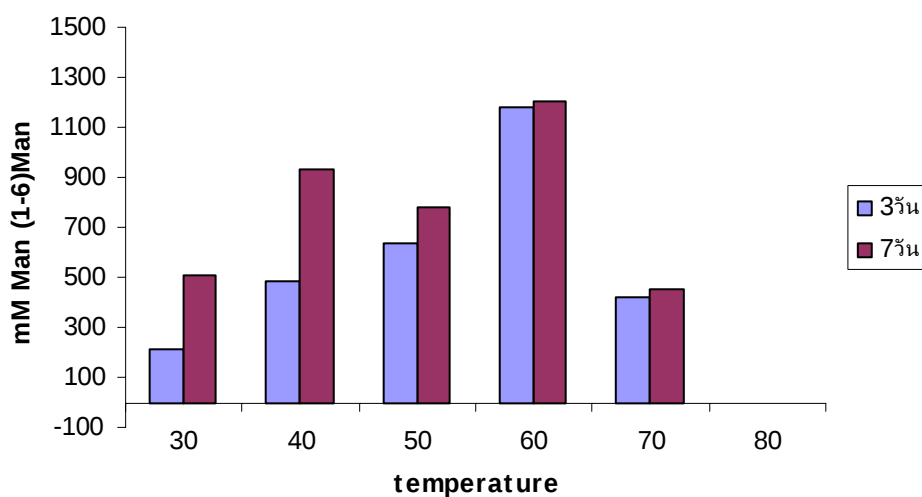
รูปที่ 13 แผ่นเคลือบแสดงผลิตผลที่ได้จากการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วย
เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่พีเอช 4.0-10.0

รูปที่ 14 แผนภูมิแสดงผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วย เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส

ก. แสดงผลผลิตผล $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1-3)\text{Man}$ และ $\text{Man}\alpha(1-4)\text{Man}$

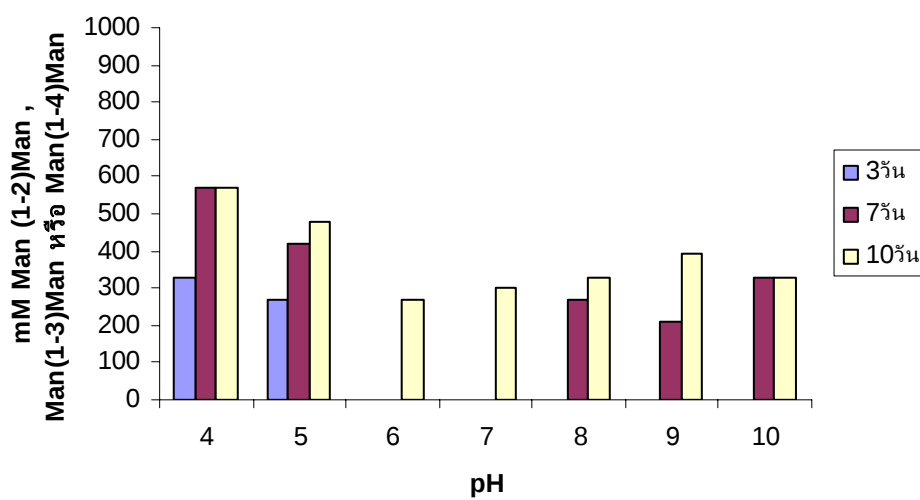


ข. แสดงผลผลิตผล $\text{Man}\alpha(1-6)\text{Man}$

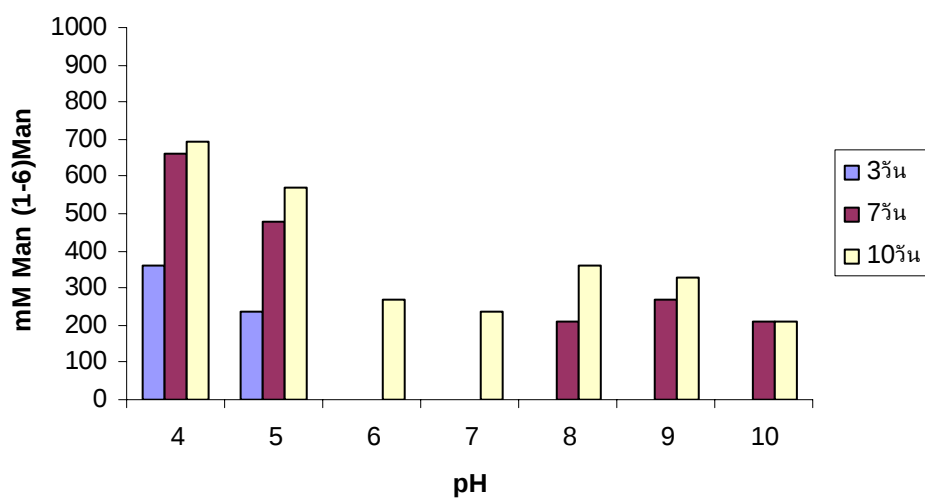


รูปที่ 15 แผนภูมิแสดงผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วย เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสที่พีเอช 4.0-10.0

ก. แสดงผลผลิตผล $\text{Man}\alpha(1-2)\text{Man}$, $\text{Man}\alpha(1-3)\text{Man}$ และ $\text{Man}\alpha(1-4)\text{Man}$



ข. แสดงผลผลิตผล $\text{Man}\alpha(1-6)\text{Man}$



รูปที่ 16 แผนเคลือบแสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ด้วย
เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทชนิดต่างๆ

- 1 : แมนโนส 50 เปอร์เซ็นต์
- 2 : แมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ กับไซโลส 40 เปอร์เซ็นต์
- 3 : แมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ กับกาแลกโตส 40 เปอร์เซ็นต์
- 4 : แมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ กับกลูโคส 40 เปอร์เซ็นต์
- 5 : แมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ กับอะราบิโนส 40 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์โดยเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดสด้วยสับสเตรทชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม

แมนโนส กับโมโนแซค คาไรด์	ผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (มิลลิโมลาร์)					
	3 วัน			7 วัน		
	M(1-2)M, M(1-3)M หรือ M(1-4)M	M(1-6)M	unknown	M(1-2)M, M(1-3)M หรือ M(1-4)M	M(1-6)M	unknown
แมนโนส	420.36	601.81	-	571.57	813.51	-
ไซโลส	-	-	-	-	-	-
กาแลกโตส	-	-	269.15	-	-	753.02
กลูโคส	-	-	-	-	-	-
อะราบิโนส	-	-	-	-	571.57	-

M(1-2)M : Man α (1-2)Man

M(1-3)M : Man α (1-3)Man

M(1-4)M : Man α (1-4)Man

M(1-6)M : Man α (1-6)Man

สรุปผลการทดลอง

การสกัดและแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสให้บริสุทธิ์จากเมล็ดกระเจี๊ยบแดงและสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์

1. เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบแดงจัดอยู่ในเอนไซม์คลาสที่ II ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสและในแฟมิลีที่ 38 ของเอนไซม์ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส

2. เมล็ดกระเจี๊ยบแดงมีเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส 2 ไอโซไซม์

3. เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) ถูกสกัดและแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนโปรตีนแบบแยกลำดับส่วนที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 30-80 เปอร์เซ็นต์ และตามด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุบวก (DEAE-52 cellulose) โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุลบ (CM-52 cellulose) โครมาโทกราฟีแบบไฮดรอกซีแอปพาไทต์ (hydroxyapatite) โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน โดยใช้เจล 2 ชนิด คือ Sephacryl HR S-200 และ HR S-300 ซึ่งจะได้เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส 2 ไอโซไซม์ปนกัน ทำยีสต์แยกไอโซไซม์ทั้ง 2 ชนิด ด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนชนิดเรซินเป็นประจุลบ (CM-52 cellulose) โดยการชะแบบเกรเดียนท์พีเอชจาก 4.4 ถึง 5.0

4. ไอโซไซม์ทั้ง 2 ชนิดต้องการ Zn^{2+} ช่วยในการคงแอกทิวิตีของเอนไซม์เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชเป็นกรด

5. ไอโซไซม์ชนิดที่ I มีค่าพีไอที่ 4.8 ขณะที่ไอโซไซม์ชนิดที่ II มีค่าพีไอที่ 4.9-6.0

6. สมบัติทางกายภาพของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเมล็ดกระเจี๊ยบแดง คือ

6.1 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสในสภาพธรรมชาติอยู่ในช่วงระหว่าง 357-481 กิโลดาลตัน

6.2 น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสในสภาพเสียธรรมชาติอยู่ที่ 69.6 และ 56.6 กิโลดาลตัน

7. สมบัติทางกายภาพของไอโซไซม์ชนิดที่ I คือ

7.1 มีค่าพีไอที่ 4.8

7.2 มีน้ำหนักโมเลกุลในสภาพเสียธรรมชาติอยู่ที่ 69.6 กิโลดาลตัน

7.3 ประกอบด้วยหน่วยย่อยชนิดเดียวกัน 6 หน่วย

7.4 มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสลายสับสเตรทสังเคราะห์ *p*NP-a-D-Man ที่ 4.0-4.5

7.5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสลายสับสเตรทสังเคราะห์ *p*NP-a-D-Man ที่ 60-70 องศาเซลเซียส

7.6 มีค่า K_m และ V_{max} ของไอโซไซม์ชนิดที่ I ต่อการสลายสับสเตรทสังเคราะห์ *p*NP-a-D-Man เท่ากับ 1.05 มิลลิโมลาร์ และ 0.36 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ

7.7 มีค่า K_m และ V_{max} ของไอโซไซม์ชนิดที่ I ต่อการสลายสับสเตรทธรรมชาติ Man α (1–2)Man เท่ากับ มิลลิโมลาร์ และ ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ

สมบัติการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดส

1. เอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดสมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์แมนโนไบโอสที่ 4.0 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าพีเอชที่เหมาะสมกับปฏิกิริยาการสลาย

2. เอนไซม์อัลฟา-แมนโนสซิเดสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์แมนโนไบโอสที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาการสลาย

3. เมื่อนำเอนไซม์บ่มกับแมนโนส 50 เปอร์เซ็นต์ที่พีเอช 4.0 และ 60 องศาเซลเซียส (พีเอชและอุณหภูมิเหมาะสม) เป็นเวลา 3, 7 และ 10 วัน จะได้ Man α (1–6)Man เป็นผลิตภัณฑ์หลักเมื่อเทียบกับแมนโนไบโอสชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้น คือ Man α (1–2)Man, Man α (1–3)Man และ Man α (1–4)Man

4. เมื่อนำเอนไซม์บ่มกับแมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ และไซโลส 40 เปอร์เซ็นต์ หรือ กลูโคส 40 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 4.0 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีผลผลิตใดๆ เกิดขึ้น

5. เมื่อนำเอนไซม์บ่มกับแมนโนส 10 เปอร์เซ็นต์ และกาแลกโตส 40 เปอร์เซ็นต์ หรืออะราบินอส 40 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 4.0 และ 60 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตบางอย่างที่ไม่ทราบแน่ชัด

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

โดยปกติสามารถสกัดและแยกเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสให้บริสุทธิ์ได้ทั้งจากพืช จุลินทรีย์ ยีสต์ และเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เมื่อต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและความจำเพาะต่อการสังเคราะห์โอลิโก-แมนโนไซด์ของเอนไซม์ ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ จำเป็นต้องใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ที่มีปริมาณมากพอต่อการศึกษา มักพบว่าเอนไซม์ที่สกัดแยกให้บริสุทธิ์จากพืชมีปริมาณน้อยมาก ๆ และไม่เสถียร (unstable) (Wongvithoonyaporn, 1997 และ Arthan, 1997) ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวตามวัตถุประสงค์ได้ ผู้วิจัยจึงเสนอแนะว่าถ้าต้องการศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวตามที่ระบุไว้ ควรใช้เอนไซม์ที่สกัดและแยกได้จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา ซึ่งการใช้เชื้อราเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดส มีข้อได้เปรียบคือ

1. สามารถเลี้ยงเชื้อราให้ผลิตเอนไซม์ได้มากพอที่จะใช้ในการศึกษาได้
2. ปริมาณโปรตีนที่มีในเชื้อรานั้นน้อยกว่าปริมาณโปรตีนในพืช ทำให้ง่ายในการสกัดและแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ในแง่ของวิธีการและขั้นตอนที่ต้องใช้ในการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์
3. ความจำเพาะของตำแหน่งการสลายพันธะของเอนไซม์ต่อแมนโนส เมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะของเอนไซม์จากเชื้อราและเอนไซม์จากพืช พบว่าเอนไซม์จากพืชส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการสลายพันธะ ณ ตำแหน่ง $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ และ $\alpha(1-6)$ ขณะที่เอนไซม์อัลฟา-แมนโนซิเดสจากเชื้อรามีทั้งกลุ่มที่สลายพันธะ ณ ตำแหน่ง $\alpha(1-2)$ (Singh *et al*, 2000) และกลุ่มที่สลายพันธะ ณ ตำแหน่ง $\alpha(1-2)$, $\alpha(1-3)$ และ $\alpha(1-6)$ (Kesar *et al*, 1996) ทำให้การสังเกตผลหลากหลายขึ้นและง่ายขึ้น เมื่อสมมติความจำเพาะมีการเปลี่ยนแปลง

หนังสืออ้างอิง

- สุพักตร์ พ่วงบางโพ, สุจิตรา เจือสุวรรณ และชนินธิษฐ์ ชูพยัคฆ์. (2543) การตรวจสอบ Beta-D-galactosidase, beta-D-glucosidase และ alpha-D-mannosidase ในเมล็ดพืชวงศ์ แตง. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร, **8 (1)**, 56-67.
- Andreotti, G., Giordano, A., Tramice, A., Mollo, E. and Trincone, T. (2005) Purification and characterization of alpha-mannosidase from the marine anaspidean *Aplysia fasciata*. *J.of Biotech.* **119**, 26–35.
- Arthan, D. (1997) α -Mannosidase from *Hibiscus sabdariffa* L. var. sabdariffa. [M. Sc. Thesis in Biochemistry]. Bangkok: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Thailand.
- Berg, T. and Hopwood, J. J. (2001) α -Mannosidosis in the guinea pig: cloning of the lysosomal α -mannosidase cDNA and identification of a missense mutation causing α -mannosidosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1586**, 169-176.
- Bio-Rad Laboratories. Model 111 Mini IEF Cell Instruction Manual catalog numbers 170-2975 and 170-2976. Richmond (CA), 1-22.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Elsen, M. H. J., Kuntz, D. A. and Rose, D. R. (2001) Structure of golgi α -mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *Eur. Mol. Biol. Org.* **20(12)**, 3008-3017.
- Flitsch, S. L. (2000) Chemical and enzymatic synthesis of glycopolymers. *Current Opinion Chem. Biol.*, **4**, 619-625.

- Fujita, A., Yoshida, T. and Ichishima, E. (1997) Five crucial carboxyl residues of 1,2- α -mannosidase from *Aspergillus saitoi* (*A. phoenicis*), a food microorganism, are identified by site-directed mutagenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236(3)**, 779-783.
- Gonzalez, S. D. and Jordan, I. K. (2000) The α -mannosidases: phylogeny and adaptive diversification. *Mol. Biol. Evol.* **17 (2)**, 292–300.
- Herscovics, A. (1999a) Importance of glycosidase in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1473**, 96-107.
- _____. (1999b) Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1426**, 275-285.
- _____. (2001) Structure and function of class I α 1,2-mannosidase involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control. *Biochim.* **83**, 757-762.
- Itoh, H. and Kamiyama, Y. (1995) Synthesis of alkyl β -mannosidase from mannobiose by *Aspergillus niger* β -mannosidase. *J. Ferment. Bioeng.* **80(5)**, 510-512.
- Keskar, S. S., Gaikwad, S. M. and Khan, M. I. (1996) Microbial α -mannosidase. *Enz. Microbiol. Technol.* **18**, 602-604.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685.
- Mahadevi, A. S., Suryanarayana, R. V. and Kumar, N. S. (2002) Alpha -mannosidase from the seeds of triticale. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **6**, 397-400.
- Montruil, J. Bouquelet, S., Debray, H., Lemoine, J., Michalski, J-C., Spik, G., and Strecker, G. (1994) *Glycoprotein In Carbohydrate Analysis : A Practical*

Approach. 2nd ed., by Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F., IRL Press, Oxford (UK), 181-293.

Moremen, W. K. (2002) Golgi α -mannosidase II deficiency in vertebrate systems: implications for asparagine-linked oligosaccharide processing in mammals (review). *Biochim. Biophys. Acta.* **1573**, 225–235.

Ohtani, K. and Misaki, A. (1980) The structure of the glycan moiety of tora-bean (*Phaseolus vulgaris*) lectin. *Carbohydr. Res.*, **87(2)**, 275-285.

(a) Orstein, L. (1964) Disc electrophoresis – I. Background and theory. *Ann. NY Acad. Sci.*, **121**, 321-349. (b) Davis, B.J. Disc electrophoresis – II. Method and application to human serum proteins. *Ann. NY Acad. Sci.*, **121**, 404-427.

Sears, P. and Wong, C. H. (1998) Enzyme action in glycoprotein synthesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 223-252.

Singh, S., Scigelova, M. and Crout, D. H. G. (2000) Glycosidase-catalysed synthesis of mannobioses by the reverse hydrolysis activity of α -mannosidase: partial purification of α -mannosidases from almond meal, limpets and *Aspergillus niger*. *Tetra. Asy.* **11**, 223–229.

Wongvithoonyaporn, P. (1997) Separation, characterization, and specificity study of α -mannosidases from *Vigna umbellata*. [Ph.D. Thesis in Biochemistry]. Bangkok: Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, Thailand.

Yoshida, T., Inoue, T. and Ichishima, E. (1993) 1,2- α - Mannosidase from *Penicillium citrinum*. *J. Biochem.* **290**, 349 –354.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ในเชิงวิชาการ ได้สนับสนุนการทำปัญหาพิเศษของนิสิตระดับปริญญาตรีจำนวน 3 คน คือ

1. นายธเนศ เปาอินทร์
2. นางสาวจารุณี เหลืองทองอร่าม
3. นางสาววรารักษ์ ถาวรนาน

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศจำนวน 1 เรื่อง

1. Thavonnan, W. and Wongvithoonyaporn, P. (2006) Alpha-mannosidase content in vegetable and plant seeds and their preliminary properties of alkyl-mannoside synthesis. In *Proceedings of the 32th Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32) on "Science and Technology for Sufficiency Economy. To celebrate the 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne.* Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC), Bangkok, Thailand, 10-12 October, 2006. No. B5_B0209.

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ จำนวน 3 เรื่อง

1. Thavonnan, W. and Wongvithoonyaporn, P. (2006) Alpha-mannosidase content in vegetable and plant seeds and their preliminary properties of alkyl-mannoside synthesis. In *Abstracts of the 32th Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32) on "Science and Technology for Sufficiency Economy. To celebrate the 60th Anniversary of His Majesty the King's Accession to the Throne.* Queen Sirikit National Convention Center (QSNCC), Bangkok, Thailand, 10-12 October, 2006. p. 137.
2. Wongvithoonyaporn, P., Mahaut, W., Artharn, D., Pao-in, T., Leongthongaram, J., and Svasti, J. (2002) Purification and Chracterization of α -Mannosidase from Roselle. In *Abstracts of the 14th Annual Meeting of the Thai Society for*

- Biotechnology on "Biotechnology for Better Living in the New economy".* Sofitel Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand, 12-15 November, 2002. p. 180.
3. Wongvithoonyaporn, P., Mahaut, W., Pao-in, T., Leongthongaram, J., and Svasti, J. (2002) The α -Mannosidase from Roselle: Purification and Reverse Reaction. In *Abstracts of Protein Research Network Symposium 2002 on "Protein Structure and Molecular Enzymology".* Center for Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 29-30 August, 2002. p. 26.
-