การเตรียมเอ็น,เอ็น-ไดแอซิทิลไคโทไบโอสจากไคทินโดยการย่อยด้วยเอนไซม์

นางสาว วาสินี ประกอบกิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3728-9

PREPARATION OF *N,N'*-DIACETYLCHITOBIOSE FROM CHITIN BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

Miss Wasinee Prakobkij

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2003

ISBN 974-17-3728-9

Thesis Title	Preparation of *N,N'*-diacetylchitobiose from chitin by enzymatic hydrolysis
By	Miss Wasinee Prakobkij
Field of Study	Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Rath Pichyangura, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Professor Pattarapan Prasassarakich , Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.)

.....Thesis Co-Advisor

(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Wimonrat Trakarnpruk, Ph.D.)

.....Member

(Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.)

วาสินี ประกอบกิจ: การเตรียมเอ็น,เอ็น-ไดแอซิทิลไคโทไบโอสจากไคทินโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ (PREPARATION OF *N,N'*-DIACETYLCHITOBIOSE FROM CHITIN BY ENZYMATC HYDROLYSIS) อ.ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์; อ.ที่ปรึกษาร่วม: อ. ดร. รัฐ พิชญางกูร; 90 หน้า. ISBN 974-17-3728-9

ได้ศึกษาเอนไซม์ 2 ชนิดได้แก่ cellulase *Ac* จาก *Acremonium cellulolyticus* และ Chi 60 จาก *Serratia* sp. เพื่อใช้ในการเตรียมน้ำตาลเอ็น,เอ็น-ไดแอซิทิลไคโทไบโอสจากไคทิน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ cellulase *Ac* ได้ใช้ซับสเตรท 2 ชนิดคือ ไคทินผงและไคทินเส้นใย ความแตกต่างของสภาวะที่เหมาะสมสำหรับซับสเตรท 2 ชนิดนี้คือ ความเข้มข้นของไคทินและความเข้มข้นของเอนไซม์ สำหรับเอนไซม์ cellulase *Ac* อัตราส่วนโมลผลิตภัณฑ์ [$(GlcNAc)_2$/GlcNAc] สามารถปรับให้เพิ่มขึ้นจาก 1 เป็นมากกว่า 3 ได้โดยใช้เทคนิคการดูดซับเอนไซม์ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ cellulase *Ac* มีส่วนประกอบเอนไซม์ทั้งที่เป็น chitinase และ chitobiase ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ Chi 60 ได้ใช้เพียงไคทินเส้นใยเป็นซับสเตรทเท่านั้น การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Chi 60 ต่ำๆ (น้อยกว่า 30 มิลลิยูนิตต่อ 1 มิลลิลิตร) ให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลเอ็น,เอ็น-ไดแอซิทิลไคโทไบโอสเพียงชนิดเดียวเท่านั้น แต่ที่ความเข้มข้นของ Chi 60 สูงๆ มีผลิตภัณฑ์ทั้ง $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc เกิดขึ้น เทคนิคการดูดซับเอนไซม์ไม่สามารถใช้ในการเพิ่มอัตราส่วนโมลผลิตภัณฑ์ได้สำหรับเอนไซม์นี้แสดงว่าเอนไซม์ Chi 60 น่าจะประกอบด้วยเอนไซม์เพียงชนิดเดียวที่มีความสามารถในการย่อยทั้งภายในและปลายสายโซ่ไคทินได้

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต วาสินี ประกอบกิจ

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4372409323: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE
KEY WORDS : β-CHITIN / *N,N'*-DIACETYLCHITOBIOSE / ENZYMATIC HYDROLYSIS

WASINEE PRAKOBKIJ: PREPARATION OF *N,N'*-DIACETYLCHITO BIOSE FROM CHITIN BY ENZYMATIC HYDROLYSIS. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. MONGKOL SUKWATTANASINITT, Ph.D.; THESIS CO-ADVISOR: RATH PICHYANGKURA, Ph.D., 90 pp. ISBN 974-17-3728-9

Two types of enzymes, cellulase *Ac* from *Acremonium cellulolyticus* and Chi 60 from *Serratia* sp, were studied for a preparation of *N,N'*-Diacetylchitobiose from chitin. The optimum conditions for both enzymes to hydrolyzed chitin were investigated in this work. In study for the optimum condition of cellulase *Ac*, powder chitin and fibrous chitin were used as the substrates. The difference optimum conditions of both substrates were chitin concentration and enzyme concentration. The $(GlcNAc)_2$/GlcNAc mole ratio can be improved from 1 to over 3 by using the enzyme affinity technique, indicating that cellulase *Ac* contained both chitinase and β-N-acetylhexosaminidase. For Chi 60, only fibrous chitin was used as a substrate. At lower concentration of Chi 60 (< 30 mU/mL), the chitinolytic product was only $(GlcNAc)_2$ but at higher concentration of the enzyme, both $(GlcNAc)_2$ and GlcNAc were observed. The enzyme affinity technique cannot be used to improve the $(GlcNAc)_2$/GlcNAc mole ratio for Chi 60 indicating that this enzyme consists of only one enzyme which had both endo- and exo-chitinolytic activities.

Field of study.. Petrochemistry and Polymer Science...Student's signature.....
Academic year.....2003.....Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my gratitude and appreciation to my advisors, Asst. Prof. Dr. Mongkol Sukwattanasinitt and Dr. Rath Pichyangkura, for their helpful suggestions, generous guidance, and encouragement throughout this reseach. Gratefully thanks to Professor Dr. Pattarapan Prasassarakich, Associate Professor Dr. Wimonrat Trakarnpruk and Dr. Varawut Tangpasuthadol, for their valuable suggestions and advice as thesis chairman and committee.

I would like to gratefully thank Miss Kitsana Siralerdmukun from Metallurgy and Materials Science Research for permission to use an ultracentrifugal mill. I would like to extend my thank to M.L. Siripastr Jayanta for invaluable advices on HPLC techniques. I would also like to thank Miss Kamolthip Kuttiyawong and Miss Santhana Nakatong at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their helps in biochemistry laboratory. Many thanks to the MS-group's members: Panithan, Siriporn, Akamol, Krissana, Anupat, Arisa, and Chantana for their helps in everything. I would also like to thank the Graduate School, Chulalongkorn University for research financial support.

This work is part of department of chemistry OECF-JBIT project and financially by National Metal and Materials Technology center (MTEC), project code MT-B-46-POL-09-206-6.

Finally, I also would like to express my gratitude to my family for their love, support and encouragement. Especially, Pradhammarachanuwat who financially support me in this higher education study. Without their love, support and kindness this thesis could not have been succeeded.

CONTENTS

CONTENTS (Continued)

Page

CONTENTS (Continued)

Page

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure **Page**

LIST OF TABLES

Tables **Pages**

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	degree Celcius	nm	nanometre
DI-water	deionized water	Sec	second
g	gram (s)	U	unit
GlcNAc	*N*-acetyl-D-glucosamine	α	alpha
$(GlcNAc)_2$	*N,N'*-diacetylchitobiose	β	beta
HPLC	high performance	μg	microgram
	liquid chromatography	μL	microlitre
hr	hour	μm	micrometre
min	minute	μM	micromolar
mg	milligram	%	percent
mL	millilitre		
mM	millimolar		