การเตรียมเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการย่อยไคทินและไคโทซานด้วยเอนไซม์จากซีรัมยางพารา

นายเอกกมล คล้ายเกิด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2541-8

PREPARATION OF *N*-ACETYL-D-GLUCOSAMINE AND CHITOOLIGOSACCHARIDE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CHITIN AND CHITOSAN WITH SERUM FROM PARA RUBBER

Mr. Akamol Klaikherd

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002

ISBN 974-17-2541-8

Thesis Title	Preparation of *N*-acetyl-D-glucosamine and chitooligosaccharide by enzymatic hydrolysis of chitin and chitosan with serum from para rubber.
By	Mr. Akamol Klaikherd
Field of Study	Chemistry
Thesis Advisor	Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.
Thesis Co-Advisor	Associate Professor Supason Wanichweacharungruang, 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 Udom Kokpol, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.)

..... Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Supason Wanichweacharungruang, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

..... Member
(Mr. Rath Pichyangkura , Ph.D.)

เอกกมล คล้ายเกิด: การเตรียมเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการย่อยไคทินและไคโทซานด้วยเอนไซม์จากซีรัมยางพารา (PREPARATION OF *N*-ACETYL-D-GLUCOSAMINE AND CHITOOLIGOSACCHARIDE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CHITIN AND CHITOSAN WITH SERUM PROM PARA RUBBER) อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์; อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. ศุภศร วนิชเวชารุ่งเรือง; 127 หน้า ISBN 974-17-2541-8

ซีรัมจากยางพารา (*Hevea Brasiliensis*) เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำยางข้นซึ่งมีเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคทินแบบเอ็นโดไคทิเนสมีชื่อว่า เฮวามีน (hevamine) งานวิจัยนี้เสนอความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์จากซีรัมยางพารามาใช้ผลิตน้ำตาลเอ็น-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และน้ำตาลเอ็น,เอ็น-ไดแอซิทิลไคโทไบโอส [$(GlcNAc)_2$] จากบีตาไคทิน โดยซีรัมยางพาราที่ใช้ในการทดลองนี้มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 6 mg/mL และมีแอคทิวิตีการย่อยไคทินอยู่ที่ 18 มิลลิยูนิต (mU) ต่อมิลลิกรัมโปรตีน อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างซีรัมต่อไคทินเป็น 0.22 มิลลิยูนิต/มิลลิกรัม โดยความเข้มข้นของไคทินที่เหมาะสม คือ 60 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของสารละลายคือ pH 2-4 และเอ็นไซม์ในซีรัมยางพารานี้มีแอคทิวิตีในการย่อยสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 ^{o}C โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาล GlcNAc และน้ำตาล $(GlcNAc)_2$ ด้วยอัตราส่วนโมลผลิตภัณฑ์ ($(GlcNAc)_2$/GlcNAc) ประมาณ 2:1 และเมื่อย่อยไคทิน 300 มิลลิกรัม จะได้น้ำตาล GlcNAc 39 มิลลิกรัมและน้ำตาล $(GlcNAc)_2$ 108 มิลลิกรัม คิดเป็น 11.6 เปอร์เซ็นต์ และ 35.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับด้วยการวิเคราะห์ด้วย HPLC ในเวลา 8 วันที่ทำการย่อยด้วยเอ็นไซม์ 64 มิลลิยูนิต ที่สภาวะเหมาะสม เทคนิคไดอะไลซิสช่วยแยกผลิตภัณฑ์ออกจากไคทินและเอนไซม์ได้ง่าย แต่ประสิทธิภาพของเอนไซม์กลับลดลง น้ำตาล $(GlcNAc)_2$ ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วย gel-filtration chromatography และพบว่า น้ำตาล $(GlcNAc)_2$ ได้คืนมา 92 เปอรเซ็นต์ ด้วยความบริสุทธิ์ 36 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เทคนิคการผสมเอนไซม์ได้ถูกใช้สำหรับการผลิต GlcNAc จากไคทิน ซึ่งปฏิกิริยานี้ให้ 52 เปอร์เซ็นต์ของ GlcNAc วิเคราะห์โดย HPLC ในวันที่ 4 และ ซีรัมให้ผลิตภัณฑ์เป็นไคโทซานมวลโมเลกุลต่ำ 5.4×10^{4}-1.5×10^{5}แทนที่ไคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อย่อยด้วยไคโทซาน ดังนั้นซีรัมจึงมีศักยภาพที่จะใช้ในการผลิตน้ำตาล GlcNAc และ $(GlcNAc)_2$ และไคโทซานมวลโมเลกุลต่ำ

ภาควิชา.....เคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....เอกกมล คล้ายเกิด.....

สาขาวิชา.....เคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2545..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372503623: MAJOR CHEMISTRY
KEY WORD: β-CHITIN / SERUM PARA RUBBER / ENZYMATIC HYDROLYSIS

AKAMOL KLAIKHERD: PREPARATION OF *N*-ACETYL-D GLUCOSAMINE AND CHITOOLIGOSACCHARIDE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF CHITIN AND CHITOSAN WITH SERUM FROM PARA RUBBER. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. MONGKOL SUKWATTANASINITT, Ph.D.; THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUPASON WANICHWEACHARUNGRUANG, Ph.D., 127 pp. ISBN 974-17-2541-8.

Serum fraction of para rubber (*Hevea brasiliensis*) obtained from the process of concentrated latex preparation is known to contain an endo-chitinolytic enzyme, Hevamine. This work presents an investigation of a potential utilization of the serum for the production of *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and *N,N'*-diacetylchitobiose ($(GlcNAc)_2$) from β-chitin. The rubber serum contained 6 mg/mL of protein with chitinolytic activity of 18 mU per milligram of protein. The optimum ratio of enzyme to chitin was found to be 0.22 mU/mg with optimum substrate concentration at 60 mg/mL. The optimum pH range was 2-4 and the optimum temperature was 45 °C where the reaction produced both $(GlcNAc)_2$ and GlcNAc with the product mole ratio ($(GlcNAc)_2$/GlcNAc) approximately 2:1. The hydrolysis of 300 mg of chitin yielded 39 mg of GlcNAc and 108 mg of $(GlcNAc)_2$ corresponding to HPLC yield of 11.6% GlcNAc and 35.8% $(GlcNAc)_2$ within 8 days when 64 mU of the enzyme was used at the optimum condition. Dialysis technique offered convenient separation of the GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ products from the starting chitin and enzymes but reduced the enzyme efficiency. Partial purification of $(GlcNAc)_2$ was achieved by gel filtration chromatography. $(GlcNAc)_2$ was recovered in 92% with 36% (w/w) purity. A technique of enzyme combination was used for production of GlcNAc from chitin. This hydrolysis showed an HPLC yield of 52% GlcNAc in 4 days. The serum *Hb* gave low molecular weight chitosan with M_w 5.4×10^4 - 1.5×10^5 rather than the expected chitooligosaccharide $(GlcNAc)_2$ – $(GlcNAc)_7$) when hydrolyzed with chitosan. The serum thus has potential use for low cost production of GlcNAc and $(GlcNAc)_2$ and low molecular weight chitosan.

Department……Chemistry…….Student's signature……Akamol Klaikherd……
Field of study….Chemistry…….Advisor's signature……Mongkol Sukwattanasinitt……
Academic year…..2002……...Co-advisor's signature……Supason Wanichweacharungruang……

ACKNOWLEDGEMENT

First of all, I would like to express my gratitude to my family for their encouragement and support throughout the course of my education. Especially, my parents and sister, who have always been with me, gave an opportunity to study and also financial support.

This thesis could not be successful without helps and supports from numerous people. I would like to thank Dr. Warinthorn Chavasiri, Dr. Jariya Boonjawat, Dr. Rath Pichyangkura, and Dr. Sei-ichi Aiba for providing urgently needed chemicals and materials not available in our laboratory. I would like to extend my thank to M.L. Siripastr Jayanta for invaluable advice on HPLC technique and Dr. Jariya Boonjawat for knowledge about biochemistry of rubber serum.

Moreover, I would like to gratefully thank to Miss Kitsana Siralerdmukun from Metallurgy and Materials Science Research for permission to use an ultracentrifugal mill and optical microscope. I would to thank Miss Oranuch Haowuttikul and Mr. Sanya Kudan at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for their help in biochemistry laboratory. I would also like to thank the Scientific and Technological Research Equipment Center of Chulalongkorn University for elemental analysis results. The Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University and Graduate School, Chulalongkorn University are gratefully acknowledged for financial support.

In addition, I would like to knowledge the chairman and members of the thesis committee, Professor Dr. Udom Kokpol, Assistant professor Dr. Warinthorn Chavasiri, and Dr. Rath Pichyangkura, for their worthy comments and splendid suggestions. I would not actually forget to thank my friends especially staffs in Ms-Group, Panithan, Siriporn, Wasinee, Krissana, Anupat, Arisa, and Chantana, for their big help everything.

Finally, I would like to express my debt of gratitude to my thesis advisors, Dr. Mongkol Sukwattanasinitt and Dr. Supason Wanichweacharungruang, for their invaluable suggestions, assistance, and encouragement throughout this thesis and persuasion into the Chitin and Chitosan amazing material. Without their kindness and understanding, This thesis could not be accomplished.

CONTENTS

Page

CONTENTS (Continued)

Page

CONTENTS (Continued)

Page

CONTENTS (Continued)

Page

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure **Page**

LIST OF FIGURES (Continued)

Figure **Page**

LIST OF TABLES

Tables **Pages**

LIST OF TABLES (Continued)

Tables **Pages**

LIST OF SCHEMES

Schemes **Pages**

List of Abbreviations

cm	centimeter	min	minute
°C	degree celsius	mL	milliliter (s)
DI-water	deionized water	mM	millimolar
DOC	sodium deoxycholate	mU	milliunit
g	gram (s)	M_w	molecular weight
GlcNAc	*N*-acetyl-D-glucosamine	ppm	part per million
$(GlcNAc)_2$	*N,N'*-diacetylchitobiose	PBS	phosphate buffer saline
$(GlcNAc)_3$	*N,N',N''*-triacetyl-chitotriose	PTA	phosphotungstic acid
		sec	second
$(GlcNAc)_4$	*N,N',N'',N'''*–tetraacetyl-chitotetraose	TCA	trichloroacetic acid
		U	unit
GlcN	D-glucosamine	Å	angstrom
GFC	gel filtration chromatography	α	alpha
		β	beta
GPC	gel permeation chromatography	γ	gamma
		μL	microliter
HPLC	high performance liquid chromatography	%	percent
		%DA	percent degree of acetylation
mg	milligram		
M	molar		