การเตรียมเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโทไบโอส โดยการย่อยไคทินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์

นางสาวฐิติมา มณีกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-2528-7

PREPARATION OF *N*-ACETYL-D-GLUCOSAMINE AND *N,N*-DIACETYLCHITOBIOSE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SQUID PEN CHITIN

Miss Thitima Maneekul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Chemistry
Department of Chemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ISBN 974-14-2528-7

Thesis Title	Preparation of N-Acetyl-D-glucosamine and N,N-Diacetylchitobiose by Enzymatic Hydrolysis of Squid Pen Chitin
By	Thitima Maneekul
Field of study	Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Hunsa Punnapayak, Ph.D.

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

..... Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Udom Kokpol, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor

(Associate Professor Hunsa Punnapayak, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Voravee P. Hoven, Ph.D.)

..... Member

(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

นางสาวฐิติมา มณีกุล : การเตรียมเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีนและเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโทไบโอสโดยการย่อยไคทินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์. (PREPARATION OF *N*-ACETYL-D-GLYCOSAMINE AND *N,N*-DIACETYLCHITOBIOSE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SQUID PEN CHITIN) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร.มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ 61 หน้า. ISBN 974-14-2528-7.

การย่อยไคทินจากแกนหมึกด้วยเอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* และโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* สามารถผลิตเอ็น-แอซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (GlcNAc) และเอ็น,เอ็น-ไดแอซีทิลไคโทไบโอส [$(GlcNAc)_2$] อย่างเฉพาะเจาะจงได้ เอนไซม์จากรา *Aspergillus fumigatus* (4 U/1 g of chitin) สามารถย่อยไคทิน (3% w/v) ที่ pH เป็น 3 อุณหภูมิ 40 °C ได้ผลิตภัณฑ์เป็น GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 72% ภายในเวลา 2 วัน การย่อยไคทิน (3% w/v) ด้วยเอนไซม์จากโคลนแบคทีเรีย *Serratia sp.* (1 U/1 g of chitin) ที่ pH เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 37 °C ทำการบ่มเป็นเวลา 6 วันให้ผลิตภัณฑ์เป็น $(GlcNAc)_2$ และ GlcNAc ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์ 43% และ 2.6% ตามลำดับ การแยก GlcNAc สามารถทำได้โดยการตกตะกอนจากสารละลาย GlcNAc ที่มีความเข้มข้นสูงด้วยเอธานอล ตามด้วยการกำจัดสีด้วยผงถ่านให้ GlcNAc บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 64% การย่อยไคทินด้วยเอนไซม์จากแบคทีเรีย (5 U/1 g of chitin) ตามด้วยการแยก $(GlcNAc)_2$ โดยใช้คอลัมน์ที่มี activated charcoal เป็นเฟสคงที่ชะด้วยเฟสเคลื่อนที่ที่มีเปอร์เซ็นต์เอธานอลในน้ำตั้งแต่ 0-30% ให้ $(GlcNAc)_2$ บริสุทธิ์ด้วยเปอร์เซ็นต์ผลผลิต 40%

ภาควิชา : เคมี
สาขาวิชา : เคมีอินทรีย์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672257523 : MAJOR CHEMISTRY

KEY WORD: *N*-ACETYL-D-GLUCOSAMINE /*N,N'*-DIACETYLCHITOBIOSE / *Aspergillus fumigatus* / *Serratia sp.*

THITIMA MANEEKUL : PREPARATION OF N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE AND N,N'-DIACETYLCHITOBIOSE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SQUID PEN CHITIN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MONGKOL SUKWATTANASINITT, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. 61 pp. ISBN 974-14-2528-7.

Squid pen chitin (β-chitin) was hydrolyzed by crude enzymes from two sources; fungal enzyme from *Aspergillus fumigatus* and bacterial enzyme from cloned *Serratia sp.* to selectively produced *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) and *N,N'*-diacetylchitobiose ($(GlcNAc)_2$) respectively. The crude enzyme (4 U/1 g of chitin) from *A. fumigatus* hydrolyzed chitin (3% w/v) at pH 3, 40 °C and gave 72% HPLC yield of GlcNAc within 2 days. The hydrolysis of chitin (3% w/v) with the crude enzyme (1 U/1 g of chitin) from cloned bacteria *Serratia sp.* at pH 6, 37 °C for 6 days gave 43% and 2.6% HPLC yield of $(GlcNAc)_2$ and GlcNAc, respectively. The isolation of GlcNAc by ethanol precipitation from the highly concentrated solution of crude product followed by the decoloration with the activated charcoal gave pure GlcNAc with 64% isolated yield. The hydrolysis of chitin by bacterial enzyme 5 U/1 g chtin followed by isolation of $(GlcNAc)_2$ by activated charcoal column chromatography using stepwise-gradient elution of water up to 30% ethanol gave pure $(GlcNAc)_2$ in 40% yield.

Department : Chemistry Student's Signature Thitima Maneekul

Field of Study : Chemistry Advisor's Signature

Academic Year : 2006 Co-advisor's Signature

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her sincere gratitude to her advisor, Associate Professor Mongkol Sukwattanasinitt and Associate Professor Hunsa Punnapayak for their invaluable guidance, excellent and kind supervision and encouragement throughout this research. This thesis research would not be complete without their advice and guidance.

Her appreciation is also given to Professor Udom Kokpol and Assistant Professor Voravee Hoven, thesis defence committee, for their kind attention and recommendations. She also would like to thank Dr. Rath Pichyangkura, thesis defence committee, and his advisee who provide bacterial enzyme used in this thesis.

She is grateful to all teachers who educated and gave her valuable suggestions.

She wishes to thank the staff of Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University for providing all facilities and kind assistance.

Furthermore, she expresses her appreciation to her friends for their genuine, friendly help and friendship, especially those in Plant Biomass Utilization Research Unit and MS-Group, Akamol, Siriporn, Wasinee, Krissana, Anupat, Arisa, Chantana and Kunlayanee for their big help everything.

Moreover, she would like to gratefully thank to Dr. Kitsana Siralerdnukun from Metallurgy and Materials Science Research for permission to use an ultracentrifugal mill and optical microscope

Finally, she would like to manifest her gratitude to her family for their love, care, encouragement, and understanding throughout her study.

CONTENTS

CONTENTS (Continued)

CONTENTS (Continued)

Page

LIST OF FIGURES

LIST OF TABLES

List of Abbreviations

CCMM	colloidal chitin minimum medium	mL	milliliter (s)
		mM	millimolar
cm	centimeter	MRM	multiple reaction monitoring
°C	degree celsius		
DI-water	deionized water	mU	milliunit
DP	degree of polymerization	M_w	molecular weight
		m/z	mass to charge ratio
ESI	electrospray ionization	PDA	potato dextrose agar
g	gram (s)	PDB	potato dextrose broth
GlcNAc	*N*-acetyl-D-glucosamine	ppm	part per million
		rpm	round per minute
$(GlcNAc)_{2-7}$	*N*,*N*'-diacetylchito(biose, …, heptaose)	sec	second
		TCA	trichloroacetic acid
		U	unit
GPC	gel permeation chromatography	Å	angstrom
		α	alpha
HPLC	high performance liquid chromatography	β	beta
		γ	gamma
LC	liquid chromatography	µL	microliter
MS	mass spectrometry	µm	micrometer
mg	milligram	%	percent
M	molar	%DA	percent degree of acetylation
min	minute		