

การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง

นาย สมพงศ์ นิลมณี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-346-735-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF CYCLODEXTRINS FROM CASSAVA STARCH

Mr. Somponk Nilmanee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2000

ISBN 974-346-735-1

Thesis Title Production of Cyclodextrins from Cassava Starch
By Mr. Somponk Nilmanee
Program Biotechnology
Thesis Advisor Assistant Professor Peerada Mongkolkul, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Sumate Tantratian, Ph.D.

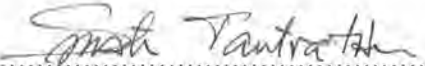
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

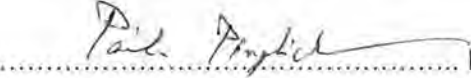

..... Dean of Faculty of Science
(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

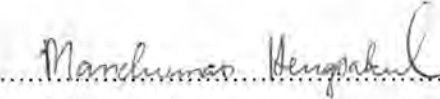
THESIS COMMITTEE


..... Chairman
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Peerada Mongkolkul, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Sumate Tantratian, Ph.D.)


..... Member
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)


..... Member
(Manchumas Hengsakul, Ph.D.)

สมพงษ์ นิลมณี : การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง(Production of Cyclodextrins from Cassava Starch) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.พีรดา มงคลกุล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.สุเมธ ตันตระเจียร, 134 หน้า ISBN 974-346-735-1

จากการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งชนิดต่างๆกันพบว่า แป้งมันฝรั่งและแป้งสาคูจะให้ผลรวมสูงสุด ส่วนแป้งที่ให้ผลผลิตต่ำสุดคือแป้งไรน์ สำหรับแป้งมันสำปะหลังให้ผลผลิตรวม 37% และมีสัดส่วนของ α : β : γ -CD เป็น 2.8:3.7:1 นอกจากนี้ยังพบว่าอะมิโลเพคตินเป็นสับสเตรทที่ดีกว่าอะมิโลส เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอะมิโลสกับผลผลิตของไซโคลเดกซ์ทรินพบว่า ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรง งานวิจัยนี้เลือกแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง 3 ชนิดคือ ความเข้มข้นแป้ง 2.5 g% บ่มกับเอนไซม์ ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) (500 U/g starch) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ได้ผลผลิตรวมประมาณ 35% และสัดส่วนของ α : β : γ -CD เป็น 1.0: 2.8: 1.7 ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการผลิต α - และ β -CD ให้ได้ผลผลิตสูง คือ ความเข้มข้นแป้ง 2.5 g% บ่มกับเอนไซม์ CGTase (1250 U/g starch) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ได้ผลผลิตรวมประมาณ 35% และอัตราส่วนของ α : β : γ -CD เป็น 10.8: 12.7: 1.0 การเตรียมแป้งมันสำปะหลังให้เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยภาวะที่เหมาะสมคือ ความเข้มข้นแป้ง 5 g% ย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนส (96 U/g starch) นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (0.0024 U/g starch) นาน 20 นาที จากการศึกษาถึงขนาดที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินพบว่า DP 9 ที่ได้จากการแยกขนาดของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมิเลส ให้ผลผลิตรวมสูงสุดและได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β -CD ส่วน DP 20-82 ให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น α -CD นอกจากนี้ยังพบว่า DP 26 ที่ได้จากการแยกขนาดของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์พุลลูลานเนสให้ผลผลิตรวมสูงสุดและได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β -CD ส่วน DP 7 จะให้ผลิตภัณฑ์ชนิด α -CD มากกว่า β -CD จากการศึกษาการเพิ่มผลผลิตโดยการเติม complexant พบว่า ปริมาณการเพิ่มผลผลิตและสัดส่วนของ α : β : γ -CD ขึ้นกับชนิดของ complexant ปริมาณเอนไซม์และเวลาที่ใช้ในการบ่ม ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินชนิด α - CD คือเอนไซม์ CGTase (500 U/ g starch) บ่มกับเอทานอล (20% v/v) หรือ ใช้เอนไซม์ CGTase (1,500 U/g starch) ซึ่งไม่มีการเติม complexant นอกจากนี้การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินโดยใช้ 2-butanol (20% v/v) และเอนไซม์ CGTase (500 U/g starch) จะให้ผลผลิต β -CD สูงสุด เมื่อต้องการผลิต γ -CD ในสัดส่วนที่สูงต้องบ่มแป้งกับเอนไซม์ CGTase (50 U/g starch) และเอทานอล (20% v/v)

ภาควิชา.....
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
ปีการศึกษา.....2543.....

ลายมือชื่อนิสิิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4072408423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : CYCLODEXTRIN / CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERAS CASSAVA STARCH.

SOMPONK NILMANEE : PRODUCTION OF CYCLODEXTRINS FROM CASSAVA STARCH.

THESIS ADVISOR : ASST.PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D.

THESIS COADVISOR : ASST.PROF. SUMATE TANTRATION, Ph.D.,134 pp.

ISBN 974-346-735-1

Several kinds of starch were used to be substrate for CGTase from *Bacillus circulans* A11 . It was found that potato and sago starch gave the highest yield. Rye gave the lowest yield. For cassava satrch, the yield was 37% and ratio of α -, β - and γ -CD was 2.8:3.7:1.0. Amylopectic was the better substrate for CGTase than amylose. However, no direct correlation between the amylose and amylopectin contents with % CD yield. To study cassava starch was used as substrate for CGTase, Using gelatinized cassava starch, the optimum condition for total CD and β - CD was incubating 500 U/g starch with 2.5 g% cassava starch for 8 hrs at 40 °C. The total CD yield was 35 % and α : β : γ -CD ratio was 1:2.76:1.66. For α -CD production, the optimum condition was 2.5 g% of cassava starch, CGTase 1,250 U/g starch at 40°C for 16 hrs. Total CD yield was 35% and α : β : γ -CD ratio was 10.8:12.7:1.0. For starch liquefaction step prior to CGTase catalysis, the best condition per gram starch was respective treatment with 96 U pullulanase for 24 hrs and α -amylase 0.0024 U for 20 min. Study on the size of substrate for cyclodextrin production showed that DP 9 fraction from partially purified α -amylase treated cassava hydrolysate gave the highest total CD with β -CD as the major product. Alpha was the major product if fractions of DP 20-82 were used. In addition, DP 26 fraction from partially purified pullulanase treated cassava hydrolysate gave the highest total and β -CD yield. The DP 75 fraction gave more than β -CD but the total yield was considerable less (27% vs 9%). Moreover, addition of complexant into the CGTase reaction mixture was observed. The result obtained indicated that the degree of enhancement and the ratio of α : β : γ -CD varied with kind of complexant, enzyme concentration and time of incubation. The optimum condition for α -CD production was incubation of 2.5 g% gelatinized starch with CGTase 500 U/g starch in the presence of 20% (v/v) ethanol for 36 hrs at 40 °C or with 1,500 U/g starch without any addition of complexant at the same incubation condition. The optimum condition for β -CD production was incubated with CGTase 500 U/g starch and 20% (v/v) 2-butanol at the same incubation condition on α -CD production. The optimum condition for γ -CD production was incubated with CGTase 50 U/g starch in the presence of 20% (v/v) ethanol at the same incubation condition α -CD production.

Department.....-..... Student's signature..... *Sompornk Nilmanee*
Field of study.....Biotechnology..... Advisor's signature..... *Peerada Mongkolkul*
Academic year.....2000..... Co-advisor's signature..... *Sumate Tantration*

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Assistant Professor Peerada Mongkolkul, and co-advisor Assistant Professor Sumate Tantratian for their excellent instruction, invaluable supervision, encouragement and support throughout this thesis. Without their kindness and understanding, this work could not be accomplished.

I am very grateful to Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn and Dr. Manchumas Hengsakul for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

A grant from Shell Centennial Education Fund, Department of Biochemistry and Program of Biotechnology supported this research.

My appreciation is also expressed to National Starch & Chemical (Thailand) for cassava starch and East Asiatic (Thailand) Public Company Limited for enzyme.

I wish to acknowledge the contribution of Biochemistry Department, Faculty of Science, Chulalongkorn University for all laboratory facilities and equipment.

My sincere thanks are extended to all staff members and friends in the Department of Biochemistry and Biotechnology Program for their kindness and assistance.

Finally, I am most grateful to my parents and member of my family for their love, understanding and encouragement in everything.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xii
LIST OF FIGURES.....	xiv
ABBREVIATION.....	xvi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	
2.1 Equipment.....	24
2.2 Materials.....	25
2.3 Chemicals.....	25
2.4 Bacteria.....	26
2.5 Cultivation of bacterial	
2.5.1 Media preparation.....	26
2.5.2 Maintenance of bacterial cultures.....	27
2.6 Enzyme preparation	
2.6.1 Starter inoculum.....	27
2.6.2 Enzyme production.....	28
2.6.3 Partial purification of CGTase.....	28
2.7 Enzyme assay	
2.7.1 Dextrinizing activity assay.....	30
2.7.2 Cyclodextrin-trinchloroethylene(CD-TCE)assay.....	30
2.8 Protein determination.....	31
2.9 Cyclodextrin production	
2.9.1 Process for cyclodextrin production.....	31
2.9.2 Determination of cyclodextrins by High Performance Liquid Chromatography.....	33

2.10 Determination of amylose and amylopectin contents	
2.10.1 Standard amylose and amylopectin.....	33
2.10.2 Starch sample.....	35
2.11 Property of cassava starch	
2.11.1 Cassava starch morphology.....	36
2.11.2 Swelling power and solubility determination.....	36
2.11.3 Pasting profile.....	36
2.11.4 Analysis of linamarin.....	37
2.12 Production of cyclodextrin from cassava starch	
2.12.1 Optimization of condition for cyclodextrin	
Production.....	37
2.12.1.1 Starch concentration.....	37
2.12.1.2 Incubation temperature.....	38
2.12.1.3 CGTase concentration.....	38
2.12.1.4 Incubation time.....	38
2.12.2 Pretreatment of cassava starch with	
Hydrolytic enzymes.....	38
2.12.2.1 Dextrose Equivalent determination.....	39
2.12.2.2 Determination of reducing sugar.....	39
2.12.2.3 Dry weight determination.....	39
2.12.3 Enzymatic treatment of cassava starch	
2.12.3.1 Treatment with α -amylase.....	40
2.12.3.2 Treatment with pullulanase.....	40
2.12.3.3 Treatment with pullulanase	
and α -amylase	40
2.12.3.4 Treatment with pullulanase and	
maltogenic α -amylase or fungal	
α -amylase.....	40
2.12.3.5 Production of cyclodextrin from	
starch hydrolyaste.....	41

2.13 Preparation of short chain cassava starch	
2.13.1 Starch hydrolysis by α -amylase.....	41
2.13.2 Starch hydrolysate by pullulanase.....	41
2.13.3 Gel filtration column chromatography	
2.13.3.1 Preparation Biogel P-10 column.....	42
2.13.3.2 Chromatography of starch hydrolysate on Biogel P-10	42
2.13.4 Determination of DP	
2.13.4.1 Carbohydrate determination.....	43
2.13.4.2 Reducing sugar determination.....	43
2.14 Production of cyclodextrins from starch hydrolysate	
2.14.1 Production of cyclodextrins from fractionated Starch hydrolysate.....	43
2.14.2 Optimazation of cyclodextrin production from Cassava starch hydrolysate	
2.14.2.1 CGTase concentration.....	44
2.14.2.2 Incubation time.....	44
2.15 Production of cyclodextrins in the presence of Complexant	
2.15.1 Effect of ethanol concentration on production.....	44
2.15.2 Effect of incubation time on production in the presence of ethanol.....	44
2.15.3 Effect of aliphatic alcohol and CGTase concentration on cyclodextrin production.....	44
CHAPTER III RESULTS	
3.1 Preparation of partially purified CGTase from <i>Bacillus</i> <i>circulans</i> A11.....	46
3.2 Cyclodextrin production from different kinds of starch.....	45
3.3 Determination of amylose and amylopectin content	
3.3.1 Absorption spectra.....	49
3.3.2 Amylose and amylopectin contents in starches.....	49

3.4 Property of cassava starch	
3.4.1 Starch morphology.....	53
3.4.2 Swelling power and solubility.....	53
3.4.3 Pasting profile.....	53
3.4.4 Linamarin contents.....	61
3.5 Production of cyclodextrins from cassava starch	
3.5.1 Starch concentration.....	61
3.5.2 Incubation temperature.....	61
3.5.3 CGTase concentration.....	63
3.5.4 Incubation time.....	63
3.6 Pretreatment of cassava starch with enzymes	
3.6.1 Treatment with α -amylase.....	67
3.6.2 Treatment with pullulanase.....	70
3.6.3 Treatment with pullulanase and α -amylase.....	70
3.6.4 Treatment with pullulanase and maltogenase α - amylase or fungal α -amylase.....	74
3.7 Production of cyclodextrins from starch hydrolysate	
3.7.1 Production of cyclodextrins from cassava starch treated with α -amylase.....	77
3.7.2 Production of cyclodextrins from cassava starch treated with pullulanase.....	77
3.7.3 Optimization of cyclodextrin production from starch hydrolysate	80
3.7.3.1 Production of cyclodextrin from starch hydrolysate (DP 9).....	80
3.7.3.2 Production of cyclodextrin from starch hydrolysate (DP 26).....	80
3.7.3.3 Production of cyclodextrin from starch hydrolysate (DP 75).....	85
3.8 Production of cyclodextrins in the presence of complexant	

3.8.1 Effect of ethanol concentration on cyclodextrin production.....	85
3.8.2 Effect of incubation time on cyclodextrin production in the presence of ethanol.....	85
3.8.3 Effect of aliphatic alcohol and CGTase concentration on cyclodextrin production.....	89
CHAPTER IV DISCUSSION.....	95
CHAPTER V CONCLUSION.....	105
REFERENCES.....	107
APPENDICES.....	116
BIOGRAPHY.....	134

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Structure and molecular dimension of cyclodextrins.....	2
2. Structure of β -cyclodextrin chemical.....	3
3. Inclusion complex formation between CDs and guest molecules leading to modification of guest physical and chemical properties.....	6
4. Distribution of the 1706 CD relevant abstracts published in 1996 by Cyclodextrin News.....	8
5. The world market usage of all CDs forecast.....	9
6. Schematic representation of the CGTase-catalyzed transglycosylation reaction...	13
7. CGTase from <i>Bacillus circulans</i> 251.....	15
8. Schematic diagram of the structure of a starch granule.....	20
9. Flowsheet for partial purification of CGTase.....	29
10. Flowsheet for the production of cyclodextrins.....	32
11. Production of cyclodextrins from various kinds of starch.....	48
12. Visible light absorption spectra of 20 μ l/ml iodine solution, 8 μ g/ml standard amylose solution (AM), 32 μ g/ml standard amylopectin solution (AP) and the mixture of 8 μ g/ml standard amylose solution plus 32 μ g/ml standard amylopectin solution (AM+AP).....	50
13. Scanning electron micrographs of native cassava starch.....	54
14. Swelling power and solubility profile of cassava starch.....	58
15. Pasting profile of 6%(w/v) cassava starch in distilled water by Brabender Viscoamylograph.....	60
16. Effect of starch concentration on cyclodextrins production.....	62
17. Effect of temperature on cyclodextrins production	64
18. Effect of enzyme concentration on cyclodextrins production	65
19. Effect of incubation time on cyclodextrins production	66
20. Effect of incubation time on cyclodextrins production	68
21. Effect of α -amylase concentration on cyclodextrins production	69
22. Effect of pullulanase treatment on cyclodextrins production.....	72

23. Effect of α -amylase and pullulanase treatment on cyclodextrins production	73
24. Effect of maltogenic α -amylase and pullulanase treatment on cyclodextrins production.....	75
25. Effect of fungal alpha-amylase and pullulanase treatment on cyclodextrins production.....	76
26. Fractionation of cassava hydrolysate by Biogel P-10 chromatography.....	78
27. Production of cyclodextrins from alpha-amylase treated starch hydrolysate...	79
28. Fractionation of cassava hydrolysate with Biogel P-10 chromatography.....	81
29. Production of cyclodextrins from pullulanase treated starch hydrolysate.....	82
30. Cyclodextrin production from DP 9 fractions.....	83
31. Cyclodextrin production from DP 26 fractions.....	84
32. Cyclodextrin production from DP 75 fractions.....	86
33. Effect of ethanol concentration on the cyclodextrin production.....	87
34. Effect of incubation time on cyclodextrin production in the presence of Ethanol.....	88
35. Effect of alcoholic complexants agents on cyclodextrin production.....	91
36. Effect of alcoholic complexants agents on cyclodextrin production.....	92
37. Effect of alcoholic complexants agents on cyclodextrin production.....	94

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Characteristic of cyclodextrins.....	5
2. Properties of cyclodextrin glycosyltransferase.....	10
3. Ratio of α -, β - and γ -CD produced by various CGTase.....	11
4. Percent of amylose and amylopectin in various starch.....	19
5. Partial purification of CGTase form <i>Bacillus circulans</i> A11.....	47
6. Absorptivity of amylose and amylopectin.....	51
7. Amylose and amylopectin contents in starch flour.....	52
8. Pasting properties of 6 g%(w/v) cassava starch in distilled water.....	59
9. Effect of enzyme treatment on the starch and total CD production....	71
10. Summarized results on the effect of alcoholic complexant.....	90

ABBREVIATION

%	percent
°C	degree Celsius
μl	microlitre
CDs	cyclodextrins
CGTase	cyclodextrin glycosyltransferase
g	gram
hr	hour
l	litre
M	molar
μg	microgram
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolar
rpm	revolution per minute
U	unit(s)
v	volume
w,wt	weight