

การตรึงไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสเพื่อใช้ในการผลิตแอสคอร์บิคแอซิดกลูโคไซด์



นางสาวสุปราณี พันระทัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2709-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21039707

IMMOBILIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FOR THE
PRODUCTION OF ASCORBIC ACID GLUCOSIDE



Miss Supranee Pantatan

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

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2709-7

สุปราณี พันระหัน : การตรึงไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสเพื่อใช้ในการผลิตแอสคอร์บิก
 แอซิดกลูโคไซด์ (IMMOBILIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FOR THE
 PRODUCTION OF ASCORBIC ACID GLUCOSIDE) อ.ที่ปรึกษา : ดร. มัญชุมาส เพราะสุนทร,
 130 หน้า, ISBN 974-17-2709-7

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรึงไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) จาก
Paenibacillus sp. A11 และศึกษาการนำเอนไซม์ตรึงไปใช้ในการผลิต 2-O- α -glucopyranosyl- L-ascorbic
 acid (AA-2G) เมื่อทดลองตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีโควาเลนต์บนวัสดุหลายชนิด ได้แก่ อะลูมินา ซิลิกา คาร์บอน และ
 ไคโตแซน โดยใช้กลูทาร์ลดีไฮด์เป็นตัวเชื่อม พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนอะลูมินามีแอกติวิตีสูงสุด เมื่อศึกษาหา
 ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูป CGTase บนอะลูมินา โดยศึกษาตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อการตรึงรูปเอนไซม์ เช่น
 ความเข้มข้นของตัวกระตุ้น สัดส่วนของเอนไซม์ต่อตัวค้ำ และเวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ พบว่าต้องกระตุ้นตัวค้ำ
 ด้วยสารละลายอะมิโนไพโรฟิลไตรเอทอกซีไฮเลนเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์, กลูทาร์ลดีไฮด์เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และ
 ตรึงเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4^oซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยเมื่อใช้เอนไซม์ 14 ยูนิต ต่ออะลูมินา 1 กรัม จะตรึงเอนไซม์ได้
 4.36 ยูนิต คิดเป็น 31.2 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีเอนไซม์ตั้งต้น เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์ตรึงและ
 เอนไซม์อิสระ พบว่าเอนไซม์ตรึงมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 7.0 ขณะที่เอนไซม์อิสระสามารถ
 ทำงานได้ดีที่ pH เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ทั้งสองเท่ากับ 60^oซ และ
 เอนไซม์ทั้งสองภาวะมีความเสถียรต่อ pH อยู่ในช่วง 5.0 ถึง 9.0 แต่เอนไซม์ตรึงจะมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง
 กว่าเอนไซม์อิสระเล็กน้อย จากการศึกษาทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่า K_m ของเอนไซม์ตรึงเป็น
 5.62 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแบ่ง และเอนไซม์อิสระเป็น 0.59 ± 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแบ่ง ส่วนค่า
 V_{max} ของเอนไซม์อิสระเทียบกับเอนไซม์ตรึงเป็น 9.69 ± 0.38 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ 5.82 ± 0.13 หน่วย
 ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และเมื่อเก็บเอนไซม์ทั้งสองที่ 4^oซ และ 25^oซ เป็นเวลา 2 เดือน พบว่าเอนไซม์
 ตรึงมีความเสถียรมากกว่าเอนไซม์อิสระ ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอสคอร์บิกแอซิด-2-กลูโคไซด์ (AA-2G)
 แบบไม่ต่อเนื่องของเอนไซม์ตรึง คือ การบ่มเอนไซม์ตรึงในอัตราส่วน 350 ยูนิตต่อกรัมเบต้าไซโคลเดกซ์ทริน กับ
 เบต้าไซโคลเดกซ์ทรินเข้มข้น 4% แอสคอร์บิกแอซิดเข้มข้น 2% ในสารละลาย pH 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่
 อุณหภูมิ 40^oซ. ภายใต้ภาวะนี้เอนไซม์ตรึงสามารถผลิต AA-2G ได้ 2.92% และมีแอกติวิตีคงเหลือ 74.4% ภายใต้
 หลังการใช้งาน 3 ครั้ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
 ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#, # 4272440623 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD : CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE/ IMMOBILIZATION/
ALUMINA/ ASCORBIC ACID-2-O- α -GLUCOSIDE

SUPRANEE PANTATAN : IMMOBILIZATION OF CYCLODEXTRIN
GLYCOSYLTRANSFERASE FOR THE PRODUCTION OF ASCORBIC
ACID GLUCOSIDE. THESIS ADVISOR: MANCHUMAS
PROUSOONTORN, Ph.D., 130 PP. ISBN 974-17-2709-7

This study aims to immobilize cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Paenibacillus* sp. A11 and characterize the immobilized CGTase for the production of 2-O- α -glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G). CGTase was immobilized on various carriers including alumina, silica, activated carbon and chitosan by covalent linkage using bifunctional agent glutaraldehyde. Alumina was selected among tested carriers, because of the highest immobilized activity. The immobilization parameters such as concentration of coupling agent, enzyme/support ratio and coupling time were optimized. It was determined that the optimum conditions for enzyme immobilization were to activate alumina with 2% γ -aminopropyltriethoxysilane and 1% glutaraldehyde. The activated alumina was then incubated with the enzyme solution for 6 hours at 4°C, using an enzyme to the support ratio of 14 units per gram alumina. The best preparation of immobilized CGTase retained 31.2% of its original activity (4.36 units/g alumina). After immobilization, the optimum pH of immobilized CGTase was shifted from 6.0 to 7.0 whereas optimum temperature remained unaltered (60°C). The pH stability of both free and immobilized enzymes were in the range of 5.0-9.0, whereas the thermal stability of immobilized CGTase was slightly higher than that of the free enzyme. The Michaelis-Menten constant for immobilized CGTase ($K_m = 5.62 \pm 0.20$ mg/ml) was higher than the free enzyme ($K_m = 0.59 \pm 0.25$ mg/ml). The V_{max} value of immobilized CGTase (5.82 ± 0.13 U/mg protein) was lower than the free form (9.69 ± 0.38 U/mg protein). The immobilized CGTase exhibited higher stability than the free enzyme when stored at both 4°C and 25°C for 2 months. When this immobilized enzyme was used in batch production of AA-2G, the optimal conditions were to incubate 350 units/g β -cyclodextrin of immobilized CGTase with 4% (w/v) β -cyclodextrin and 2% (w/v) ascorbic acid in the reaction pH of 5.0, for 24 hours at 40°C. Under these conditions, the immobilized CGTase produced AA-2G with 2.92% yield and retained its activity up to 74.4% after being used for 3 cycles.

Department/Program.....Biochemistry.....Student's signature.....*A. Pantatan*.....

Field of study.....Biochemistry.....Advisor's signature.....*Manchumas Prousoontorn*.....

Academic year.....2002.....Co-advisor's signature.....-.....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my impressive advisor, Dr. Manchumas Prousoontorn, for her excellent instruction, guidance, encouragement and comment throughout this thesis, and to Dr. Alisa Wangnai whose critical comments and suggestions in HPLC analysis have been enormous help. Without their kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi, Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat and Assistant Professor Dr. Tipaporn Limpaseni for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

My appreciation is also expressed to Mrs. Patcharawan Jongmewasana and Ms. Kuanta Kwangwanshiratada of the National Science and Technology Development Agency and Mr. Surasak Laloknam for their helps in HPLC analysis.

Sincere thanks are extended to all staff members and friends of the Biochemistry Department Faculty of Science, Chulalongkorn University, especially Mr. Wanchai Yenpetch, Ms. Srikul Kantajai and Ms. Kanyanee Samiphak, for their kind assistances, friendship and helpfulness.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents and my sister for their unlimited love, support and understanding.

This research was supported in part by the Grant from Graduated School.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	30
2.1 Equipments.....	30
2.2 Chemicals.....	31
2.3 Bacteria.....	32
2.4 Media preparation.....	32
2.5 Cultivation of bacteria and enzyme production.....	32
2.6 Purification of CGTase.....	33
2.7 Immobilization of CGTase.....	35
2.8 Optimization of CGTase immobilization.....	36
2.9 Enzyme assay.....	37
2.10 Protein determination.....	37
2.11 Calculation of the immobilization yield.....	38
2.12 Characterization of the catalytic properties of the free and immobilized CGTase.....	38

CONTENTS (continued)

	Page
2.12.1 Effect of pH on the activity of immobilized and free CGTase.....	38
2.12.2 pH stability.....	39
2.12.3 Effect of temperature on the activity of immobilized and free CGTase.....	39
2.12.4 Thermal stability.....	39
2.12.5 Kinetic determination.....	40
2.12.6 Storage stability.....	40
2.13 Synthesis of ascorbic acid-2-glucoside with CGTase.....	40
2.14 Assay for AA-2G formation by HPLC.....	41
2.15 Determination of suitable conditions for the production of AA-2G by immobilized CGTase.....	42
2.16 Batch reusability of immobilized CGTase for AA-2G production.....	43
 CHAPTER III RESULTS	
3.1 Partial purification of CGTase.....	44
3.2 Optimization of the for CGTase immobilization procedure	
3.2.1 Selection of a suitable support.....	47
3.2.2 Effect of APTS concentration.....	48
3.2.3 Effect of glutaraldehyde concentration.....	48
3.2.4 Effect of enzyme concentration.....	50
3.2.5 Effect of coupling time.....	50

CONTENTS (continued)

	Page
3.3 Characterization of the free and immobilized CGTase.....	55
3.3.1 pH optimum and pH stability.....	55
3.3.2 Optimum temperature.....	57
3.3.3 Energy of activation.....	57
3.3.4 Thermal stability.....	57
3.3.5 Kinetic parameters.....	60
3.3.6 Storage stability.....	60
3.4 Synthesis of 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid by <i>Paenibacillus</i> sp. A11 CGTase	
3.4.1 Soluble CGTase.....	65
3.4.2 Immobilized CGTase.....	67
3.5 Determination of suitable conditions for AA-2G production by immobilized CGTase.....	82
3.5.1 Effect of pH.....	81
3.5.2 Effect of temperature.....	82
3.5.3 Effect of incubation time.....	82
3.5.4 Effect of AA concentration.....	82
3.6 Batch reusability of immobilized CGTase for AA-2G production	87
CHAPTER IV DISCUSSIONS.....	89
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	108
REFERENCES.....	110
APPENDICES.....	121
BIOGRAPHY.....	130

LIST OF TABLES

Table	Page
1. Physical Properties of L-ascorbic acid.....	2
2. Ascorbic acid contents of some uncooked foods.....	9
3. Industrial applications of L-ascorbic acid.....	11
4. Summary of CGTase mechanisms.....	20
5. Relationship between length of substrate and mechanisms of CGTase	20
6. Properties of bacterial cyclodextrin glycosyltransferases.....	22
7. Comparison of the attributes of different classes of immobilization techniques.....	26
8. Purification of CGTase from <i>Paenibacillus</i> sp. A11.....	45
9. Summary of some properties of the free and immobilized CGTase on alumina.....	64
10 Covalent immobilization of CGTases reported in literature.....	97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figures	Page
1. Isomers of ascorbic acid.....	3
2. The biosynthesis of L-ascorbic acid.....	5
3. Chemical synthesis of L-ascorbic acid.....	6
4. Degradation of ascorbic acid	12
5. Derivatives of L-ascorbic acid.....	16
6. Schematic representation of the CGTase-catalyzed transglycosylation reactions.....	19
7. Schematic diagram illustrating the preparation of partial purified CGTase.....	34
8. Schematic diagram showing an approach of covalent attachment of CGTase to inorganic carriers.....	46
9. Immobilization of CGTase using different support materials.....	49
10. Influence of APTS concentration on the amount of CGTase immobilized on alumina.....	49
11. Influence of glutaraldehyde concentration on the amount of CGTase immobilized on alumina.....	51
12. Effect of the amount of CGTase applied on the exhibited activity of immobilized CGTase.....	51
13. Effect of coupling time on the amount of CGTase immobilized on alumina.....	52

LIST OF FIGURES (continued)

Figures	Page
14. The optimal conditions for CGTase immobilization on alumina by covalent method.....	54
15. Effect of pH on the activity of free and alumina immobilized CGTase.....	56
16. pH stability of free and alumina immobilized CGTase.....	56
17. Effect of temperature on the activity of free and alumina immobilized CGTase.....	58
18. Arrhenius plots of free and alumina immobilized CGTase.....	58
19. Effect of temperature on the stability of free and alumina immobilized CGTase on.....	59
20. Effect of starch concentration on the initial reaction rate of the Immobilized CGTase.....	61
21. Effect of starch concentration on the initial reaction rate of the soluble CGTase.....	62
22. Storage stability.....	63
23. HPLC chromatograms of AA-2-oligosaccharides (AA-2G _n) formation with CGTase from <i>Paenibacillus</i> sp. A11.	69
24. HPLC chromatograms of AA-2-oligosaccharides (AA-2G _n) formation with soluble CGTase from <i>Paenibacillus</i> sp. A11.	72
25. Effect of substrate concentration on the amount of AA-2G formed and production yield	76

LIST OF FIGURES (continued)

Figures	Page
26 HPLC chromatograms of AA-2-oligosaccharides (AA-2G _n) formation with immobilized CGTase from <i>Paenibacillus</i> sp. A11.	76
27 Effect of glucoamylase on the digestion of AA-2G _n	79
28 Effect of pH on the AA-2G production by immobilized CGTase.....	84
29 Effect of temperature on the AA-2G production by immobilized CGTase.....	84
30 Time-course of AA-2G production with immobilized CGTase.....	85
31 Time-course of AA-2G production with soluble and immobilized CGTase.....	85
32 Effect of ascorbic acid concentration on AA-2G production by immobilized CGTase.....	86
33 AA-2G production by immobilized CGTase at the optimal condition	86
34 Batch reusability of immobilized CGTase on alumina for AA-2G production.....	88
35 Carrier activation and covalent coupling to CGTase.....	97

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

A	absorbance
BSA	bovine serum albumin
CD	cyclodextrin
CGTase	cyclodextrin glycosyltransferase
cm	centrimeter
mm	millimeter
°C	degree Celsius
Da	dalton
g	gram
h	hour
l	liter
min	minute
μl	microliter
ml	milliliter
mM	millimolar
M	molar
nm	nanometer
rpm	revolution per minute
t _R	retention time