การผลิตน้ำตาลแอมิโนจากไคทินของแกนหมึกโดยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจากรา

นางสาว กฤษณา อุ้ยนิรันดรกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-3724-6

PRODUCTION OF AMINOSUGAR FROM SQUID PEN CHITIN BY FUNGAL BIOCATALYST

Miss Krissana Auynirundronkul

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 974-17-3724-6

Thesis Title	: Production of aminosugar from squid pen chitin by fungal biocatalyst
By	: Miss Krissana Auynirundronkul
Field of Study	: Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor	: Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt, Ph.D.
Thesis Co-advisor	: Assistant Professor Hunsa Punapayuk, Ph.D.

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

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

Thesis Committee

.....Chairman
(Associate Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)

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

..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Hunsa Punapayuk, Ph.D.)

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

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

กฤษณา อุ้ยนิรันดรกุล: การผลิตน้ำตาลแอมิโนจากไคทินของแกนหมึกโดยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพจากรา (PRODUCTION OF AMINOSUGAR FROM SQUID PEN CHITIN BY FUNGAL BIOCATALYST) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. มงคล สุขวัฒนาสินิทธิ์; อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ; 68 หน้า ISBN 974-17-3724-6

ได้ทดสอบรา 5 สปีชีส์คือ *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma reesei* และ *Mucor sp.* สำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยไคติน รา *Aspergillus fumigatus* สามารถชักนำให้เกิดเอนไซม์ได้สูงที่สุดโดยให้แอคติวิตีสูงถึง 438 mU/mL เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 °C ในคอลลอยดอลไคติน และมีปริมาณโปรตีนเป็น 1.70 mg/mL ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเบต้าไคตินโดยเอนไซม์ย่อยไคตินที่ผลิตจากรา *Aspergillus fumigatus* ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเอ็น-แอซิทิล-ดี-กลูโคซามีนในเปอร์เซ็นสูง (มากกว่า 70 % ใน 1 วัน) อัตราส่วนที่เหมาะสมของเอนไซม์ต่อไคตินคือ 1-4 mU/mg ที่ความเข้มข้นของซับสเตรทเป็น 20 mg/mL ช่วง pH ที่เหมาะสมคือ 3-5และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 45 °C ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถทำได้โดยไม่ต้องมีบัฟเฟอร์ซึ่งง่ายต่อการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์ในระดับการผลิต

หลักสูตร ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2546 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4473411823: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE
KEY WORD: β-CHITIN / CHITINOLYTIC ENZYME / ENZYMATIC HYDROLYSIS

KRISSANA AUYNIRUNDRONKUL: PRODUCTION OF AMINOSUGAR FROM SQUID PEN CHITIN BY FUNGAL BIOCATALYST. THESIS ADVISOR: ASST.PROF.MONGKOL SUKWATTASINITT, Ph.D.; THESIS CO-ADVISOR: ASST.PROF. HUNSA PUNAPAYUK, Ph.D., 68 pp. ISBN 974-17-3724-6.

Five species of fungi, *Aspergillus fumigatus*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma aureoviride*, *Trichoderma reesei* and *Mucor sp.* were tested for production of chitinolytic enzymes. *Aspergillus fumigatus* was the most active fungus to be induced for production of chitinolytic enzymes. The ensemble of chitinolytic enzymes were produced from *Aspergillus fumigatus* with the maximum chitinolytic activity of 438 mU/mL at 40 °C in colloidal chitin minimum medium after 9 days of incubation. The enzyme preparation contained 1.70 mg protein per milliliter. The hydrolysis of β- chitin with the chitinolytic enzymes from *Aspergillus fumigatus* gave *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) with high yields (over 70 % in 1 days). The optimum ratio of enzyme to chitin was found to be 1-4 mU/mg with optimum substrate concentration at 20 mg/mL. The optimum pH range was 3-5 and the optimum temperature was 45 °C. The hydrolysis could be carried out without any buffer that would simplify the product purification in a preparative scale.

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

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to sincerely thank to her advisors, Assistant Professor Mongkol Sukwattanasinitt, and Assistant Professor Hunsa Punapayuk for their advice, help and suggestions the way to be good in study, research and chemistry. Their kind suggestions motivated the author with strength and happiness to do this thesis. Although, this thesis had obstacles, finally it could be completed by their advice.

In addition, the author is grateful to Professor Supawan Tantayanon chirman, and to Assistant Professor Warinthorn Chavasirias, thesis examiners, for all valuable comments regarding this thesis. And Dr. Rath Pichyangura, thesis examiners the author would like to thank for advice, help and kindly suggestion.

Moreover, the author would like to thank M.L. Siripastr Jayanta for her kindness, advice, help, and suggestions.

Special thanks are expanded to Mr. Akamol Klaikherd, Miss. Wasinee Prakobkij and Mr. Khanchai Danmek to succor my thesis. The author also greatest thanks to Scientific and Technological Research Equipment Center of Chulalongkorn University, Chulalongkorn University for giving the opportunity to study, laboratory facilities, chemicals and equipment. Finally, the author would like to thank my parents, my friends, MS group and Plant Biomass Utilization Research Unit members for strong moral support.

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

CONTENTS

CONTENTS (Continued)

Page

CONTENTS (Continued)

Page

CONTENTS (Continued)

Page

LIST OF FIGURES

Figures

CONTENTS (Continued)

Figures

LIST OF TABLES

List of Abbreviations

α	alpha
β	beta
°C	degree celsius
cm	centimeter
DI-water	deionized water
γ	gramma
g	gram (s)
GlcNAc	*N*-acetyl-D-glucosamine
$(GlcNAc)_2$	*N,N'*-diacetylchitobiose
$(GlcNAc)_3$	*N,N',N"*-triacetyl-chitotriose
$(GlcNAc)_4$	*N,N',N",N"'*–tetraacetyl-chitotetrose
GlcN	D-glucosamine
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
mg	milligram
M	Molar
min	minute
mL	milliliter
mM	millimolar
mU	milliunit
ppm	part per million
U	unit
µL	microliter
%	percent