



b10743'08

**STUDIES ON IMMOBILISATION OF β -GLUCOSIDASE/
 β -FUCOSIDASE FROM *Dalbergia Cochinchinensis* PIERRE
(THAI ROSEWOOD) SEEDS**

SIRINUN NILWARANGKON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)**

**With compliments
of**

ศาสตราจารย์ ดร. วิจิตร วัฒนานนท์

**IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

1997

TH

S619/2

1997

ไพราโนไซด์ของเอนไซม์เบต้า-ฟิวโคไซด์ พบว่าเกิดขึ้นได้ดีในช่วง พีเอช ๔.๐ ถึง ๕.๐ ซึ่งตรงกันกับเอนไซม์อิสระ จากการศึกษาด้านจลศาสตร์ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนถ่านต่อสับเสตรพาราไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไพรา-โนไซด์ และเบต้า-ดี-ฟิวโคไพราโนไซด์ ได้ค่า K_m เท่ากับ ๕.๔๗ และ ๐.๗๓ มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากเอนไซม์อิสระ ซึ่งมีค่าเท่ากับ ๕.๔๗ มิลลิโมลาร์ สำหรับพาราไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ และ ๐.๗๓ มิลลิโมลาร์ สำหรับพาราไนโตรฟีนิล-เบต้า-ดี-ฟิวโคไพราโนไซด์

เมื่อนำความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (๐.๑, ๐.๒ และ ๐.๔ ยูนิต) ของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนถ่านไปใช้สังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น ๕๐ เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นสับเสตรภายใต้อุณหภูมิสูง (๕๐ องศาเซลเซียส) พบว่าความเข้มข้นที่ ๐.๒ ยูนิตของเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนถ่าน เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ เนื่องจากปฏิกิริยาที่ไม่ช้าเกินไปและไม่ถึงภาวะสมดุลเร็วเกินไป และให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ต่อยูนิตเอนไซม์สูงสุด ความเข้มข้นของเอนไซม์อิสระที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์คือ ๐.๒ ยูนิตเหมือนกัน เมื่อตรวจสอบโอลิโกแซคคาไรด์ใน ๘ วันแรกของการสังเคราะห์ พบว่าเจนท์ไอโอบีโอสเป็นไดแซคคาไรด์ตัวแรกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและมีปริมาณมากที่สุด ซึ่งสามารถมองเห็นได้จาก อินเลเยอร์-โครมาโตกราฟีในวันที่ ๕ ของการสังเคราะห์

จากการศึกษาการนำเอนไซม์ที่ถูกตรึงบนถ่านกลับมาใช้ใหม่ พบว่าสามารถนำกลับมาใช้ได้อย่างน้อย ๒ ครั้งโดยทำการสังเคราะห์ครั้งละ ๕ วัน พบว่าในแต่ละครั้งของการนำกลับมาใช้ใหม่นั้นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้มีปริมาณเท่าๆกันทุกครั้ง เมื่อเทียบปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมดที่ได้จากการนำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่กับเอนไซม์อิสระที่ทำการสังเคราะห์เป็นเวลา ๑๕ วัน พบว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึงให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมดมากกว่าเอนไซม์อิสระ แต่ให้ปริมาณไตรแซคคาไรด์ในปริมาณทั้งหมดที่พอๆกัน เมื่อทำการล้างถ่านที่มีเอนไซม์ติดอยู่ด้วยน้ำกลั่น ๒ ครั้งตามด้วย ๕ เปอร์เซ็นต์ และ ๑๐ เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ผลปรากฏว่ามีไดแซคคาไรด์ และน้ำตาลที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าไดแซคคาไรด์หลุดออกมาด้วย

Thesis Title	Studies on Immobilisation of β - Glucosidase/ β -Fucosidase from <i>Dalbergia</i> <i>cochinchinensis</i> Pierre (Thai Rosewood) Seeds
Name	Sirinun Nilwarangkoon
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisory Committee	M.R. Jisnuson Svasti, Ph.D. Pichit Tosukhowong, Ph.D. Prayad Komaratat, Ph.D
Date of Graduation	3 June B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

A crude preparation of β -glucosidase/ β -fucosidase from the seeds of Thai Rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) was obtained by ammonium sulphate precipitation, a good step in removing a large amount of proteins, with a good recovery of β -glucosidase and β -fucosidase. The fold purification of β -glucosidase and β -fucosidase in the 35-75% ammonium sulphate fraction was 4.73 and 4.33 with yield of 60.85% and 55.75% respectively.

The supports used for immobilisation were activated carbon (Merck) and celite (Fluka). The enzyme was also cross-linked with bovine serum albumin (BSA) by 0.3% (w/v) glutaraldehyde. Four-hundred milliunits of crude β -glucosidase could be immobilised on 12.5 mg of activated carbon with about 50 % immobilisation. For celite, only 100 mU of crude β -glucosidase could be immobilised on 12.5 mg support with 60%

immobilisation. The percent immobilisation of crude enzyme cross-linked with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) using glutaraldehyde was about 3%.

Enzyme immobilised on activated carbon and on celite were less stable at 50°C than free enzyme, and this may be due to the alterations of structure upon immobilisation. The pH optimum of crude enzyme immobilised on activated carbon was similar to that of free enzyme, namely about pH 4-5. K_m of crude enzyme immobilised on charcoal for pNP- β -D-glucopyranoside was 4.57 ± 0.03 mM and for pNP- β -D-fucopyranoside was 0.94 ± 0.08 mM. The K_m of free enzyme for both substrates were similar to immobilised enzyme (5.47 ± 0.4 mM for pNP- β -D-glucopyranoside and 0.73 ± 0.05 mM for pNP- β -D-fucopyranoside).

Enzyme concentrations were varied (0.1, 0.2 and 0.4 U) for both free and immobilised enzyme for use in oligosaccharide synthesis. For free enzyme, 0.2 U β -glucosidase was the most appropriate concentration since it gave a moderate rate of synthesis and with highest yield of oligosaccharide at equilibrium. For immobilised enzyme, 0.2 U enzyme was also the most appropriate concentration, since it gave the highest yield per unit enzyme. From the time course of synthesis in the first 8 h for both free and immobilised enzyme, gentiobiose (glucose- β -1-6-glucose) was the first and major product being synthesised. The results from thin-layer chromatography show that gentiobiose can be readily seen at day 5 of synthesis for both free and immobilised enzymes.

Immobilised enzyme of 0.2 U was re-used twice to synthesise oligosaccharide over periods of 5 days. The results show higher total disaccharide products than free enzyme that has been used to synthesise oligosaccharide for 15 days but the amount of trisaccharides were the same for both free and immobilised enzyme. Each usage of immobilised enzyme

showed no dramatic difference in oligosaccharide products, which were almost the same as free enzyme. After two re-uses, immobilised enzyme was washed with distilled water twice, followed by 5% and 10% ethanol. The elution profile of oligosaccharide from activated carbon shows a detectable quantity of disaccharide and other higher oligosaccharides eluted out.

