2 1 JUL 2000

STUDIES ON THE PRODUCTION OF OLIGOSACCHARIDES

WEERANUCH PLUEMSAB

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2000

ISBN 974-664-402-5

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

Copyright by Mahidol University

TH
W398s
2000
c.2
44982 c.2

4036485 SCBT/M : MAJOR : BIOTECHNOLOGY ; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORDS : GALACTO-OLIGOSACCHARIDES, β-GALACTOSIDASE, *TRICHOSPORON BEIGELII.*

WEERANUCH PLUEMSAB : STUDIES ON THE PRODUCTION OF OLIGOSACCHARIDES. THESIS ADVISORS: PAIROJ LUANGPITAKSA, Ph.D., SAROTE SIRISANSANEEYAKUL, Dr.rer.nat., SOMCHAI CHAUVATCHARIN, Ph.D., SITTIWAT LERTSIRI, Ph.D. 129 P. ISBN 974-664-402-5

Microorganisms producing β-galactosidase were isolated from soil samples by growing them on minimal medium containing 20 g/l of lactose. Among 28 strains, one yeast and three bacterial isolates were screened by visualizing the lactose hydrolysate by Thin Layer Chromatography. Strain identification revealed that the yeast and the bacterial isolates were *Trichosporon beigelii* and *Bacillus megaterium*, respectively. Four isolates were cultured under aerobic conditions in a fermentor using lactose (20 g/l) as a carbon source to study fermentation kinetics in order to select the most suitable isolate for the production of β-galactosidase. *T. beigelii* showed maximum β-galactosidase productivity (Q_P = 90 U/l/h). Its β-galactosidase localization was found at the cell debris portion. Under testing an ability in oligosaccharide production, trisaccharides and tetrasaccharides were detected and clarified by High Performance Liquid Chromatography. The optimum conditions for hydrolyzing and galactosyltransferring activities were found in 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 300 g/l lactose at 45^0C. Under studies on substrate specificity, the enzyme could produce oligosaccharides from maltose and cellobiose, but not from soluble corn starch, xylose, sucrose, and sago starch. The maximum production of galacto-oligosaccharides (Gal-OS) was 55.1 g/l ($Y_{P/S}$ = 0.48 g Gal-OS/g lactose) from 300 g/l lactose and 30.40 U enzyme/g lactose at 45^0C. The best model corresponding to the experimental results was a Michaelis-Menten model with competitive inhibition by glucose on irreversible lactose hydrolysis corporated with reversible reactions of oligosaccharide formation.

Copyright © by Mahidol University

4036485 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

วีรานุช ปลื้มทรัพย์ : การศึกษาการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (STUDIES ON THE PRODUCTION OF OLIGOSACCHARIDS). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ :ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, Ph.D., สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, Dr.rer.nat., สมชาย เชื้อวัชรินทร์, Ph.D., สิทธิวัฒน์ เลิศ ศิริ, Ph.D. 129 หน้า ISBN 974-664-402-5

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์บีต้า-กาแลกโทซิเดสถูกแยกจากตัวอย่างดิน โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยแลกโทสความเข้มข้น 20 กรัม/ลิตร จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด 28 สายพันธุ์ พบยีสต์ 1 สายพันธุ์และแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-กาแลกโทซิเดสโดยใช้วิธี TLC ในการตรวจสอบ ซึ่งพบว่ายีสต์และแบคทีเรียดังกล่าวเป็น *Trichosporon beigelii* และ *Bacillus megaterium* ตามลำดับ เชื้อดังกล่าวถูกเลี้ยงในถังหมักภายใต้สภาวะการให้อากาศ เพื่อศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์บีต้า-กาแลกโทซิเดสได้ดีที่สุด ซึ่งยีสต์ *T. beigelii* แสดงค่าอัตราการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวสูงสุด (Q_P = 90 U/l/h) และพบว่าตำแหน่งของกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวอยู่ที่บริเวณผนังเซลล์ จากการวิเคราะห์ชนิดของโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื้อผลิตได้โดยวิธี HPLC พบว่าเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3 และ 4 โมเลกุล สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ไฮโดรลิซิสและการถ่ายโอนหมู่กาแลกโทซิลของเอนไซม์บีต้า-กาแลกโทซิเดสคือสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟต (พีเอช 7.0) ที่อุณหภูมิ 45°C ซึ่งต้องประกอบด้วยแลกโทสความเข้มข้นสูง 300 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์สามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ เมื่อใช้มอลโทสและเซลโลไบโอสเป็นสับสเทรต แต่ไม่สามารถผลิตได้จากแป้งข้าวโพด ไซโลส ซูโครส และแป้งสาคู สำหรับปริมาณกาแลกโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Gal-OS) ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 55.1 กรัม/ลิตร เมื่อใช้แลกโทสความเข้มข้นเริ่มต้น 300 กรัม/ลิตร และเอนไซม์ 30.40 ยูนิต/กรัม แลกโทส ที่อุณหภูมิ 45°C (ผลได้เท่ากับ 0.48 กรัม Gal-OS/กรัม แลกโทส) แบบจำลองที่สอดคล้องกับผลการทดลองมากที่สุดประกอบด้วยจลนพลศาสตร์ไมเคิลลิส-เมนเทนที่มีการยับยั้งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของแลกโทสด้วยกลูโคสแบบแข่งขันไม่ย้อนกลับ ร่วมกับกลไกของปฏิกิริยาการสร้างโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบย้อนกลับ

Copyright by Mahidol University