การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเจ้า

นางสาว ทิพย์สุภา มาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ 2538

ISBN 974-632-218-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17840016

CYCLODEXTRIN PRODUCTION FROM RICE STARCH

Miss Tipsupar Malai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Program of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
1995

ISBN 974-632-218-4

Thesis Title CYCLODEXTRIN PRODUCTION FROM RICE STARCH

By Miss Tipsupar Malai

Program Biotechnology

Thesis Advisor Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree/

..... Dean of Graduate School

(Associate Professor Santi Thoongsuwan, Ph.D.)

Thesis Committee

..... Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)

..... Member

(Somporn Kamolsiripichaiporn, Ph.D.)

ทิพย์สุภา มาลัย : การผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเจ้า (CYCLODEXTRIN PRODUCTION FROM RICE STARCH) อ. ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 112 หน้า. ISBN 974-632-218-4

จากการศึกษาการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน (CD) จากแป้งข้าวเจ้า พบว่าการเตรียมสับสเตรทแป้งด้วยเอนไซม์ α-amalyse ทำให้ได้สับสเตรทที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน โดยสภาวะในการเตรียมสับสเตรทคือ แป้งข้าวเจ้า (10 g %) ย่อยด้วย α-amylase (0.1 %, w/v) ที่อุณหภูมิ 50°ซ เป็นเวลา 15 นาที หลังจากหยุดปฏิกริยาของ α-amylase โดยการต้ม สับสเตรทแป้งที่ได้จะนำไปใช้ในการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน โดยบ่มกับเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) จาก *Bacillus* sp. A 11 ซึ่งในขั้นตอนการผลิตได้ศึกษาการใช้คอมเพล็กซิงเอเจนต์ (complexing agent) ร่วมในการผลิตด้วย โดยพบว่าระบบที่ใช้คอมเพล็กซิงเอเจนต์ชนิดเดียวได้ผลดีกว่าระบบที่ใช้คอมเพล็กซิงเอเจนต์ 2 ชนิด และพบว่าไซโคลเฮกเซนเป็นสารที่มีความเหมาะสมที่สุด เมื่อพิจารณาจากผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือไซโคลเฮกเซนช่วยเพิ่มผลผลิตไซโคลเดกซ์ทรินประมาณ 2 เท่า และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคือ แป้งที่ผ่านการเตรียมแล้วบ่มกับเอนไซม์ CGTase (25 Units/g starch) และไซโคลเฮกเซน (5%, v/v) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเลือกผลิตไซโคลเดกซ์ทรินต่างชนิดได้ โดยการแปรผันความเข้มข้นของสับสเตรทแป้ง หรือความเข้มข้นของเอนไซม์ CGTase โดยสับเสตรทแป้ง (< 5 g%) และเอนไซม์ CGTase (> 200 Units/g starch) จะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น α-CD ขณะที่สับสเตรทแป้ง (10-30 g%) และเอนไซม์ CGTase (< 200 Units/g starch) จะให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น β-CD จากการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวระบบความดันสูง (HPLC) พบว่ามีโอลิโกแซคคาไรด์สายตรงได้แก่ มอลโตเดตระโอส (G_4), มอลโตเพนตะโอส (G_5), มอลโตเฮกซะโอส (G_6) ปนอยู่กับพีคของ CDs จึงได้ศึกษาการกำจัด โดยใช้เอนไซม์ amyloglucosidase หรือ β-amylase จากการทดลองพบว่า β-amylase (20 Units, 1 hr, 25°C) สามารถย่อย G_4-G_6 ได้หมดโดยไม่ทำลายผลิตภัณฑ์ไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง 3 ชนิด จากการใช้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวในการผลิตไซโคลเดกซ์ทรินจากแป้งข้าวเจ้าและไซโคลเฮกเซนเป็นคอมเพล็กซิงเอเจนต์ จะได้ β-CD 42 g% หลังจากย่อยโอลิโกแซคคาไรด์สายตรงด้วย β-amylase จะได้ β-CD 34 g% (80 % recovery) และหลังจากผ่านการดกผลึกพบว่าการดกผลึกเพียงครั้งเดียวก็สามารถแยก β-CD ที่บริสุทธิ์ได้ 12 g% (28 % recovery, 95 % purity).

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต ทิพย์สุภา มาลัย

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C526611 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD : CYCLODEXTRIN / CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE
TIPSUPAR MALAI : CYCLODEXTRIN PRODUCTION FROM RICE STARCH. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., 112 pp. ISBN 974-632-218-4

The present study aims at the development of efficient cyclodextrin production from rice starch. The result demonstrated that pretreatment of rice starch with the enzyme α-amylase was necessary for high cyclodextrin yield. Appropriate conditions were 10 g % of rice starch treated with 0.1 % α-amylase at 50 °C for 15 minutes. The pretreated starch was subsequently used for cyclodextrin production by the action of the enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from *Bacillus* sp. A 11. With the use of complexing agent, cyclohexane, which was selected as the solvent of choice, the production yield of cyclodextrins was twice of that without complexing agent. The optimum conditions were pretreated starch incubated with CGTase (25 Units/g starch) and cyclohexane(5 %,v/v) for 18 hours. Furthermore, preference production of certain cyclodextrin could be achieved by varying the concentration of rice starch or CGTase used. Less than 5 g % starch and more than 200 Units CGTase/g starch mainly yielded α-CD, while 10-30 g % starch and less than 200 Units CGTase/g starch resulted in β-CD as the major product. Besides cyclodextrins, some non-cyclic (linear) oligosaccharides were also detected in the reaction products, as analyzed by HPLC. Those overlapped with CD peaks were maltotetraose (G_4), maltopentaose (G_5), maltohexaose (G_6). Amyloglucosidase and β-amylase were used in the attempt to differentiate the linear from the cyclic oligosaccharides. It was found that β-amylase (20 Units, 1 hr, 25°C) completely digested linear oligosaccharides (G_4-G_5) without destroying the cyclodextrin products. By using cyclohexane in the production of cyclodextrins, the crude β-CD obtained was 42 g %, which constituted for most of the CDs (total CDs was 44 g %). If purer β-CD is preferred, β-amylase treatment which yielded 34 g % β-CD (80 % recovery) and crystallization at 4°C were performed. By the 1st crystallization, the β-CD crystals obtained was about 12 g % (28 % recovery, 95 % purity).

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต ทิพย์สภา มาลัย

สาขาวิชา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, for her excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without her kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My sincere gratitude is extended to Dr. Tipaporn Limpaseni, Dr. Somporn Kamolsiripichaiporn and Dr. Sirirat Rengpipat for serving as thesis committee, for their constructive comments and also valuable suggestions.

My appreciation is also expressed to Dr. Suganya Soontaros, Dr. Vichien Rimpanichayakit for their kindness, encouragement and worthy suggestions.

My gratitude is also extended to the Graduate School for supporting the research fund.

Sincere thanks are also expressed to all staff members and students of the Biochemistry Department for their help in the laboratory and discussion with sincerity and friendships. Special thanks are also extended to Pee Yui, Pee Jira, Pee Nong, Pee Fon for their kindness, willpower and suggestions.

My appreciation is also expressed to Khun Kitisak Kobkuwattana for his willpower, understanding and encouragement.

Finally, the greatest indebtedness is expressed to my father and mother for their unlimited love, understanding and encouragement.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT....iv

ENGLISH ABSTRACT....v

ACKNOWLEDGEMENT....vi

CONTENTS....vii

LIST OF TABLES....xi

LIST OF FIGURES....xiii

ABBREVIATION....xv

CHAPTER

I INTRODUCTION....1

II MATERIALS AND METHODS

Equipments....23

Chemicals....23

Bacteria....24

Media preparation....25

Cultivation of bacteria....25

Enzyme assay....26

1. Dextrinizing activity assay....26

2. Cyclodextrin-Trichloroethylene (CD-TCE) assay....26

Protein determination....27

Analysis of cyclodextrins....27

Dextrose Equivalent (DE) determination....28

Purification of CGTase....29

Cyclodextrin production....29

Page

1. Optimization of pretreatment steps.....31

1.1 Effect of α-amylase concentration and Dextrose Equivalent (DE) of starch on the formation of cyclodextrins.....31

1.2 Effect of incubation time of pretreatment of starch on the formation of cyclodextrins.....33

1.3 Effect of starch concentration on the formation of cyclodextrins.....33

2. Optimization of production steps (without complexing agent).....33

2.1 Effect of CGTase concentration on the formation of cyclodextrins.....33

2.2 Time course of cyclodextrin production.....33

3. Optimization of production steps (with complexing agent).....34

3.1 Effect of complexing agent on CGTase activity.....34

3.2 Effect of CGTase concentration on the formation of cyclodextrins in the presence of complexing agent.....34

3.3 Time course of cyclodextrin production in the presence of complexing agent.....34

3.4 Effect of complexing agent concentration on the production yield of cyclodextrins.....35

4. Product separation.....35

4.1 Separation of cyclodextrins from non-cyclic products.....35

4.2 Separation of β-CD from cyclodextrin mixtures.....35

III RESULTS

Partial purification of CGTase from *Bacillus* sp. A 11.....38

Page

Cyclodextrin production....40

1. Rice starch vs Soluble starch....40
2. Pretreatment of rice starch....41
3. Optimization of pretreatment steps....41
   3.1 Effect of α-amylase concentration and Dextrose Equivalent (DE) of starch on the formation of cyclodextrins....41
   3.2 Effect of incubation time of pretreatment of starch on the formation of cyclodextrins....46
   3.3 Effect of starch concentration on the formation of cyclodextrins....46
4. Optimization of production steps (without complexing agent)....48
   4.1 Effect of CGTase concentration on the formation of cyclodextrins....48
   4.2 Time course of cyclodextrin production....52
5. Optimization of production steps (with complexing agent)....52
   5.1 Effect of complexing agent on activity of CGTase....52
   5.2 Effect of CGTase concentration on the formation of cyclodextrins in the presence of complexing agent....55
   5.3 Time course of cyclodextrin production in the presence of complexing agent....57
   5.4 Effect of complexing agent concentration on the production yield of cyclodextrins....57
6. Product separation....61
   6.1 Separation of cyclodextrins from non-cyclic products....61

Page

6.2 Separation of β-CD from cyclodextrin mixtures.....69

IV DISCUSSION 74

REFERENCES.....95

APPENDICES.....105

BIOGRAPHY.....112

LIST OF TABLES

Table Page

1. Characteristics of cyclodextrins....4
2. Industrial applications of cyclodextrins....9
3. World market of cyclodextrins....10
4. Classification of cyclodextrins....11
5. Summarization of CGTase mechanism....15
6 (a) Properties of cyclodextrin glycosyltransferase....17

(b) CGTase-producing bacteria....18

7. Partial purification of CGTase from *Bacillus* sp. A 11....39
8. Yield of cyclodextrins from rice and soluble potato starch....42
9. Yield of cyclodextrins from pretreated and non-treated rice starch....42
10. Dextrose Equivalent values of treated starch....44
11. Effect of starch concentrations on cyclodextrin production....50
12. Production yield of cyclodextrins in the presence of complexing agent at different concentrations of CGTase....56
13. Retention time of standard CDs and linear oligosaccharides on HPLC Supelco - NH_2 column....63
14. Treatment of reaction products with amyloglucosidase (AMG)....66
15. Treatment of reaction products with β - amylase....68
16. Yield of cyclodextrins at different conditions....71
17. Yield of cyclodextrins after crystallization at 4 °C....72
18. Yield of cyclodextrins after crystallization at 25 °C....72
19. Physical and chemical properties of common starches....75

20. Growth of *Bacillus* sp. A 11 and CGTase activities when grown in culturing medium containing 1.0 % of different types of starch.....77

21. The amount of β-cyclodextrin produced by *Bacillus* sp. A 11 in culture mediums containing various types of starch.....77

22. Cyclodextrin degrading enzymes.....88

23. Solubility of cyclodextrins in water.....91

LISTS OF FIGURES

Figure Page

1. Structure and molecular dimension of cyclodextrins (CDs).....2
2. Structure of β-cyclodextrin.....5
3. Beneficial modification of guest molecules by cyclodextrins.....7
4. Modified cyclodextrins.....13
5. Flowsheet for partial purification of CGTase.....30
6. Flowsheet for the production of cyclodextrins.....32
7. Flowsheet for the separation of β-cyclodextrin.....37
8. Effect of α-amylase concentration on the formation of cyclodextrins.....43
9. Relationship between Dextrose Equivalent (DE) of starch and the formation of cyclodextrins.....45
10. Effect of incubation time of pretreatment of starch with α-amylase (0.1 %,w/v) on the formation of cyclodextrins 47
11. Effect of starch concentration on the formation of cyclodextrins.....49
12. Effect of CGTase concentration on the formation of cyclodextrins.....51
13. Time course of cyclodextrin production without complexing agent.....53
14. Effect of complexing agents on CGTase activity.....54
15. Time course of cyclodextrin production with complexing agent.....58
16. Time course of cyclodextrin production with / without cyclohexane.....59
17. Effect of cyclohexane concentration on the production yield of cyclodextrins 60
18. HPLC chromatograms of the reaction products 62

19. HPLC chromatograms of standard linear oligosaccharides, standard cyclodextrins, and reaction products treated with amyloglucosidase.....65

20. HPLC chromatograms of standard linear oligosaccharides, standard cyclodextrins, and reaction products treated with β - amylase.....67

21. HPLC chromatograms of cyclodextrin products after 1st crystallization compared to Filtrate 1.....73

ABBREVIATION

A = absorbance

AMG = amyloglucosidase

BSA = bovine serum albumin

CD = cyclodextrin

CGTase = cyclodextrin glycosyltransferase

cm = centrimeter

°C = degree celsius

DE = dextrose equivalent

g = gram

hr = hour

l = litre

µl = microlitre

ml = millilitre

µg = microgram

mg = milligram

mM = millimolar

M = molar

v/v = volume by volume

w/v = weight by volume