

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การสังเคราะห์โอลีโอแซคคาไรด์โดยเอนไซม์ในระบบน้ำสองวัฏภาค
 ชื่อผู้เขียน น.ส. จันทร์จรัส พานยง
 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
 คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว	ประธานกรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ศรีโยธา	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อภิญญา พลโกมล	กรรมการ

บทคัดย่อ

โอลีโอแซคคาไรด์สามารถสังเคราะห์ได้โดยใช้ไกลโคซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับ การสลายน้ำหรือปฏิกิริยาไฮกัยายไกลโคซิล การสังเคราะห์ในระบบน้ำสองวัฏภาค มีข้อดีที่เอนไซม์ ถูกตรึงอยู่ในวัฏภาคค้ำ และผลิตภัณฑ์ถูกแยกจากปฏิกิริยามาอยู่ในวัฏภาคบน จากการทดลอง วิเคราะห์โอลีโอแซคคาไรด์โดยวิธีโครมาโตกราฟีพบว่า โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง สามารถวิเคราะห์โอลีโอแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้ทั้งจากปฏิกิริยาย้อนกลับและปฏิกิริยาไฮกัยาย ในขณะที่โครมาโตกราฟีผิวบางและโครมาโตกราฟีกระดาษสามารถวิเคราะห์โอลีโอแซคคาไรด์ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาย้อนกลับเท่านั้น

การสังเคราะห์โอลีโอแซคคาไรด์จากปฏิกิริยาย้อนกลับโดยใช้ 0.088 หน่วย/มล. แอลฟาแมนโนซิเดสจากถั่วแฉะผสมกับ 40% แมนโนสที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 4 วัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดแมนโนไซด์อย่างน้อย 1 ชนิด ในปริมาณ 4.3% ของแมนโนสที่ใช้เป็นสับสเตรต จากการทดลองสังเคราะห์ในระบบน้ำสองวัฏภาค 3 ชนิด คือ 1) 8% โพลีเอธิลีนไกลคอล-8000/3% เดกซ์เตรน-500 2) 8.2% โพลีเอธิลีนไกลคอล-8000/9% ไฟคอลล์-400 และ 3) 15% โพลีเอธิลีนไกลคอล-8000/5% โซเดียมซิลเฟต ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดแมนโนไซด์เหมือน การสังเคราะห์ในน้ำ และมีปริมาณ 5.5, 6.2 และ 9.1% ของแมนโนส ตามลำดับ โดยที่ ไดแมนโนไซด์มีการแบ่งส่วนในวัฏภาคบนและล่างใกล้เคียงกันสำหรับระบบโพลีเมอร์ / โพลีเมอร์ แต่มีการแบ่งส่วนในวัฏภาคบนน้อยกว่าวัฏภาคค้ำสำหรับระบบโพลีเมอร์/เกลือ สภาวะที่เหมาะสม สำหรับการสังเคราะห์ในระบบที่ 3 คือ 1.76 หน่วย/มล. แอลฟาแมนโนซิเดสและอุณหภูมิ 50 °C

การสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จากปฏิกิริยาไฮกัยยโดยใช้ 1.8×10^{-3} หน่วย/มล. แอลฟาแมนโนซิเดสจากถั่วแฉัดผสมกับ 2.5 มิลลิโมลาร์ p-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside (p α M) และ 50 มิลลิโมลาร์ p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (p β G) ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ ซี เป็นเวลา 2 วัน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ (อช.) 3 ชนิด ในปริมาณอัตราส่วน อช. -1 : อช. -2 : อช. -3 = 10:1:2 หรือปริมาณ อช. ทั้งหมด 5.4% ของ p α M ซึ่งเป็นตัวให้แมนโนซิล จากการทดลองสังเคราะห์ในระบบน้ำสองวัฏภาค 5 ชนิด ชนิดที่ 1, 2 และ 3 ดังกล่าวแล้ว ชนิดที่ 4) 8% โพลีเอธิลีนไกลคอล-8000/7% เรปโพล-200 และ 5) 20% โพลีเอธิลีนไกลคอล-8000/7% โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 ได้ อช. 3 ชนิด ในปริมาณอัตราส่วนเหมือนการสังเคราะห์ในน้ำ หรือปริมาณ อช. ทั้งหมด 6.5, 4.3, 3.8, 4.7 และ 3.2% ของ p α M ตามลำดับ สำหรับการแบ่งส่วนของอช. 3 ชนิดเหมือนกันคืออยู่ใน วัฏภาคบนและล่างใกล้เคียงกันสำหรับระบบโพลีเมอร์/โพลีเมอร์ แต่อยู่ในวัฏภาคบนมากกว่า วัฏภาคล่างสำหรับระบบโพลีเมอร์/เกลือ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ในระบบที่ 3 คือ 7.2×10^{-3} หน่วย/มล. แอลฟาแมนโนซิเดส อัตราส่วนความเข้มข้นของ p α M:p β G = 1 : 10 และอุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ ซี

Thesis Title Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides in Aqueous
Two-Phase System

Author Ms. Janjarus Panayong

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Lecturer Dr. Dararat Tongkao Chairman

Assoc. Prof. Dr.Poonsook Sriyotha Member

Assist. Prof. Abhinya Plikomol Member

ABSTRACT

Oligosaccharides can be synthesized by glycosidase catalyzing reversed hydrolysis or glycosyltransfer reaction. Application of aqueous two-phase system in the synthesis is to immobilize the enzyme in bottom phase and separate the product from the reaction to top phase. Analysis of the oligosaccharides by chromatographic methods indicated that high performance liquid chromatography offered information for the oligosaccharides synthesized from both reactions, while thin layer and paper chromatography provided only from the reversed reaction.

The oligosaccharide synthesis from the reversed reaction was performed by incubation of 0.088 unit/ml α -mannosidase from jack beans with 40% mannose at pH 6.0 and 60 °C for 4 days. At least one type of dimannoside was obtained in the amount of 4.3% of the mannose substrate. The synthesis in three types of the aqueous two-phase system: 1) 8% poly ethylene glycol-8000/3% dextran-500, 2) 8.2% polyethylene glycol-8000/

9% Ficoll-400 and 3) 15% polyethylene glycol-8000/5% sodium sulphate, also yielded the same dimannoside as in the aqueous solution but in the amounts of 5.5, 6.2 and 9.1% of the mannose, respectively. Partition of the dimannoside in the polymer/polymer system was more or less the same concentration in the top and bottom phases, however, the partition in the polymer/salt system was less in the top. Optimization of the synthesis in the third system preferred 1.76 unit/ml α -mannosidase and the temperature of 50 °C.

The oligosaccharide synthesis from the transfer reaction was performed by incubation of 1.8×10^{-3} unit/ml α -mannosidase from jack beans with 2.5 mM p-nitrophenyl- α -D-mannopyranoside (p α M) and 50 mM p-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (p β G) at pH 6.0 and 25 °C for 2 days. At least three types of oligosaccharide (OS) were obtained in the amount ratio of OS-1 : OS-2 : OS-3 = 10 : 1 : 2 or the total OS of 5.4% of p α M, the mannosyl donor. The synthesis in five types of the aqueous two-phase system: 1, 2 and 3 as mentioned, 4) 8% polyethylene glycol-8000/7% Reppal-200 and 5) 20% polyethylene glycol-8000/7% potassium phosphate buffer, pH 6.0, also yielded the three OS in the same ratio as in the aqueous solution but in the total amounts of 6.5, 4.3, 3.8, 4.7 and 3.2% of the p α M, respectively. Partition of the three OS behaved similarly, i.e. it was almost the same concentration in the top and bottom phases of the polymer/polymer system but more in the top of the polymer/salt system. Optimization of the synthesis in the third system preferred 7.2×10^{-3} unit/ml α -mannosidase, concentration ratio of p α M : p β G = 1:10 and the temperature of 37 °C.