การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของไซโคลเดกซ์ทริน ไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Paenibacillus* sp. ทนร้อนสายพันธุ์ RB01

นายวันชัย เย็นเพชร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2913-8

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21048319

PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM THERMOTOLERANT *Paenibacillus* sp. STRAIN RB01

Mr. Wanchai Yenpetch

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2913-8

Thesis title	Purification and Biochemical Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase from Thermotolerant *Paenibacillus* sp. Strain RB01
By	Mr. Wanchai Yenpetch
Field of Study	Biochemistry
Thesis advisor	Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D

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

.....Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

.....Member

(Manchumas Prousoontorn, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วันชัย เย็นเพชร: การทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติทางชีวเคมีของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Paenibacillus* sp. ทนร้อนสายพันธุ์ RB01 (PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM THERMOTOLERANT *Paenibacillus* sp. STRAIN RB01) อ.ที่ปรึกษา: รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์; หน้า. ISBN .

ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส(CGTase)เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งให้เป็นไซโคลเดกซ์ทริน (CD) แบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ RB01 ซึ่งคัดแยกจากบ่อน้ำร้อน จังหวัดราชบุรี ประเทศไทย ถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยการดูดซับด้วยแป้ง คอลัมน์ DEAE-cellulose และ Bio-Gel P-100 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 47.5 เท่า และมีแอคติวิตีคงเหลือ 35 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์บริสุทธิ์แสดงแถบโปรตีน 1 แถบซึ่งมีมวลโมเลกุล 65 kDa บน SDS-PAGE แต่แสดง 1 แถบหลักกับ 2 แถบรองบน native PAGE โดยที่ทุกแถบแสดงผลบวกเมื่อย้อมแอคติวิตี (dextrinizing activity) แต่ละแถบมีความแตกต่างด้านประจุเล็กน้อยโดยเมื่อตรวจสอบด้วย isoelectric focusing ก็พบว่าแถบโปรตีนหลักมีค่า pI 5.2 และ 5.3 ส่วนแถบโปรตีนรองมีค่า 5.1 แสดงว่าเอนไซม์นี้มี 3 isoforms ที่มีขนาดเท่ากัน จากการย้อมเอนไซม์ด้วย PAS พบว่าเอนไซม์นี้เป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งสามารถย่อยสับสเตรท soluble starch ให้เกิดผลิตภัณฑ์ เมื่อตรวจสอบด้วย HPLC มีอัตราส่วนของ α-:β-:γ-CD เป็น 1.0:1.8:0.4 เอนไซม์มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกันโดยปฏิกิริยา dextrinization คือ 5.0 และ 65 °C ส่วนปฏิกิริยา cyclization คือ 7.0 และ 70 °C และสำหรับปฏิกิริยา CD-TCE คือ 7.0-9.0 และ 55 °C เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้ที่ pH 7-9 ในช่วงอุณหภูมิ 45-55 °C เป็นเวลา 60 นาที เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ประมาณ 80% ในขณะที่เมื่อบ่มเอนไซม์กับ soluble starch ที่ 70 °C 30 นาที พบว่าเอนไซม์ไม่เสียแอคติวิตีเลยและเมื่อบ่มไว้นาน 60 นาที แอคติวิตีลดลงเพียง 20% ในการดัดแปลงกรดอะมิโนด้วยสารเคมีที่จำเพาะเพื่อพิสูจน์กรดอะมิโนสำคัญโดยบ่มเอนไซม์ 5 นาทีกับ 5.0, 1.5 และ 0.005 มิลลิโมลาร์ ของ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), diethylpyrocarbonate (DEP) และ *N*-bromosuccinimide (NBS) ซึ่งจำเพาะต่อกรดอะมิโนคาร์บอกซิล ฮิสติดีนและทริปโตเฟนตามลำดับ พบว่าเอนไซม์จะเสียแอคติวิตีทั้งหมด เมื่อป้องกันเอนไซม์ด้วยสับสเตรท คือ α-, β-, หรือ γ-CD ก่อนการดัดแปลงพบว่าการสูญเสียแอคติวิตีลดลง จากผลการทดลองนี้แสดงว่ากรดอะมิโนคาร์บอกซิล ฮิสติดีนและทริปโตเฟน เป็นกรดอะมิโนสำคัญในบริเวณเร่งของเอนไซม์ กรดอะมิโนซิสเตอีน, ไทโรซีน, ไลซีน, และเซรีนอาจไม่ใช่กรดอะมิโนสำคัญสำหรับการแสดงแอคติวิตี เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับเตรทที่มีโครงสร้าง α-1,4 กลูโคส โดย G3 เป็นสับสเตรทที่เล็กที่สุด ผลการศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของปฏิกิริยาควบคู่ พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพ (k_{cat}/K_m) ในการเร่งปฏิกิริยาสูงสำหรับ CD รูปแบบธรรมชาติมากกว่ารูปแบบอนุพันธ์ ค่าจำนวนหมุนเวียน (k_{cat}) ก็แสดงแนวโน้มคล้ายกัน คือ ค่าสำหรับ β- ≅ γ- > α- > CDs ในรูปแบบอนุพันธ์ จากการชักนำการเสียสภาพ CGTase ด้วยยูเรีย ทำให้คาดการณ์ได้ว่าการเกิดหลายรูปแบบของเอนไซม์ไม่ได้เกิดจากโครงรูปการพับของโปรตีนที่ต่างกัน

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

43724035523 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD : CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE/ CYCLODEXTRIN/ THERMOTOLERANT STRAIN
WANCHAI YENPETCH : PURIFICATION AND BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM THERMOTOLERANT *Paenibacillus* sp. STRAIN RB01. THESIS ADVISOR :ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph. D. pp. ISBN .

Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) catalyzes the conversion of starch to cyclodextrin (CD). The enzyme from a thermotolerant *Paenibacillus* sp. strain RB01 isolated from hot spring area in Ratchaburi province, Thailand, was purified and characterized. Purification steps involved starch adsorption, DEAE-cellulose and Bio-Gel P-100 column chromatography. Final purification fold was 47.5 and the yield obtained was 35%. The purified CGTase showed a single band on SDS-PAGE with the molecular weight of 65 kDa. On native PAGE, one major with two minor protein bands which corresponded to bands obtained from dextrinizing activity were observed. The result suggests the existence of 3 isoforms of the same size of this CGTase. However, they showed small difference in net charge as evidenced by their closed relative mobilities on native PAGE. In addition, by isoelectric focusing, two major bands were found at pI of 5.2 and 5.3 with one minor band at 5.1. The enzyme was found to be a glycoprotein due to positive staining with PAS. By HPLC analysis of reaction products, it was found that this CGTase hydrolyzed soluble starch to form α:β:γ-CD in the ratio of 1.0:1.8:0.4. Optimum pH and temperature for dextrinizing activity were 5.0 and 65 °C, for cyclizing activity were 7.0 and 70 °C, and for CD-TCE activity were 7.0-9.0 and 55 °C. The enzyme was stable at pH 7-9 and temperature of 45-55 °C within 60 min incubation period. At 70 °C, in the presence of soluble starch substrate, no activity was lost after 30 min incubation while only 20% was lost after 60 min. The enzyme was chemically modified with a series of group-specific reagents to identify essential amino acid residues. Incubation of the enzyme for 5 min with 5, 1.5 and 0.005 mM of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), diethylpyrocarbonate (DEP) and *N*-bromosuccinimide (NBS) which were specific for carboxyl, histidine, and tryptophan residues, respectively, led to complete loss of enzyme activity. In the presence of protective substance, α-, β-, or γ-CD, the loss of activities were reduced. These results suggested that carboxyl, histidine and tryptophan were located at the active site. In addition, it was proved that cystein, tyrosine, lysine, and serine were not important residues for enzyme activity. The enzyme was found to be specific for substrates with α-1,4 glucosidic linkage, and G3 was the smallest saccharide acting as substrate. For kinetic parameters on CD coupling activity, enzyme efficiency (k_{cat}/K_m) was higher for native than for modified CDs. Turnover number (k_{cat}) showed similar trend as that of β- ≅ γ- > α > modified CDs. The result from urea-induced denaturation of CGTase suggested that multiple forms of the enzyme did not arise from different tertiary structure of protein.

Department.....Biochemistry.....Student's signature.....WANCHAI YENPETCH.....
Field of study.....Biochemistry.....Advisor's signature.....P. Pongsawasdi.....
Academic year.....2002.....Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, for her exellent instruction, guidance, encouragement, attention and support throughout this thesis.

My gratitude is also extended to Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Assistant Professor Suganya Soontaros, Dr. Manchumas Prousoontorn for their valuable suggestion and comments and also dedicating valuable time for thesis examination.

My appreciation is also expressed to Department of Physiology, Faculty of Veterinary for give me an education opportunity. I am thanks to Miss Solos Tesana for the bacteria used in this research. Sincere thanks are extended to all staff member and all friends for their kind assistance, friendship and helpfulness especially Mr. Surachai Yaiyen, Mr. Jeerapan Machoapa, Miss Wiramsri Sripotchanaj and Miss Orada Chompookam, at Department of Biochemistry faculty of Science.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents and my family for their infinite love, encouragement, understanding and everything giving to my life.

This work was supported in part by the Grant from NRCT-JSPS and Graduate School.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
ABBREVIATIONS	xv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Cyclodextrins (CD)	
1.1.1 Structure and properties of CD	1
1.1.2 CD inclusion complexes	4
1.1.3 Production process of CD	9
1.2 Cyclodextrin producing enzyme	9
1.2.1 Starch degrading enzymes	9
1.2.2 Cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)	11
1.2.3 Three-dimension structure similarities in the α-amylase family	14
1.2.4 Purificaion methods for CGTase	19
1.2.4 Research for over production and application of CGTase	19
1.2.5 Shortcomings of industrial application of CGTase	20
1.3 Objective of this research	22
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	23
2.1 Equipments	23
2.2 Chemicals	23

CONTENTS (continued)

	Page
2.3 Bacteria.....	25
2.4 Media preparation.....	25
2.5 Cultivation of Baceteria.....	26
2.6 Purification of CGTase	
2.6.1 Starch adsorption.....	26
2.6.2 DEAE-cellulose.....	27
2.6.3 Bio-Gel P-100.....	27
2.7 Enzyme assay.....	28
2.7.1 Dextrinizing activity assay.....	28
2.7.2 Cyclodextrin-trichloroethylene assay.....	29
2.7.3 Cyclodextrin-forming activity assay.....	29
2.7.4 Coupling activity assay.....	30
2.8 Protein determination.....	30
2.9 Reducing sugar determination.....	30
2.10 Polyacrylamide gel electrophoresis.....	31
2.10.1 Non-denaturing PAGE.....	31
2.10.2 SDS-PAGE.....	31
2.10.3 Detection of proteins.....	32
2.10.3.1 Coomassie blue staining.....	32
2.10.3.2 Dextrinizing activity staining.....	32
2.11 Characterization of the CGTase.....	32
2.11.1 Qualitative analysis by Periodic Acid-Schiff (PAS) staining.....	32
2.11.2 Determination of the isoelectric point by isoelectric focusing polyacrylamide gel electrophoresis (IEF)..	33

CONTENTS (continued)

Page

2.11.2.1 Preparation of gel supporting film..... 33

2.11.2.2 Preparation of the gel..... 33

2.11.2.3 Sample application and running the gel..... 33

2.12 Optimum conditions for enzyme activity..... 34

2.12.1 Effect of pH..... 34

2.12.2 Effect of temperature..... 34

2.13 Enzyme stability..... 35

2.13.1 Effect of pH..... 35

2.13.2 Effect of temperature..... 35

2.13.3 Effect of substrate..... 35

2.13.4 Effect of calcium and temperature upon long-term storage..... 35

2.14 Substrate specificity of CGTase..... 36

2.15 Determination of kinetic parameters..... 36

2.16 Determination of cyclodextrin by High Performance Liquid Chromatography..... 36

2.17 Determination of suitable concentration of reagent used in the modification of CGTase..... 37

2.17.1 Effect of modifying reagent concentration..... 37

2.17.1.1 Modification of carboxyl residues..... 37

2.17.1.2 Modification of histidine residues..... 37

2.17.1.3 Modification of tryptophan residues..... 38

2.17.1.4 Modification of tyrosine residues..... 38

2.17.1.5 Modification of lysine residues..... 38

2.17.1.6 Modification of serine residues..... 38

CONTENTS (continued)

Page

2.17.2 Effect of incubation time on modified CGTase activity..... 39

2.18 Identification of amino acid residues involved in and present at the catalytic site of CGTase..... 39

2.19 Measurement of fluorescence spectrum upon modification by NBS..... 39

2.20 Urea-induced denaturation of CGTase..... 40

CHAPTER III RESULTS..... 41

3.1 Purification of CGTase..... 41

3.2 Characterization of purified CGTase..... 45

3.2.1 Molecular weight determination..... 45

3.2.2 Carbohydrate determination..... 45

3.2.3 pI..... 51

3.2.4 Effect of pH on the enzyme activity..... 51

3.2.5 Effect of temperature on the enzyme activity..... 51

3.2.6 pH stability of purified CGTase..... 55

3.2.7 Thermostability of purified CGTase..... 55

3.2.8 Substrate specificity of CGTase..... 55

3.2.9 Effect of calcium and temperature upon long-term storage..... 59

3.3 Kinetics study..... 59

3.4 Product analysis by High Performance Liquid Chromatography 63

3.5 Chemical modification of CGTase..... 63

3.5.1 Modification of carboxyl residues by EDC..... 66

3.5.2 Modification of histidine residues by DEP..... 69

CONTENTS (continued)

Page

3.5.3 Modification of tryptophan residues by NBS..... 69

3.6 Fluorecence emission spectrum upon modification by NBS.... 73

3.7 Urea-induced denaturation of CGTase..... 76

CHAPTER IV DISCUSSION..... 80

4.1 Purification of CGTase..... 80

4.2 Characterization of purified CGTase..... 83

4.2.1 Molecular weight determination..... 83

4.2.2 Carbohydrate determination..... 84

4.2.3 pI..... 84

4.2.4 Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability..... 85

4.2.5 Substrate specificity..... 86

4.2.6 CD production..... 87

4.3 Kinetics study..... 88

4.4 Chemical modification of CGTase..... 89

4.5 Urea-induced denaturation of CGTase..... 94

CHAPTER V CONCLUSIONS..... 95

REFFERENCES..... 96

APPENDICES..... 107

BIOGRAPHY..... 120

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Approximate geometric dimensions and properties of α-, β-, and γ–CD molecules.....	2
2.	Possible effect of the formation of inclusion complexes on properties of guest molecules.....	6
3.	Selected applications of cyclodextrins.....	9
4.	Summary of CGTase mechanisms.....	15
5.	Relationship between length of substrate and mechanism of CGTase.....	15
6.	Some properties of bacterial CGTases.....	16
7.	Purification of CGTase from *Paenibacillus* sp. strain RB01.....	42
8.	Kinetic parameters of CGTase for different cyclodextrin substra.....	62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Chemical structure of three kind of CDs	2
2. Structure of β-cyclodextrin	3
3. Guest orientation in CD-guest complex	6
4. Beneficial modification of guest molecules by cyclodextrin	8
5. Process for cyclodextrin production	10
6. Action of enzymes involved in the degradation of starch	12
7. Schematic representation of the CGTase catalyzed reactions	13
8. Domain level organization of starch degrading enzymes	17
9. DEAE-cellulose column profile of CGTase	43
10. Bio-Gel P100 column profile of CGTase	44
11. Non-denaturing PAGE of CGTase	46
12. SDS-PAGE of CGTase	47
13. Standard curve of molecular weight and retention coefficient from Bio-Gel P-100	48
14. Standard curve of molecular weight and relative mobility from SDS-PAGE	49
15. PAS staining of purified CGTase from RB01	50
16. Isoelectrofocusing Gel with ampholine (pH 3-10) of purified CGTase	52
17. Standard curve of pI determination	53
18. Optimum pH	54
19. Optimum temperature	54
20. pH stability of cyclization activity of CGTase	56
21. Thermostability of cyclization activity of CGTase	57
22. Substrate specificity of purified CGTase	58

23. Long-term storage of CGTase at 4 °C and –20 °C
with and without mM $CaCl_2$..... 60
24. Lineweaver-Burk plot of CGTase with β–cyclodextrin
as substrate..... 61
25. HPLC chromatogram of CDs produced by purified
CGTase from RB01 and standard cyclodextrins..... 64
26. Effect of 1 mM various group-specific reagents on
CGTase activity at pH 6.0..... 65
27. Effect of EDC on CGTase activity..... 67
28. Inactivation of CGTase activity by 5 mM EDC..... 67
29. Residual CGTase activity of EDC-modified enzyme in the presence
and absence of a protective substance..... 68
30. Effect of DEP on CGTase activity..... 70
31. Inactivation of CGTase activity by 1.5 mM DEP..... 70
32. Residual CGTase activity of DEP-modified enzyme in the presence
and absence of a protective substance..... 71
33. Effect of NBS on CGTase activity..... 72
34. Inactivation of CGTase activity by 0.005 mM NBS..... 72
35. Residual CGTase activity of NBS-modified enzyme in the presence
and absence of a protective substance..... 74
36. Fluorescence emission spectrum of CGTase before and after
modification with NBS..... 75
37. Fluorescence emission spectrum of CGTase when modified by urea 77
38. Fluoresence intensity at 350 nm and dextrinizing activity of CGTase.... 78
39. Native PAGE of urea-induced denaturation..... 79

ABBREVIATIONS

A	absorbance
BSA	bovine serum albumin
CDs	cyclodextrins
CGTase	cyclodextrin glycosyltransferase
cm	centrimeter
°C	degree Celsius
g	gram
hr	hour
l	litre
mA	milliampere
min	minute
µl	microlitre
ml	millilitre
mM	millimolar
M	molar
rpm	revolution per minute
µg	microgram

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย