# การกลายพันธุ์ยีนบีตา-ไซโคลเดกซ์ทรินกลูคาโนทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus circulans* A11 ที่มีผลต่อการสร้างแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทริน

นางสาวณัฐธิดา โชติช่วง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-5388-8

ลิขสิทธิ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# MUTAGENESIS OF β-CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE FROM *Bacillus circulans* A11 THAT AFFECTS THE γ-CYCLODEXTRIN PRODUCTION

**Miss Nattida Chotechuang**

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 2003**

**ISBN 974-17-5388-8**

| | |
|---|---|
| Thesis Title | MUTAGENESIS OF β-CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE FROM *Bacillus circulans* A11 THAT AFFECTS THE γ-CYCLODEXTRIN PRODUCTION |
| By | Nattida Chotechuang |
| Field of study | Biochemistry |
| Thesis Advisor | Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D. |

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

.....Dean of the Faculty of Science
( Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Vichien Rimphanitchayakit, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Siriporn Sittipraneed, Ph.D.)

..... Member
(Rath Pichyangkura, Ph.D.)

..... Member
(Manchumas Prousoontorn, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ณัฐธิดา โชติช่วง : การกลายพันธุ์ยีนบีตา-ไซโคลเดกซ์ทรินกลูคาโนทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus circulans* A11 ที่มีผลต่อการสร้างแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทริน(MUTAGENESIS OF β-CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE FROM *Bacillus circulans* A11 THAT AFFECTS THE γ-CYCLODEXTRIN PRODUCTION)
อ. ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ, 78 หน้า, ISBN 974-17-5388-8

ไซโคลเดกซ์ทริน (CDs) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ต่อกันเป็นวงด้วยกลูโคสจำนวน 6, 7 และ 8 หน่วย มีชื่อเรียกว่า α-, β- และ γ-ไซโคลเดกซ์ทริน ตามลำดับ CDs เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งของเอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินกลู-คาโนทรานสเฟอเรส (CGTase) สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ CGTase ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ A, B, C, D และ E โดยโดเมน B จะแทรกอยู่ระหว่างโดเมน A ทำให้แบ่งโดเมน A ออกได้เป็น โดเมนย่อย A1 และ A2 โดยทั่วไป CGTase จากธรรมชาติ จะผลิต CDs ได้ทั้ง 3 ชนิดในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ซึ่งต้องเสียเวลาและต้นทุนที่แพงในการแยกไซโคลเดกซ์ทรินแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์ เมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดของไซโคลเดกซ์ทรินทั้ง 3 ชนิด จะเห็นว่า γ-ไซโคลเดกซ์ทรินมีขนาดใหญ่ที่สุด (ประกอบด้วยกลูโคส 8 หน่วย) ดังนั้น γ-ไซโคลเดกซ์ทริน จึงสามารถบรรจุสารที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถบรรจุใน α- และ β-ไซโคลเดกซ์ทรินได้ ซึ่งทำให้มีความต้องการ γ-ไซโคลเดกซ์ทรินในอุตสาหกรรมหลายประเภท แต่ขณะนี้การผลิต γ-ไซโคลเดกซ์ทรินในระดับอุตสาหกรรมยังทำได้ในปริมาณน้อยอยู่ ดังนั้นการที่จะสร้าง CGTase ที่ผลิต γ-CD จึงต้องศึกษาถึงบริเวณของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความจำเพาะในการสร้างผลิตภัณฑ์(product specificity) จากข้อมูลทชีวสารสนเทศเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CGTase ชนิดต่าง ๆ พบว่าลำดับกรดอะมิโนส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน แต่ใน γ-CGTase จะมีบริเวณที่แตกต่างอย่างชัดเจนจาก CGTase ชนิดอื่นอยู่ 3 บริเวณ คือกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 87-95, 141-152 และ 532-536 (เป็นตำแหน่งของ CGTase จาก *Bacillus circulans* A11) โดยสองบริเวณแรกจะตรงกับตำแหน่ง subsite -3 และ -7 บนโดเมน A1 และ B ตามลำดับ ซึ่งเป็นบริเวณที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา ส่วนบริเวณที่สามจะอยู่บนโดเมน D ในการศึกษาครั้งนี้มีความสนใจที่จะตรวจสอบว่าความแตกต่างดังกล่าวจะมีผลต่อการสร้าง γ-CD อย่างไร โดยจะทำการกลายพันธุ์ยีนของ β-CGTase ที่ได้จาก *B. circulans* A11 ตรงบริเวณที่แตกต่างจาก γ-CGTase ทั้งสามบริเวณโดยวิธี USE mutagenesis ซึ่งจะทำการเอากรดอะมิโนใน β-CGTase ซึ่งไม่มีใน γ-CGTase และเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนข้างเคียงบางตัวเพื่อให้มีความคล้ายคลึง γ-CGTase ในขั้นตอนนี้จะได้มิวแทนต์พลาสมิด จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณที่ทำการกลายพันธุ์ pNan1, 2 และ 3 เป็นมิวแทนต์พลาสมิดที่มีบริเวณกลายพันธุ์ I (ตำแหน่ง 87-94), II (ตำแหน่ง 141-152) และ III (ตำแหน่ง 532-536) ตามลำดับ ได้สร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีตำแหน่งกลายพันธุ์ต่างๆ จากนั้นทำการศึกษา dextrinizing activity และ CD forming activity ของเอนไซม์ที่ได้จากโคลน จากการศึกษาพบว่าบริเวณ subsite -3 (บริเวณกลายพันธุ์ I)น่าจะมีบทบาทต่อการสร้าง β-CD และ บริเวณ subsite -7 (บริเวณกลายพันธุ์II) น่าจะเกี่ยวข้องกับสัดส่วนในการผลิต γ-CD ส่วนโดเมน D (บริเวณกลายพันธุ์III) น่าจะมีเกี่ยวข้องกับแอคติวิตีและความจำเพาะในการสร้างผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีบริเวณอื่นนอกเหนือจากโดเมนที่เป็นบริเวณเร่ง ที่มีความสำคัญต่อ ความจำเพาะในการสร้าง CDs

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่อนิสิต.....ณัฐธิดา โชติช่วง.....
สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2546.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4572292323 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: Cyclodextrin / Cyclodextrin glucanotransferase / recombinant plasmid

NATTIDA CHOTECHUANG: MUTAGENESIS OF β-CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE FROM *Bacillus circulans* A11 THAT AFFECTS THE γ-CYCLODEXTRIN PRODUCTION
THESIS ADVISOR : ASST.PROF. VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT (Ph.D.), 78 pp. ISBN 974-17-5388-8

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides of 6, 7 and 8 glucose units, called α-, β- and γ-cyclodextrins (CDs), respectively. CDs are the products of enzymatic conversion of starch and related substrates by cyclodextrin glucanotransferases (CGTases) and are useful carrier molecules for several applications in industries. CGTase consists of 5 domains, A, B, C, D and E; domain B divides domain A into subdomain A1 and A2. It has been known that natural CGTases produce a mixture of α-, β- and γ-CDs at different ratios making the separation of CDs time-consuming and costly. A CGTase that can produce one type of CD is desirable. The γ-CD, the largest of the three cyclodextrins, can trap larger molecules that cannot be trapped by α-and β-CDs. Although there is a demand for γ-CDs in various industries, the γ-CD is not widely used in practice due to low production of this substance. To engineer a CGTase that produces γ-CD, parts of the enzyme that involved in product specificity should be verified. By using the information from bioinformatics, the amino acid sequence comparison of the three CGTase types shows that they have moderate homology but γ-CGTase has 3 regions that are different from the other two CGTases. These are amino acid sequences at position 87-95, 141-152 and 532-536 (*B. circulans* A11 CGTase numbering). The first and second regions are at the substrate binding subsites –3 and –7, respectively, in the active site region. The third region is located in domain D. In this study, the three equivalent regions in β-CGTase from *Bacillus circulans* A11 are mutated in favor of the γ-CGTase sequence. The activities of the mutants are studied in order to determine how these different regions affect the production of γ-CD. The three regions in β-CGTase gene are mutated using USE mutagenesis method, which includes deletion and substitution of some amino acid residues. The mutant plasmids, pNan1, 2 and 3 that have the mutation sites I (position 87-95), II (position 141-152) and III (position 532-536), respectively, are obtained. Then, the mutant plasmids containing the combinations of these 3 mutation regions are constructed. The dextrinizing and CD-forming activities of the mutant enzymes from these clones are studied. From the results, subsites -3 (mutation site I) plays an important role in the production of β-CD and subsite -7 (mutation site II) is involved in the proportion of γ-CD production. Surprisingly, domain D is involved in the activity and product specificity of the enzyme, which indicates that the other domains also contributed to the specificity as well not just the active site.

Department.....Biochemistry.....Student's signature....NATTIDA C.....

Field of study.....Biochemistry.....Advisor's signature.....

Academic year ..... ....2003..... Co-advisor's signature.....

# ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks and deep appreciation to my advisor, Assistant Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit whose excellent instruction, critical comments, guidance, encouragement, suggestions and support throughout this thesis. A special thanks too is extended to Associate Professor Dr.Piamsook Pongsawasdi , Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed Dr. Rath Pitchayangkura and Dr.Manchumas Prousoonthorn for serving as thesis committee and valuable comments.

I would like to thank HM. KING RAMA IX 72$^{th}$ ANNIVERSARY FUND for financial support during my study.

Sincere thanks are extended to all staff members and friends of the Biochemistry and Biotechnology Department for their assistance and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents and my family for their love and understanding.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# CONTENTS


Page

THAI ABSTRACT..... iv
ENGLISH ABSTRACT..... v
ACKNOWLEDGEMENT..... vi
CONTENTS..... vii
LIST OF TABLES..... x
LIST OF FIGURES..... xi
ABBREVIATION..... xiv
CHAPTER I INTRODUCTION..... 1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS..... 25
1. Equipments..... 25
2. Chemicals..... 25
3. Bacterial strains..... 27
4. Plasmid vectors..... 27
5. Enzymes..... 27
6. Media preparation..... 27
7. General techniques in genetic engineering..... 28
7.1. Preparation of competent cells..... 28
7.2. Electroporation..... 28
7.3. Plasmid preparation..... 28
7.4. Agarose gel electrophoresis..... 29
7.5. Extraction of the DNA fragment from agarose gel..... 29
7.6 Preparation of the single stranded plasmid..... 30
7.7 Phosphorylation of the oligonucleotides..... 30
8. Mutagenesis of β-CGTase gene in pVR328 by using USE procedure..... 30
9. Sequencing of mutant plasmids..... 32
10 Construction of recombinant plasmids containing various combination of the mutant sites..... 33
11. Detection of chimeric CGTase activity..... 33
11.1. Dextrinizing activity..... 34
11.1.1 . Halozone on LB-starch agar..... 34
11.1.2 . Dextrinizing activity assay..... 34
11.2. CD forming activity..... 34
12.. Protein determination..... 34
CHAPTER III RESULTS..... 35
1. Amino acid sequence comparison among various CGTases and the design of mutagenic primer..... 35

# CONTENTS (continued)



Page

2. Mutagenesis of β-CGTase gene from *B. circulans* A11 by using USE procedure..... 38
3. DNA sequence determination of the mutation sites..... 40
4. Construction of the mutant CGTases..... 41
5. The activities of the mutant CGTases..... 45
CHAPTER IV DISCUSSION..... 58
CHAPTER V CONCLUSION..... 67
REFERENCES..... 68
APPENDICES..... 75
APPENDIX A..... 75
APPENDIX B..... 77
BIOGRAPHY..... 78

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIST OF TABLE



Table Page

1. Properties of cyclodextrins..... 4
2. Comparison of the amino acid residues around the active center in the four types of CGTases..... 20
3. Summary of mutant CGTase activities..... 57
4 Summary of CGTases mutagenesis that affected cyclodextrin products from previous studies..... 63

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# LIST OF FIGURES



Figure Page


1. Schematic representation of the action of starch-processing enzymes. Black circles indicate the reducing sugars ..... 2
2. Schematic representation of the location and action of CGTase and cyclodextrinase..... 3
3.. Structures and properties of cyclodextrins..... 4
4. Domain level organization of starch-degradating enzymes..... 8
5. Comparison of the three dimensional structure: α-amylase from *Bacillus subtilis* and CGTase from *Bacillus circulans* strain 251..... 9
6. A common three dimensional structure of CGTase..... 9
7. Schematic representation of the hydrogen bonds between the *B. circulans* strain 251 CGTase and a maltononaose inhibitor bound at each subsites of the active site..... 10
8. Schematic representation of the CGTase-catalysed reactions. ..... 11
9. Proposed model of the cyclization reaction of CGTase..... 12
10. The catalytic reaction of CGTase..... 15
11. Scheme of the CGTase reaction mechanism..... 15
12. Possible scenario for the structural rearrangements during the CGTase reaction cycle..... 16
13. Essential amino acid residues for cyclization reaction of CGTase..... 17
14. Alignment of amino acid sequences of typical α-, β-, β/γ- and γ-CGTases..... 19
15. Schematic structure of the substrate binding sites of CGTase..... 21
16. Schematic representation of all interaction of maltoheptaose, and maltohexaose with the CGTase from *B. circulans* strain 251..... 23
17. Oligonucleotides used in the USE procedure ..... 31
18. General schematic representation of USE mutagenesis protocol ..... 32
19. Alignment of the amino acid sequences between β-CGTase from *B. circulans* A11 and other typical CGTases, α-CGTase from *P. macerans* IAM1243 ,β/γ-CGTase from *B. firmus* 290-3 and γ-CGTase from *B. clarkii* 7364..... 36
20. The design of oligonucleotides used in USE procedure and the regions of nucleotide sequences of wild type that used for designing ..... 37
21. Restriction digestion of pNan1, 2 and 3..... 38
22. The mutated plasmids (pNan1, 2 and 3)..... 39
23. The nucleotide sequences of mutant sites I, II and III in pNan1, 2 and 3..... 40
24. Summary of the mutant CGTase conctructs ..... 41
25. Restriction digestion of pNan4, 5 and 6..... 42
26. Restriction digestion of pNan7, 8 and 9. ..... 44
27. Restriction digestion of pNan10..... 44
28. Iodine test for dextrinizing activity of the wild type and the mutant CGTases..... 45

# LIST OF FIGURES



Figure Page

29. Summary of the iodine test for dextrinizing activity of the wild type and the mutant CGTases ..... 47
30. HPLC profiles of cyclodextrins formed by the wild type and mutant CGTases ..... 48
31. Comparison of three dimensional structures between CGTase from alkalophillic *Bacillus* sp.1011 and : CGTase from *B.circulans* A11..... 60
32. Comaparison of three dimensional structures between wild type CGTase from *B. circulans* A11 and mutant CGTase from recombinant plasmid pNan1..... 62
33. Comparison of the three dimensionanl structures of CGTase at subsite-3 and -7 between wild type CGTase and mutant CGTase..... 62
34. Comparison of the three dimensionanl structures of CGTase at domain D between wild type CGTase and mutant CGTase..... 65
35. The three dimensionanl structures of CGTase from B. circulans251 in complex with γ-CD..... 66
36. The active site of CGTase from *B. circulans* 251 in complex with γ-cyclodextrin..... 66

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ABBREVIATION

| | |
|---|---|
| BSA | Bovine serum albumin |
| CDs | Cyclodextrins |
| CGTase | Cyclodextrin glucanotransferase |
| °C | Degree Celsius |
| µl | Microlitre |
| ml | Millilitre |
| mM | Millimolar |
| µM | Micromolar |
| M | Molar |
| µg | Microgram |
| rpm | Revolution per minute |
| nm | Nanometre |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย