บริเวณแร่งของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus* sp. A11

นางสาวอัญชลี ทองสิมา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-512-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19369096

THE ACTIVE SITE OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM *Bacillus* sp. A11

Miss Anchalee Tongsima

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Biochemistry

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-331-512-2

Thesis title	The Active Site of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus* sp. A11
By	Miss Anchalee Tongsima
Department	Biochemistry
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
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

..... Chairman
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

..... Member
(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

อัญชลี ทองสิมา: บริเวณแร่งของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus sp.* A11 (THE ACTIVE SITE OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM *Bacillus* sp. A11) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 118 หน้า. ISBN 974-331-512-2.

การดัดแปลงทางเคมีไนไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (CGTase) จาก *Bacillus* sp. A11 ในภาวะเหมาะสมที่ไม่รุนแรง พบว่า เมื่อดัดแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิลิก ฮิสติดีน ทริปโตเฟน และไทโรซีน ด้วย 1 มิลลิโมลาร์ของ 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), diethylpyrocarbonate (DEP), *N*-bromosuccinimide (NBS) และ *N*-acetyl-imidazole (NAI) ตามลำดับมีผลให้แอคติวิตีของ CGTase ลดลงหรือสูญหายไป ส่วนการดัดแปลงกรดอะมิโนซิสเตอีน ไลซีน และเซรีน ด้วยความเข้มข้นถึง 100 มิลลิโมลาร์ของ *N*-ethyl-maleimide (NEM), 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid และ phenylmethylsulfonyl fluoride ตามลำดับ ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ สำหรับการดัดแปลงซิสเตอีนด้วย iodoacetamide และ dithiothreitol ได้ผลเช่นเดียวกับการใช้ NEM เมื่อทำการป้องกันบริเวณแร่งของเอนไซม์ด้วยสับสเตรทคือ α-, β-, γ-CD หรือ maltotriose ก่อนการดัดแปลงกรดอะมิโนมีผลทำให้การสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิลิก ฮิสติดีน ทริปโตเฟนและไทโรซีน มีส่วนเกี่ยวข้องอยู่ในบริเวณแร่งของเอนไซม์ ในการศึกษาจำนวนกรดอะมิโนฮิสติดีน ทริปโตเฟนและไทโรซีนที่อยู่ในบริเวณแร่งของ CGTase โดยการตรวจวัดด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตเมตริพบว่า β-CD และ γ-CD สามารถป้องกันกรดอะมิโนฮิสติดีน 2 ตำแหน่ง ทริปโตเฟน 1 ตำแหน่งและไทโรซีน 2 ตำแหน่ง ซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนที่ถูกป้องกันเหล่านี้อยู่ในบริเวณแร่งของเอนไซม์

การวิเคราะห์โดยอิเลคโตรโฟเรซิสในสภาวะไม่เสียสภาพเพื่อศึกษาผลของการดัดแปลงทางเคมีที่มีต่อโครงสร้างของเอนไซม์พบว่า การดัดแปลงกรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิลิกด้วย EDC จะได้แถบของเอนไซม์ซึ่งเคลื่อนที่ช้ากว่าเอนไซม์ที่ไม่ได้ดัดแปลง แสดงว่าประจุสุทธิของเอนไซม์ลดลง ส่วนการดัดแปลงกรดอะมิโนทริปโตเฟนด้วย NBS ได้รูปแบบของแถบโปรตีนและแอคติวิตีเหมือนเดิม แต่เมื่อดัดแปลงกรดอะมิโนฮิสติดีนและไทโรซีนด้วย DEP และ NAI ได้แถบของโปรตีนและแอคติวิตีซึ่งเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น แสดงว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างทำให้ประจุลบมากขึ้นหรือออกมาอยู่บริเวณด้านนอกมากขึ้น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้เป็นการยืนยันว่าการดัดแปลงทางเคมีโดยการใช้สาร EDC, DEP, NBS และ NAI ทำให้เกิดการดัดแปลงที่กรดอะมิโนกลุ่มคาร์บอกซิลิก ฮิสติดีน ทริปโตเฟนและไทโรซีน ตามลำดับ

จากการศึกษาค่าคงที่ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ต่อสับสเตรทพบว่า ค่าคงที่ของไมเคลิส (Michaelis constant, K_m) ในปฏิกิริยาคู่ควบมีค่าเท่ากับ 1.55, 1.60 และ 1.94 มิลลิโมลาร์ และมีความเร็วสูงสุด (V_{max}) เท่ากับ 2.81, 2.50 และ 1.40 ไมโครโมลต่อนาที เมื่อใช้ β-CD, maltosyl (G_2)-β-CD และ methyl-β-CD ตามลำดับ สำหรับปฏิกิริยาการสลายไซโคลเดกซ์ทรินพบว่ามีค่า K_m เท่ากับ 3.16, 1.69, 1.42 และ 91.63 มิลลิโมลาร์ และมีความเร็วสูงสุด (V_{max}) เท่ากับ 58.96, 13.12, 8.61 และ 10.69 ไมโครโมลต่อนาที เมื่อใช้ α-, β-, γ-CD และ maltotriose ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงว่า β-และ γ-CD มีโครงสร้างเหมาะสมสำหรับบริเวณจับกับสับสเตรทมากกว่าโมเลกุลที่เล็กกว่าเช่น α-CD หรือ maltotriose

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต อัญชลี ทองสิมา

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวเพียงแผ่นเดียว

C826142 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: ACTIVE SITE / CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE / CHEMICAL MODIFICATION
ANCHALEE TONGSIMA: THE ACTIVE SITE OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE FROM *Bacillus* sp. A11. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D. 118 pp. ISBN 974-331-512-2.

Chemical modification of CGTase from *Bacillus* sp. A11 was performed under optimized mild conditions. Loss of CGTase activities was observed when modifications were made on carboxyl, histidine, tryptophan, and tyrosine residues by treatment with 1 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), diethylpyrocarbonate (DEP), *N*-bromosuccinimide (NBS) and *N*-acetylimidazole (NAI), respectively. While modification of cysteine, lysine, and serine residues with up to 100 mM concentrations of *N*-ethylmaleimide (NEM), 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid, and phenylmethylsulfonyl fluoride, respectively did not affect CGTase activities. For cysteine modification, iodoacetamide and dithiothreitol treatment gave the same result as NEM. Protection of the active site of CGTase with protective substance (α-, β-, γ-CD, or maltotriose) prior to chemical modification significantly reduced activity loss. These results suggested that carboxyl (aspartic and glutamic acids), histidine, tryptophan, and tyrosine residues were located at the active site of CGTase. In the estimation of the number of histidine, tryptophan, and tyrosine residues at the active site of the enzyme using spectrophotometric determination, it was found that β-CD or γ-CD protects two histidine residues, one tryptophan residue, and two tyrosine residues of CGTase. This suggests the presence of these amino acid residues at the active site of CGTase.

By non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, effect of chemical modification on the enzyme structure was analyzed. The modification of carboxyl groups by EDC resulted in a protein band which moved slower than the unmodified enzyme suggesting that the net negative charges of the enzyme were reduced. Modification of tryptophan by NBS did not change the pattern of protein and activity bands in the gel. When the enzyme was modified by DEP or NAI, faster protein and activity bands were observed. The result suggests that these two reagents induced more net negative charges or structural changes which leads to more exposed negative charges. Analysis by PAGE thus confirms the modification on carboxyl, histidine, tryptophan, and tyrosine residues by EDC, DEP, NBS, and NAI, respectively.

When kinetic parameters of CGTase for cyclodextrin substrates were measured, the Michaelis constant (K_m) values for coupling reaction were 1.55, 1.60, and 1.94 mM and V_{max} values were 2.81, 2.50, and 1.40 μmoles/min for β-CD, maltosyl (G_2)-β-CD, and methyl-β-CD, respectively. For cyclodextrin degrading activity, the K_m values were 3.16, 1.69, 1.42, and 91.63 mM and V_{max} values were 58.96, 13.12, 8.61, and 10.69 μmoles/min for α-; β-, γ-CD, and maltotriose, respectively. The result indicates that β- and γ-CD were more suitable for substrate binding site than the smaller molecules, α-CD or linear maltotriose.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต อัญชลี ทองสีมา

สาขาวิชา ชีวเคมี ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

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 gratitude is also extended to Dr. Tipaporn Limpaseni, Dr. Pairoh Pinphanichakarn and Dr. Suganya Soontaros for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

Grant from The National Science and Technology Development Agency, Ministry of Science, Technology and environment supported this research.

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 sisters for their unlimited love, support and understanding.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENT	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	x
LIST OF FIGURES	xii
ABBREVIATION	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	23
2.1 Equipments	23
2.2 Chemicals	23
2.3 Bacteria	25
2.4 Preparation of anti-CGTase antibodies	25
2.5 Media preparation	25
2.6 Cultivation of Bacteria	25
2.7 Purification of CGTase	26
2.7.1 Starch adsorption	26
2.7.2 Immunoaffinity chromatography	26
2.8 Polyacrylamide gel electrophoresis	27
2.8.1 Non-denaturing PAGE	27
2.8.2 SDS-PAGE	28
2.8.3 Detection of proteins	28
2.8.3.1 Coomassie blue staining	28
2.8.3.2 Dextrinizing activity staining	28
2.9 Enzyme assay	29

2.9.1 Dextrinizing activity assay..... 29
2.9.2 Cyclodextrin-trichloroethylene assay..... 29
2.9.3 Cyclodextrin-forming activity assay..... 30
2.10 Protein determination..... 30
2.11 Reducing sugar determination..... 30
2.12 Kinetic parameters of the cyclodextrin-degrading activity..... 31
2.12.1 Coupling activity assay..... 31
2.12.2 Cyclodextrin-degrading activity assay..... 31
2.13 Determination of suitable conditions of reagents used in the modification..... 32
2.13.1 Effect of modifying reagents concentration..... 32
2.13.1.1 Modification of carboxyl residues..... 32
2.13.1.2 Modification of histidine residues..... 32
2.13.1.3 Modification of tryptophan residues..... 32
2.13.1.4 Modification of tyrosine residues..... 33
2.13.1.5 Modification of cysteine residues..... 33
2.13.1.6 Modification of lysine residues..... 33
2.13.1.7 Modification of serine residues..... 33
2.13.2 Effect of incubation time on modified CGTase activity.. 34
2.13.3 Effect of pH on the modification of CGTase..... 34
2.14 Identification of amino acid residues involved in and present at the catalytic site of CGTase..... 34
2.15 Determination of the number of essential residues..... 34
2.15.1 Determination of the number of histidine residues..... 34
2.15.2 Determination of the number of tryptophan residues.... 35
2.15.3 Determination of the number of tyrosine residues..... 36
2.16 Effect of chemical modification on the structure and enzymatic properties of CGTase..... 36

CHAPTER III RESULTS..... 37
3.1 Purification of CGTase from *Bacillus* sp. A11..... 37
3.2 Chemical modification of CGTase..... 42
3.2.1 Modification of carboxyl residues..... 44
3.2.2 Modification of histidine residues..... 48
3.2.3 Modification of tryptophan residues..... 55
3.2.4 Modification of tyrosine residues..... 62
3.2.5 Modification of cysteine residues..... 66
3.2.6 Modification of lysine residues..... 69
3.2.7 Modification of serine residues..... 69
3.3 Effect of pH on the modification of CGTase..... 69
3.4 Effect of chemical modifications on the structure and enzymatic properties of CGTase..... 72
3.5 Kinetic parameters of CGTase for cyclodextrin substrates..... 74
CHAPTER IV DISCUSSION..... 79
CHAPTER V CONCLUSION..... 96
REFFERENCES..... 97
APPENDICES..... 107
BIOGRAPHY..... 118

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Characteristics of cyclodextrins	4
2.	Industrial applications of cyclodextrins	8
3.	Properties of cyclodextrin glycosyltransferase	11
4.	Summarization of CGTase mechanisms	12
5.	Relationship between length of substrate and mechanism of CGTase	12
6.	Summary of amino acid residues involved in the active sites of CGTase	21
7.	Purification of CGTase from *Bacillus* sp. A11	39
8.	Effect of various group-specific reagents on CGTase activity	43
9.	Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activity of CGTase by EDC	46
10.	Residual CGTase activity of EDC-modified enzyme in the presence and the absence of a protective substance	47
11.	Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activity of CGTase by DEP	50
12.	Residual CGTase activity of DEP-modified enzyme in the presence and the absence of a protective substance	51
13.	Number of histidine residues of CGTase modified by DEP in the presence and the absence of a protective substance	54
14.	Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activity of CGTase by NBS	57
15.	Residual CGTase activity of NBS-modified enzyme in the presence and the absence of a protective substance	58

16. Number of histidine residues of CGTase modified by NBS in the presence and the absence of a protective substance..... 61
17. Effect of substrate on the inactivation of dextrinizing activity of CGTase by NAI..... 64
18. Residual CGTase activity of NAI-modified enzyme in the presence and the absence of a protective substance..... 65
19. Number of histidine residues of CGTase modified by NAI in the presence and the absence of a protective substance..... 68
20. Effect of various concentrations of chemical modifying agents on CGTase activity..... 70
21. Effect of pH on the modification of CGTase..... 71
22. Kinetic parameters of CGTase for cyclodextrin substrates..... 77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Structure and molecular dimension of cyclodextrins	2
2.	Structure of β-cyclodextrin	3
3.	Beneficial modification of guest molecules by cyclodextrins	6
4.	Guest orientation in CD-guest complex	7
5.	Model of CGTase mechanism from *Klebsiella pneumoniae* M5 al	14
6.	Alignment of amino acid sequences of bacterial CGTases	18
7.	Purification of CGTase from *Bacillus* sp. A11 by immunoaffinity column chromatography	38
8.	SDS-PAGE of CGTase from different steps of purification	40
9.	Non-denaturing PAGE of CGTase from different steps of purification	41
10.	Effect of EDC on CGTase activity	45
11.	Inactivation of CGTase activity by 5 mM EDC	45
12.	Effect of DEP on CGTase activity	49
13.	Inactivation of CGTase activity by 0.225 mM DEP	49
14.	Absorption spectra of CGTase before and after modification with DEP	53
15.	Effect of NBS on CGTase activity	56
16.	Inactivation of CGTase activity by 0.05 mM NBS	56
17.	Absorption spectra of CGTase before and after modification with NBS	60
18.	Effect of NAI on CGTase activity	63
19.	Inactivation of CGTase activity by 30 mM NAI	63

20. Absorption spectra of CGTase before and after modification with NAI..... 67

20. Non-denaturing PAGE of CGTase modified by different modifying reagents..... 73

21. Lineweaver-Burk plot of CGTase with β-cyclodextrin as substrate..... 76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATION

A	absorbance
BSA	bovine serum albumin
CD	cyclodextrin
CGTase	cyclodextrin glycosyltransferase
cm	centimeter
°C	degree Celsius
g	gram
h	hour
IgG	immunoglobulin G
l	litre
mA	milliampere
min	minute
µl	microlitre
ml	millilitre
mM	millimolar
M	molar
nm	nanometer
rpm	revolution per minute

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย