การกลายพันธุ์ยีนไซโคลเด็กซ์ทรินกลูคาโนแทรนส์เฟอเรสเพื่อตรวจสอบความทนร้อนของเอนไซม์

นางสาวเรวดี สิริธัญญานนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-3787-4

ลิขสิทธิ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTAGENESIS OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE TO DETERMINE THE THERMOSTABILITY OF THE ENZYME

Miss Raevadee Siritunyanont

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005

ISBN 974-17-3787-4

481728

Thesis Title	Mutagenesis of cyclodextrin glucanotransferase gene to determine the thermostability of the enzyme
By	Raevadee Siritunyanont
Field of study	Biochemistry
Thesis Advisor	Associate 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 Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

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

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

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

..... Member
(Teerapong Buaboocha, Ph.D.)

เรวดี สิริธัญญานนท์ : การกลายพันธุ์ยีนบีตาไซโคลเด็กซ์ทรินกลูคาโนแทรนส์เฟอเรสเพื่อตรวจสอบความทนร้อนของเอนไซม์ (MUTAGENESIS OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE TO DETERMINE THE THERMOSTABILITY OF THE ENZYME). อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วิเชียร ริมพณิชยกิจ, 76 หน้า, ISBN 974-17-3787-4

ไซโคลเด็กซ์ทริน (CD) เป็นออลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ประกอบด้วยกลูโคสจำนวน 6, 7 และ 8 หน่วย มาเชื่อมต่อกันเป็นวงด้วยพันธะ α-1,4-glycosidic มีชื่อเรียกว่า α-, β- และ γ-ไซโคลเด็กซ์ทริน ตามลำดับ CD เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยแป้งของเอนไซม์ไซโคลเด็กซ์ทรินกลูคาโนแทรนส์เฟอเรส (CGTase) ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้ CGTase ประกอบด้วย 5 โดเมน คือ A, B, C, D และ E โดเมน A/B เป็นโดเมนเร่งปฏิกิริยาในขณะที่โดเมนอื่นทำหน้าที่อื่น ๆ ประกอบ อุตสาหกรรมการผลิตCD จะต้องทำให้แป้งเปลี่ยนเป็นของเหลวโดยใช้อุณหภูมิสูง จากนั้นจึงนำมาทำปฏิกิริยากับ CGTase ที่อุณหภูมิต่ำกว่า ดังนั้น หากใช้ CGTase ทนร้อนจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิต CD จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง CGTase จาก *Bacillus circulans* A11 กับ CGTase ทนร้อน พบว่า มีความแตกต่าง 4 บริเวณ คือ บริเวณ I, II, III และ IV ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน 89-94, 265-271, 333-339 และ 538-540 (ลำดับตำแหน่งของ CGTase จาก *B. circulans* A11) ตามลำดับ บริเวณ I–III ที่เกี่ยวข้องอยู่ในโดเมน A/B ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการกลายพันธุ์บริเวณทั้ง 3 ให้มีความคล้ายคลึงกับ CGTase ทนร้อนโดยวิธี unique site elimination (USE) mutagenesis พลาสมิดกลายพันธุ์ในบริเวณ I, II และ III ที่ได้ มีชื่อเรียกว่า pRS1, 2 และ 3 ตามลำดับ แล้วทำการสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มีบริเวณกลายพันธุ์แบบต่าง ๆ จากนั้น ทำการศึกษา dextrinizing activity, thermostabilty และ CD forming activity ของเอนไซม์กลายพันธุ์ที่ได้จากโคลนเหล่านี้ เพื่อตรวจสอบว่า บริเวณแตกต่างดังกล่าวมีผลต่อเสถียรภาพของ CGTase อย่างไร พบว่า ทั้ง 3 บริเวณกลายพันธุ์มีผลให้ dextrinizing activity สูงขึ้น อุณหภูมิเหมาะสมลดลง และเสถียรภาพต่อความร้อนไม่เพิ่มขึ้น มิวแทนต์ทุกตัวมีความสามารถสร้าง CD ได้ และมีความจำเพาะต่อการสร้างผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป ยกเว้น 1 ตัวที่มีความจำเพาะต่อการสร้างผลิตภัณฑ์เหมือนเดิม

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

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

ปีการศึกษา.....2548..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4672388023 : MAJOR BIOCHEMISTRY
KEY WORD: cyclodextrin / cyclodextrin glucanotransferase / thermostability

RAEVADEE SIRITUNYANONT : MUTAGENESIS OF CYCLODEXTRIN GLUCANOTRANSFERASE GENE TO DETERMINE THE THERMOSTABILITY OF THE ENZYME. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. VICHIEN RIMPHANITCHAYAKIT, (Ph.D.), 76pp. ISBN 974-17-3787-4

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides of 6, 7 and 8 glucose units, linked by α-1,4-glycosidic bonds, called α-, β- and γ-cyclodextrins, 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. The CGTase consists of 5 domains, A, B, C, D and E. Domains A/B is the central catalytic domains while others perform accessory functions. The commercial production of CDs required that the starch be liquefied at high temperature before the CGTase reaction at much lower temperature. Thermostable CGTase would, therefore, be useful for efficient production of CDs. By using amino acid sequence comparison between the *Bacillus circulans* A11 CGTase and the thermostable CGTases, four major different regions I, II, III and IV were found at position 89-94, 265-271, 333-339, and 538-540 (*B. circulans* A11 CGTase numbering), respectively. The relevant regions I-III were located in domains A/B. In this study, these three regions in β-CGTase from *Bacillus circulans* A11 were mutated in favor of the thermostable CGTase sequences using the unique site elimination (USE) mutagenesis method. The mutant plasmids, pRS1, 2 and 3 that have the mutation region I, II, and III, respectively, were obtained. Then, the recombinant plasmids containing the various combinations of the 3 mutation regions were constructed. The dextrinizing activity, thermostability and CD-forming activity of the mutant enzymes from these clones were studied in order to determine whether these different regions affect the stability of CGTase. We found that all the three mutation regions gave rise to an increase in dextrinizing activity, a decrease in optimum temperature and no increase in thermostability. All CGTase mutants were active in CD-forming activity; all but one with altered product specificity.

Department .....Biochemistry..... Student's signature Raevadee Siritunyanont
Field of study ....Biochemistry..... Advisor's signature
Academic year .....2005..... Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere thanks and deep appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Vichien Rimphanitchayakit, whose an excellent instruction, a valuable molecular knowledge, a critical comments, a useful guidance, and supporting idea are given throughout this thesis. Special thanks too are extended to Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Associate Professor Dr. Siriporn Sittipraneed, Dr. Rath Pitchayangkura and Dr. Teerapong Buaboocha for serving as the thesis committees and their valuable comments.

My appreciation is expressed to Bureau of Laboratory Quality Standards, Department of Medical Sciences for the permission and also my colleague's encouragement to study for my master degree.

Rajadapiseksompote Research Fund from Chulalongkorn University supporting this research is also gratefully acknowledged.

Special thanks are expressed to Hematology Section, National Institute of Health, Department of Medical Sciences, for some DNA sequencing.

Sincere thanks are extended to all staff members, especially Room 617 and friends in the Biochemistry and Biotechnology Department for their assistance and friendships.

Last but not least, the greatest gratitude is expressed to my family for their love, care, support and understanding that I have spent my time with this thesis rather than with them. Finally, I would like to thanks myself for my patience, intention and attempts.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
ABBREVIATION	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1. Application of cyclodextrins	5
1.2. Limitation of commercial CD production by CGTase	5
1.3. Three-dimensional structure of CGTase	6
1.4. CGTase reaction and its catalytic mechanism	10
1.5. Thermostability of CGTases	12
1.6. Protein engineering for CGTase thermostability	16
1.7. Scope of this study	17
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	19
2.1. Equipments	19
2.2. Chemicals	20
2.3. Bacterial strains	21
2.4. Plasmid vectors	21
2.5. Enzymes	21
2.6. Media preparation	22
2.7. General techniques in genetic engineering	22
2.7.1. Preparation of competent cells	22
2.7.2. Electroporation	23
2.7.3. Plasmid preparation	23
2.7.4. Agarose gel electrophoresis	24
2.7.5. Extraction of the DNA fragment from agarose gel	24
2.7.6. Preparation of the single-stranded plasmid	25
2.7.7. Phosphorylation of oligonucleotide primers	25
2.8. Mutagenesis of β-CGTase gene using the USE (Unique site elimination) procedure	26
2.9. Construction of recombinant plasmids containing various combination of the mutant sites	28

Page

2.10. Detection of the mutant CGTase activity..... 29
2.10.1. Dextrinizing activity..... 29
1.10.1.1. Halozone on LB-starch agar..... 29
1.10.1.2. Dextrinizing activity assay..... 29
2.10.2. CGTase thermostability testing..... 30
2.10.3. CD forming activity..... 30
2.11. Protein determination..... 31
CHAPTER III RESULTS..... 32
3.1. Comparison of the amino acid sequence of the CGTase from *Bacillus circulans* A11 with those of other thermostable CGTase and the design of mutagenic primers 32
3.2. Mutagenesis of CGTase gene from *Bacillus circulans* A11 using USE mutagenesis 37
3.3. DNA sequence determination of the mutation sites..... 39
3.4. Construction of the mutant CGTases..... 40
3.5. The activities of the mutant CGTases..... 44
3.5.1. Halo zone on LB-starch agar..... 44
3.5.2. Dextrinizing activity assay at various temperatures..... 46
3.5.3. Thermostabilities of the CGTases..... 49
3.5.4. Cyclodextrin forming activities..... 51
CHAPTER IV DISCUSSION..... 55
CHAPTER V CONCLUSION..... 65
REFERENCES..... 66
APPENDICES..... 72
APPENDIX A..... 73
APPENDIX B..... 75
BIOGRAPHY..... 76

LIST OF TABLES

Table		Page
1.1.	Characteristics of α-, β-, and γ-CDs	4
1.2.	Some mesophilc and thermophilic CGTase characteristics	14
3.1	Dextrinizing activity assay of wild-type and mutant CGTases	47
3.2	Specific activities of wild-type and mutant CGTases in the thermostability assay	49
3.3	CD-forming activity of the CGTases	54

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.1.	Schematic representation of the action of starch-processing enzymes.	2
1.2.	Structures and properties of cyclodextrins	4
1.3.	Comparison of the three dimensional structure: α-amylase from *Bacillus subtilis* and CGTase from *Bacillus circulans* strain 251	7
1.4.	Domain level organization of starch-degradating enzymes	8
1.5.	The parallel $(\alpha/\beta)_8$ or TIM barrel	8
1.6.	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	9
1.7.	The structure of a representation of the CGTase, *Bacillus circulans* 251	10
1.8.	Schematic representation of the CGTase-catalysed reactions	11
1.9.	The catalytic reaction of CGTase, which involved cyclization, disproportionation and hydrolysis	12
1.10.	The three dimensional structures of two thermostable CGTases : (A) *Thermoanaerobacterium thermosilfurigenes* EM1 (Tabium) (PDB: 1CIU) and (B) *Bacillus stearothermophilus* (PDB: 1CYG)	14
1.11.	The three dimensional structures of two mesophilic CGTases : (A) mesophilic *B. circulans* 251 (BC251, PDB: 1CDG) and *B. circulans* 8 (BC8, PDB: 1CGT)	15
1.12.	Alignment of amino acid sequences of mesophilic and thermophilic CGTases. BC251: *B. circulans* 251 (PDB: 1CDG), BC8: *B. circulans* 8 (PDB: 1CGT), BST2: *B. stearothermophilus* (PDB: 1CYG) and Tabium; *Thermoanaerobacterium thermosilfurigenes* EM (PDB: 1CIU)	15
2.1.	The mutageneic oligonucleotides used to produce the mutations in the USE mutagenesis procedure	26
2.2.	Schematic diagram of USE mutagenesis protocol	28
3.1.	Amino acid sequence comparison of the various CGTases	34
3.2.	The design of oligonucleotides used in the USE mutagenesis procedure	36
3.3.	Restriction digestion of pRS1A, 1B, 2, and 3	38
3.4.	The mutated plasmids, pRS1A, 1B, 2 and 3	38
3.5.	Nucleotide sequencing of mutant regions I_A, I_B, II, and III in pRS1A, 1B, 2 and 3, respectively	39
3.6.	Summary of the mutant CGTase conctructs	42
3.7.	Restriction digestion of pRS4A, 4B, 5, 6, 7A and 7B	43
3.8.	Restriction digestion of pRS8A, 8B, 9, 10A and 10B	43
3.9.	Iodine test for dextrinizing activity of wild-type and mutant CGTases	44

3.10. Summary of the iodine test for dextrinizing activity of the wild-type and the mutant CGTases..... 46
3.11. Dextrinizing activity assay of the wild-type and mutant CGTases..... 48
3.12. Thermostability of the wild-type and mutant CGTases..... 50
3.13. HPLC profiles of cyclodextrins formed by the wild-type and mutant CGTases..... 52
4.1. Comparison of three dimensional structures between CGTase from *Bacillus* sp.1011 (PDB: 1I75) (A) and CGTase from *B.circulans* A11 (B)..... 58
4.2. Comparison of three dimensional structures between wild type CGTase.from *B. circulans* A11 (A) and mutant CGTase from recombinant plasmid pRS10A (B), pRS10B (C)..... 58
4.3. Schematic view of the interactions between the EM1 CGTase and a maltohexaose inhibitor bound from subsites –3 to +3..... 60
4.4 Location of the three mutations regions relative to the binding subsites, presented by the maltononaose..... 60
4.5. Comparison of the three-dimensional structures of CGTase at mutation site I (subsite-3) between pRS10A (A) and pRS10B(B)..... 64

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
mg	Milligram
rpm	Revolution per minute
nm	Nanometre