

ความจำเพาะของตัวรับและปฏิกิริยาแทรนส์กลูโคซิเลชันของแอมิโลมอลเทสจาก
Corynebacterium glutamicum



นางสาวชिरาภรณ์ นวมทอง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5472848523

ACCEPTOR SPECIFICITY AND TRANSGLUCOSYLATION REACTION OF AMYLOMALTASE
FROM *Corynebacterium glutamicum*

Miss Wachiraporn Naumthong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biochemistry and Molecular
Biology

Department of Biochemistry

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

Thesis Title ACCEPTOR SPECIFICITY AND
TRANSGLUCOSYLATION REACTION OF
AMYLOMALTASE FROM *Corynebacterium
glutamicum*
By Miss Wachiraporn Naumthong
Field of Study Biochemistry and Molecular Biology
Thesis Advisor Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.

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

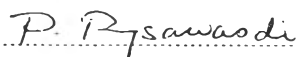


..... Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)

THESIS COMMITTEE



..... Chairman
(Professor Anchalee Tassanakajon, Ph.D.)



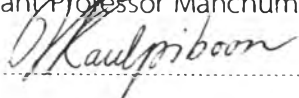
..... Thesis Advisor
(Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)



..... Examiner
(Assistant Professor Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)



..... Examiner
(Assistant Professor Manchumas Prousoontorn, Ph.D.)



..... External Examiner
(Associate Professor Jarunee Kaulpiboon, Ph.D.)

วชิราภรณ์ นวมทอง : ความจำเพาะของตัวรับและปฏิกิริยาทรานส์กลูโคซิเลชันของแอมิโลมอลเตสจาก *Corynebacterium glutamicum*. (ACCEPTOR SPECIFICITY AND TRANSGLYCOSYLATION REACTION OF AMYLOMALTASE FROM *Corynebacterium glutamicum*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ , 121 หน้า.

แอมิโลมอลเตส เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม 4-แอลฟา-กลูคาโนทรานส์เฟอเรส ที่เร่งปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่กลูโคซิล ของสายพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งแบบภายในโมเลกุล ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไซโคลเดกซ์ทรินวงใหญ่ และแบบระหว่างโมเลกุลซึ่งเป็นการโยกย้ายหมู่กลูโคซิลจากแป้งหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ไปยังตัวรับที่เหมาะสม ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์สายตรงหรือกลูโคไซด์ งานวิจัยนี้สนใจศึกษาความจำเพาะของตัวรับในปฏิกิริยาทรานส์กลูโคซิเลชันและทำการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ โดยเริ่มจากการทำรีคอมบิแนนท์แอมิโลมอลเตสจาก *Corynebacterium glutamicum* ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ HisTrap affinity เอนไซม์บริสุทธิ์แสดงแถบโปรตีนหลัก 1 แถบ ขนาด 84 กิโลดาลตัน บน SDS-PAGE เมื่อศึกษาความจำเพาะของตัวรับในปฏิกิริยาทรานส์กลูโคซิเลชัน โดยใช้สารละลายแป้งมันฝรั่งเป็นตัวให้หมู่กลูโคซิล และใช้ตัวรับ 3 กลุ่ม คือ แอลกอฮอล์สายสั้น ฟลาไวโนอยด์ และแซ็กคาไรด์ เมื่อใช้แอลกอฮอล์สายสั้น (เมทานอล เอทานอล โพรพานอล และบิวทานอล) เป็นตัวรับหมู่กลูโคซิล พบว่าแอลกอฮอล์สายสั้นทั้ง 4 ชนิด ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ไม่สามารถเป็นตัวรับหมู่กลูโคซิล ส่วนในกลุ่มแซ็กคาไรด์ พบว่ากลูโคส มอลโทส มอลโทโทรโอส และมอลโทเทระโอส เป็นตัวรับที่ดี แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะกับกลูโคสที่มีการจัดเรียงตัวของหมู่ไฮดรอกซิลที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่ง 2, 4 และ 6 เป็นแบบแอลฟา และมีความยาวตั้งแต่ 1 ถึง 4 หน่วย จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ที่เกิดขึ้นจากตัวรับทั้งสามกลุ่ม ด้วยเทคนิค TLC และ HPLC พบว่า ไม่พบผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ เมื่อใช้แอลกอฮอล์สายสั้นและฟลาไวโนอยด์ (เฮสเปอร์รีดิน นารินจิน ฟิโนสโตรบิน ไฟซิดิน เอพิแคทีซิน และเอพิแกลโลแคทีซิน แกลเลต) เป็นตัวรับ แต่พบผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ เมื่อใช้มอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (G1-G4) แมนโนส ซูโครส และพาลาทีโนส เป็นตัวรับ ได้คัดเลือกพาลาทีโนสเป็นตัวรับที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากโอกาสจะได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ และปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น จากนั้นหาภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ โดยพบว่าการบ่มเอนไซม์ 5 หน่วยต่อมิลลิลิตร กับ 7.5 มิลลิโมลาร์พาลาทีโนส และสารละลายแป้งมันฝรั่ง ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 6.0 ที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ 67.2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นขยายสเกลการสังเคราะห์และแยกผลิตภัณฑ์กลูโคไซด์ด้วยคอลัมน์ Biogel-P2 และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วย HPAEC พบว่าพาลาทีโนสกลูโคไซด์ (PGs) ที่ได้คือ PG1-PG15 โดยมีทรานส์แซ็กคาไรด์ PG1 เป็นผลิตภัณฑ์หลัก เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค MS และ NMR พบว่า พาลาทีโนสกลูโคไซด์มีมวลโมเลกุล 504 ดาลตัน และเกิดจากพาลาทีโนสเชื่อมกับกลูโคสด้วยพันธะแอลฟา 1,4 โดยพาลาทีโนสกลูโคไซด์ทั้งสายสั้นและสายยาวมีความหวานน้อยกว่าพาลาทีโนสและซูโครส และมีสมบัติการดูดความชื้นสูงกว่าพาลาทีโนส แต่มีปริมาตรที่อัดตัวได้ดีเท่ากับพาลาทีโนส จากสมบัติดังกล่าว จึงอาจนำพาลาทีโนสกลูโคไซด์ไปใช้แทนซูโครสหรือพาลาทีโนสในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอางได้

ภาควิชา ชีวเคมี

ลายมือชื่อนิสิต รัชชางค์ณัฐ พงษ์สวัสดิ์

สาขาวิชา ชีวเคมีและชีววิทยาโมเลกุล

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก Dr. Piamsuk Pongswadit

ปีการศึกษา 2556

5472848523 : MAJOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

KEYWORDS: AMYLOMALTASE / GLUCOSIDES / PALATINOSE / TRANSGLUCOSYLATION

WACHIRAPORN NAUMTHONG: ACCEPTOR SPECIFICITY AND TRANSGLUCOSYLATION REACTION OF AMYLOMALTASE FROM *Corynebacterium glutamicum*. ADVISOR: PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., 121 pp.

Amylomaltase, a 4- α -glucanotransferase, catalyzes intramolecular transglucosylation reaction producing large-ring cyclodextrins (LR-CDs) and intermolecular transglucosylation reaction in which glucosyl units of starch or related oligosaccharides are transferred to suitable acceptors resulting in linear oligosaccharides or glucosides. This work aims at determination of specificity of acceptors in intermolecular transglucosylation reaction for the synthesis of glucoside products. The recombinant amylomaltase from *Corynebacterium glutamicum* was purified by HisTrap affinity column. The purified enzyme showed a major protein band of 84 kDa on SDS-PAGE. Transglucosylation reaction catalyzed by amylomaltase using soluble potato starch as glucosyl donor and three types of acceptor: short chain alcohols, flavonoids and saccharides were analyzed. The results showed that short chain alcohols consisting of methanol, ethanol, propanol and butanol could not act as glucosyl acceptor at all concentrations tested. In contrast, glucose, maltose, maltotriose and maltotetraose were good saccharide acceptors indicating that this enzyme preferred hexose structure containing α -OH at C2, C4 and C6 with up to 4 glucose units. Then glucoside products were analyzed by TLC and HPLC techniques. The glucoside products could not be detected when all of short chain alcohols and flavonoids (hesperidin, naringin, pinostrobin, fisetin, epicatechin and epigallocatechin gallate) were used as acceptor, but the products were detected when acceptors were maltooligosaccharides (G1-G4), mannose, sucrose and palatinose. Palatinose was chosen as suitable acceptor on account of possibly getting new product and considerable amounts obtained. The optimal condition for synthesis of palatinose glucosides (PGs) was to incubate 5 U/ml amylomaltase with 7.5 mM palatinose and 1.0% (w/v) soluble potato starch in 50 mM phosphate buffer, pH 6.0 at 30 °C for 24 hours and 67.2% yield was obtained. Then the reaction was up scaled and PGs were separated by Biogel-P2 column and analyzed by HPAEC. PG1-PG15 were detected with a trisaccharide PG1 as a main product. By MS and NMR, the size of PG was 504 Da and the linkage between palatinose and glucose unit was of the α -1,4 type. The short chain and long chain PGs are less sweet than palatinose and sucrose, but have higher hygroscopic property than palatinose. However, prebiotic activity is the same. From PGs properties, they can thus be used to replace sucrose or palatinose in food and cosmetic products.

Department: Biochemistry

Student's Signature

Wachiraporn Naumthong

Field of Study: Biochemistry and Molecular
Biology

Advisor's Signature

P. Pongsaawadi

Academic Year: 2013



ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi, my advisor, for all her excellent guidance, instruction, attention and support throughout my thesis.

Sincere thanks to Professor Dr. Anchalee Tassanakajon, Assistant Professor Dr. Kanoktip Packdibamrung, Assistant Professor Dr. Manchumas Prousoontorn and Associate Professor Dr. Jarunee Kaulpiboon who serve as the committees, for their comments and suggestion.

Thanks to all members of the Starch and Cyclodextrin Research Unit and friends in the Biochemistry Department, for help and friendship.

Finally, I would like to express the greatest gratitude to my parents for their willpower and heartiness.

My fellowship from Chulalongkorn University graduate scholarship to commemorate the 72nd anniversary of his Majesty King Bhumibol Adulyadej and the research funding from IAC of CU Centenary Academic Development Project are acknowledged.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Starch	1
1.2 Amylases and 4 α -glucanotransferase	3
1.3 Amylomaltase.....	7
1.4 Applications of amylomaltase	8
1.5 Acceptor specificity and synthesis of glucoside products.....	11
1.5.1 Synthesis of glucoside products by chemical method.....	11
1.5.2 Synthesis of glucoside products by enzymatic method	11
1.5.2.1 Glycosidases.....	11
1.5.2.2 Glycosyltransferases.....	13
1.5.2.3 Previous studies on enzyme synthesis of glucoside products.....	13
Synthesis by 4 α GTase : by CGTase.....	15
Synthesis by 4 α GTase : by amylomaltase	17
Synthesis by other hydrolases and transferases	18
Synthesis of palatinose glucosides by phosphorylase	21
1.6 Objectives.....	21
Research steps:	22
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS.....	23
2.1 Equipments	23
2.2 Chemicals	24



	Page
2.3 Bacteria strain	27
2.4 Medium preparation.....	27
2.5 Starter culture	27
2.6 Preparation and purification of enzyme	27
2.7 Starch transglucosylation activity assay	28
2.8 Determination of protein concentration.....	29
2.9 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....	29
2.10 Determination of acceptor specificity and synthesis of glucoside products.....	30
2.11 TLC analysis	31
2.12 HPLC analysis.....	32
2.13 Optimization of the synthesis of glucoside products	32
Effect of acceptor concentration	33
Effect of donor concentration	33
Effect of enzyme concentration.....	33
Effect of incubation time	33
2.14 Large scale preparation, product separation and identification	34
2.15 Phenol-sulfuric acid method.....	34
2.16 High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD).....	34
2.17 Characterization of glucoside products	35
2.17.1 Mass Spectrometry (MS).....	35
2.17.2 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	35
2.17.3 Sweetness test	35
2.17.4 Hygroscopic test.....	36
2.17.5 Prebiotic activity.....	36
2.17.6 Antibacterial activity.....	36
CHAPTER III RESULTS	38
3.1 Preparation and purification of amyloamylase from <i>C. glutamicum</i>	38



200306181

	Page
3.2 Determination of acceptor specificity and synthesis of glucoside products.....	38
3.3 Analysis of glucoside products by TLC and HPLC	53
3.4 Optimization of the synthesis of glucoside products	61
Effect of acceptor concentration	61
Effect of donor concentration	62
Effect of enzyme concentration.....	62
Effect of incubation time	62
3.5 Preliminary characterization of glucoside products	63
3.6 Large scale preparation, product separation and identification	67
3.7 Characterization of palatinose glucoside products	78
3.7.1 Mass Spectrometry (MS).....	78
3.7.2 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	78
3.7.3 Sweetness test	78
3.7.4 Hygroscopic test.....	78
3.7.5 Prebiotic activity.....	82
3.7.6 Antibacterial activity.....	82
CHAPTER IV DISCUSSION	86
4.1 Preparation and purification of amylomaltase from <i>C. glutamicum</i>	86
4.2 Determination of acceptor specificity and the synthesis of glucoside products	86
4.3 Analysis of glucoside products by TLC and HPLC	90
4.4 Optimization of the synthesis of glucoside products	95
4.5 Large scale preparation, product separation and identification	96
4.6 Characterization of glucoside products properties.....	98
MS and ¹ H-NMR.....	98
Sweetness test	98
Hygroscopic test.....	99
Prebiotic activity.....	99



	Page
Antibacterial activity.....	100
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	101
REFERENCES	102
Appendix A Preparation of stock solution for SDS-PAGE.....	113
Appendix B Working solution for SDS-PAGE.....	114
Appendix C Preparation for buffer solution.....	115
Appendix D BSA standard curve for protein determination by.....	116
Bradford method.....	116
Appendix E Standard curve of sucrose (a) and palatinose (b).....	117
for sweet test.....	117
Appendix F Structure of flavonoid acceptors	118
Appendix G Structure of saccharide acceptors	119
VITA.....	121



LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 Amylose content in different sources of starch.....	2
1.2 Main substrates of the enzyme in amylase family.....	4
3.1 Purification of recombinant amyloamaltase from <i>C. glutamicum</i>	40
3.2 Relative mobility (Rf) values of standard G1-G7 and glucoside products from glucose acceptor detected by TLC	52
3.3 Relative mobility (Rf) values of standard G1-G7 and glucoside products from maltotriose and maltotetraose	55
3.4 Relative mobility (Rf) values of standard G1-G7 and glucoside products from mannose, palatinose, sucrose and maltopentaose	57
3.5 HPLC retention time (Rf) of palatinose glucosides previously Separated by Biogel-P2	74
3.6 Relative sweetness of palatinose glucoside products	81



LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Starch components: amylose and amylopectin.....	2
1.2 The enzymes that catalyze the hydrolysis of glycosidic bond of starch.....	5
1.3 4- α -glucanotransferase catalyzes four different reactions.....	5
1.4 Top and side views of two left-handed single helices of LR-CDs with DP26.....	9
1.5 HPLC chromatogram of potato starch.....	9
1.6 Formation of glycosidic bond by chemical synthesis	12
1.7 Schematic of the synthesis of oligosaccharides and glucoside products.....	12
1.8 The synthesis of glucoside products or oligosaccharides by glycosidases.....	14
1.9 Synthesis of glucoside products by Leloir or non-Leloir glycosyltransferases ...	14
3.1 Purification chromatogram of amyloamylase by HisTrap affinity column	39
3.2 Crude and purified recombinant amyloamylase analyzed by SDS-PAGE.....	40
3.3 Enzyme stability in various concentrations of methanol and ethanol	42
3.4 Enzyme stability in various concentrations propanol and butanol	43
3.5 Relative starch transglucosylation activity with different saccharide acceptors	45
3.6 TLC chromatogram of reaction mixtures containing short chain alcohol acceptors.....	46
3.7 TLC chromatogram of reaction mixtures containing hesperidin and naringin acceptor	48
3.8 TLC chromatograms of reaction mixtures containing pinostrobin and fisetin	49
3.9 TLC chromatogram of reaction mixtures containing epicatechin and epigallocatechin gallate	50
3.10 TLC chromatogram of reaction mixtures containing glucose, fucose, ascorbic acid and arabinose acceptor.....	51
3.11 TLC chromatogram of reaction mixtures containing various maltotriose, maltotetraose and lactose acceptor.....	54
3.12 TLC chromatogram of reaction mixtures containing mannose, palatinose, sucrose, cellobiose, melibiose and maltopentaos acceptor	56
3.13 TLC chromatograms of glucoside products from mannose and palatinose.....	58



Figures	Page
3.14 HPLC chromatograms of glucoside products synthesized by amyloamylase using two substrates: soluble potato starch donor and mannose acceptor.....	59
3.15 HPLC chromatograms of glucoside products synthesized by amyloamylase using two substrates: soluble potato starch donor and palatinose	60
3.16 Effect of palatinose concentration and soluble potato concentration on the synthesis of glucoside products	64
3.17 Effect of enzyme concentration and incubation time on the synthesis of glucoside products.....	65
3.18 HPLC chromatogram of palatinose glucoside product	66
3.19 Biogel-P2 profile of palatinose glucosides	68
3.20 HPLC chromatograms of palatinose glucosides previously separated by Biogel-P2 column	69
3.21 HPAEC chromatograms of palatinose glucosides previously separated by Biogel-P2 column	75
3.22 TOF mass spectrum of palatinose and PG1 and PG2.....	79
3.23 ¹ H-NMR spectrum of palatinose and PGs	80
3.24 Weight increased of palatinose and both PGs from hygroscopic test	81
3.25 HPAEC chromatograms of palatinose incubated without and with rat intestinal enzymes	83
3.26 HPAEC chromatograms of short chain PGs without and with rat intestinal enzymes	84
3.27 HPAEC chromatograms of long chain PGs incubated without and with rat intestinal enzymes	85
4.1 Schematic overviews of binding of maltononaose (G9) in the active site of CGTase from <i>B. circulans</i> strain 251 and binding of maltoheptaose (G7) in the active site of amyloamylase from <i>T. thermophilus</i> HB8.	94
4.2 The structure of palatinose glucosides (PG) _n	98

