การแยกและลักษณะสมบัติของไอโซไซม์ของไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส จาก *Bacillus* sp. A11

นางสาวกรรณิการ์ เกศกะงาม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-519-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE ISOZYMES FROM *Bacillus* sp. A11

Miss Kannika Kaskangam

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1998

ISBN 974-331-519-5

Thesis title	Isolation and Characterization of Cyclodextrin Glycosyltransferase Isozymes from *Bacillus* sp. A11
By	Miss Kannika Kaskangam
Program	Biotechnology
Thesis advisor	Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, 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

(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)

..... Member

(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

..... Member

(Kanoktip Packdibamrung, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

กรรณิการ์ เกศกะงาม : การแยกและลักษณะสมบัติของไอโซไซม์ของไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิล-ทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus* sp. A11. (Isolation and characterization of cyclodextrin glycosyltransferase isozymes from *Bacillus* sp. A11) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์, 115 หน้า. ISBN 974-331-519-5.

เมื่อนำไซโคลเด็กซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรสจาก *Bacillus* sp. A11 มาแยกไอโซไซม์โดยใช้เทคนิค preparative gel electrophoresis พบว่าประกอบด้วย 4 ไอโซไซม์ (แถบที่ 1, 2, 3 และ 4) ที่มีค่า pI 4.73, 4.49, 4.40 และ 4.31 ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยอิเลคโตรโฟเรซิสในสภาวะเสียสภาพ พบว่าทั้ง 4 ไอโซไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันคือ 72,000 ดาลตัน และเมื่อวิเคราะห์ด้วยอิเลคโตรโฟเรซิสในสภาวะไม่เสียสภาพแล้วย้อมด้วย Periodic acid-Shiff's reagent และวัดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method พบว่าไอโซไซม์ดังกล่าวเป็นไกลโคโปรตีนที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกันคือ 20.5, 18.7, 14.4 และ 46.7% โดยน้ำหนัก ในการศึกษาลักษณะสมบัติของแต่ละไอโซไซม์พบว่า แถบที่ 1, 2, 3 และ 4 มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 6.0-7.0, 6.0-7.0, 6.0 และ 7.0, อุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 40°C, 40°C, 50°C และ 50-60°C และ สัดส่วนของผลิตภัณฑ์ α-, β-, และ γ-cyclodextrin ที่ได้คือ 10:18:5, 9:18:5, 5:18:5 และ 5:18:7 ตามลำดับ และยังพบว่าปริมาณและชนิดของน้ำตาลสายตรงที่ผลิตโดยแต่ละไอโซไซม์มีความแตกต่างกัน ผลการวิจัยดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าไอโซไซม์ของ CGTase อาจมีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาต่างกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงปริมาณของ กรดอะมิโนแต่ละชนิดที่เป็นองค์ประกอบในไอโซไซม์ ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันโดยเฉพาะปริมาณของ กลูตามีน ฮิสติดีน อะลานีน อาร์จินีน โพรลีน และ ไทโรซีน.

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C827052 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE/ ISOZYME
KANNIKA KASKANGAM : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CYCLODEXTRIN GLYCOSYLTRANSFERASE ISOZYMES FROM *Bacillus* sp. A11. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D. 115 pp. ISBN 974-331-519-5.

Cyclodextrin glycosyltransferase isozymes from *Bacillus* sp. A11 were purified by preparative gel electrophoresis. Four isozymes (bands 1, 2, 3 and 4) were separated by this technique with purification factor up to 211 folds. Their isoelectric points were estimated by isoelectrofocusing gel to be 4.73, 4.49, 4.40 and 4.31, respectively. Their molecular weights on sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis were 72,000 daltons. They were proved to be glycoproteins by Periodic acid-Shiff's staining on native-gel electrophoresis. Their carbohydrate contents were determined by phenol-sulfuric acid method to be 20.5, 18.7, 14.4 and 46.7% (w/w), respectively. Some physical and biochemical properties were analyzed. Their pH optima were 6.0-7.0, 6.0-7.0, 6.0 and 7.0, temperature optima were 40°C, 40°C, 50°C and 50-60°C and the ratio of α-, β-, and γ-cyclodextrins produced were determined as 10:18:5, 9:18:5, 5:18:5 and 5:18:7 for bands 1, 2, 3 and 4, respectively. Moreover, distinct linear oligosaccharide products were observed. The result obtained indicated that these 4 isozymes may be catalytically different. Study on their amino acid compositions showed significant difference on the content of glutamine, histidine, arginine, alanine, proline and tyrosine.

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา Biotechnology ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 1998 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, 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. Piamsook Pongsawasdi, Dr. Pairoh Pinphanichakarn and Dr. Kanoktip Packdibumrung for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestions.

Grant from the Graduate School supported this research.

My appreciation is also expressed to all staff members of Chulabhorn Research Institute for helping in amino acid composition analysis.

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, my sister and my brother for their unlimited love, support and understanding.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....xi

ABBREVIATION.....xiii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Equipments.....27

2.2 Chemicals.....28

2.3 Bacteria.....29

2.4 Media preparation.....29

2.5 Cultivation of bacteria.....30

2.6 Enzyme assay.....31

2.7 Protein determination.....32

2.8 Purification of CGTase.....32

2.9 Isolation of CGTase isozymes.....33

2.10 Determination and characterization of CGTase isozymes

2.10.1 Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).....35

2.10.2 Carbohydrate determination.....37

Page

2.10.3 Determination of the isoelectric point by isoelectric focusing polyacrylmide gel electrophoresis (IEF).....38

2.10.4 Effects of pH and temperature on the isozyme activities.....39

2.10.5 Analysis of cyclodextrins by HPLC.....40

2.10.6 Amino acid analysis.....40

III RESULTS

3.1 Partial purification of CGTase.....42

3.2 Isolation of CGTase isozymes.....42

3.3 Characterization of CGTase isozymes.....46

3.3.1 Carbohydrate determination.....49

3.3.2 Molecurar weight determination on SDS-PAGE.....52

3.3.3 Determination of the isoelectric point.....52

3.3.4 Effects of pH on the isozyme activities.....52

3.3.5 Effects of temperature on the isozyme activities.....57

3.3.6 Analysis of cyclodextrin by HPLC.....57

3.3.7 Amino acid composition of CGTase isozymes.....60

IV DISCUSSION.....76

V CONCLUSION.....89

REFFERENCES.....91

APPENDICES.....100

BIOGRAPHY.....115

LIST OF TABLES

Table **Page**

1. Characteristics of cyclodextrins.....4
2. Classification of cyclodextrin derivatives.....9
3. Industrial applications of cyclodextrins.....10
4. World market of cyclodextrins.....13
5. Summary of CGTase mechanisms.....13
6. Relationship between length of substrate and mechanism of CGTase.....15
7. (a) Properties of cyclodextrin glycosyltransferase.....18
   (b) CGTase-producing bacteria.....19
8. Some properties of CGTase isozymes.....24
9. Amino acid composition of CGTase isoenzymes.....25
10. Purification of CGTase from *Bacillus* sp. A11.....48
11. Carbohydrate content of CGTase isozymes by phenol-sulfuric acid method.....51
12. Effect of pH on the CD-forming activities of CGTase isozymes.....55
13. Effect of temperature on the CD-forming activities of CGTase isozymes.....58
14. Retention time of standard CDs and linear oligosaccharides on HPLC Supelco-NH_2 column.....64
15. Comparison of cyclodextrin products, linear oligosaccharides and product ratio of CGTase isozymes by HPLC method.....65

Page

16. Summarization properties of CGTase isozymes.....66

17. Amino acid composition of CGTase isozymes.....75

18. Comparative properties of CGTase isozymes

from various strains.....86

19. Amino acid composition of CGTase isozymes .

from various strains.....87

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Structure and molecular dimension of cyclodextrins.....2
2. Structure of β-cyclodextrin.....3
3. Inclusion complex formation between CDs and guest molecules 6
4. Orientation of guest molecule in CD-guest complex.....7
5. Model of CGTase mechanism from *Klebsiella pneumoniae* M5 al.....16
6. Flowchart for partial purification of CGTase 34
7. Preparative gel electrophoresis unit.....43
8. Elution profile of CGTase from preparative gel electrophoresis.....44
9. Non-denaturing PAGE pattern of every 5 fractions obtained from preparative gel electrophoresis.....45
10. Non-denaturing PAGE of the enzyme bands 1 to 5 obtained from preparative gel electrophoresis
    (a) amylolytic activity staining
    (b) CD-forming activity staining.....47
11. Non-denaturing PAGE of the enzyme bands 1 to 5 obtained from preparative gel electrophoresis
    (a) Coomassie blue staining for protein
    (b) PAS staining for glycoprotein.....50

Page

12. SDS-PAGE pattern of CGTase isozymes obtained
from preparative gel electrophoresis.....53
13. Isoelectrofocusing gel of CGTase isozymes
using ampholyte pH 3.0-7.0.....54
14. Effect of pH on the activities of CGTase isozymes.....56
15. Effect of temperature on the activities of CGTase isozymes.....59
16. HPLC chromatograms.....61
17. Chromatograms of various amino acid standards
from Amino acid analyzer.....68
18. (a-f) Chromatograms of amino acid composition of purified CGTase
and CGTase isozymes from Amino acid analyzer.....69

ABBREVIATION

A	absorbance
BSA	bovine serum albumin
CD	cyclodextrin
CGTase	cyclodextrin glycosyltransferase
cm	centimeter
^{o}C	degree Celsius
g	gram
hr	hour
l	litre
mA	milliampere
min	minute
µl	microlitre
ml	millilitre
mM	millimolar
M	molar
nm	nanometer
rpm	revolution per minute