

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของ cellulosome-like multienzyme complex ที่ผลิตจาก *Bacillus circulans* B6 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไซลเลนเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ผลการทดลองพบว่า cellulosome-like multienzyme complex ประกอบด้วยเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลสไลติกและไซลานโนไลติก เมื่อนำ cellulosome-like multienzyme complex ที่ชะจากตะกอนเซลล์ (pellet) ด้วย triethylamine (TEA) 2% แบบเป็นขั้นตอน (stepwise) มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าประกอบด้วยไซลเลนเนส 33.66 หน่วยต่อกรัมโปรตีน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 16.51 หน่วยต่อกรัมโปรตีน อะซิทิเลสเทอร์ส 8.29 หน่วยต่อกรัมโปรตีน อะราบิโนฟูราโนซิเดส 1.48 หน่วยต่อกรัมโปรตีน เบต้าไซโลซิเดส 2.29 หน่วยต่อกรัมโปรตีน เบต้ากลูโคซิเดส 1.94 หน่วยต่อกรัมโปรตีน และเซลโลไบโอไฮโดรเลส 0.29 หน่วยต่อกรัมโปรตีน จากการศึกษารูปแบบโปรตีนของ cellulosome-like multienzyme complex ที่ชะจากตะกอนเซลล์ โดยใช้สารละลาย TEA 2% ด้วยเทคนิค native-PAGE และ SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วยกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่เพียงกลุ่มเดียวที่มีขนาดประมาณ 224 กิโลดาลตัน และเมื่อนำมาตรวจสอบ zymograms พบกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยที่แสดงกิจกรรมของไซลเลนเนสอย่างน้อย 3 ชนิด ที่มีขนาด 224 216 และ 187 กิโลดาลตัน และ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างน้อย 2 ชนิด ที่มีขนาด 224 และ 201 กิโลดาลตัน

เมื่อนำโปรตีนที่ชะจากตะกอนเซลล์ด้วย TEA 2% มาหาขนาดด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยใช้ Sephacryl S-400 high resolution column พบว่าประกอบด้วยโปรตีน 2 กลุ่ม (peak I และ peak II) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,083 และ 224 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนทั้งสองกลุ่มนี้เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ zymograms พบว่า complex I ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 2 ชนิด โดยแสดงกิจกรรมของไซลานเนสอย่างน้อย 3 ชนิด และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างน้อย 1 ชนิด ส่วน SDS-PAGE ของ complex II ประกอบด้วยโปรตีนอย่างน้อย 12 ชนิด และเมื่อตรวจสอบด้วย zymograms พบว่าแสดงกิจกรรมของไซลานเนสอย่างน้อย 3 ชนิด คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสอย่างน้อย 1 ชนิด นอกจากนี้พบว่า cellulosome-like multienzyme complex ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *B. circulans* B6 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มีความเสถียร ยึดเกาะกับผนังเซลล์และไซแลนได้แข็งแรงเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน

การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการเพาะเลี้ยง *B. circulans* B6 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนด้วยเทคนิค Thin layer chromatography พบว่า cellulosome-like multienzyme complex จาก *B. circulans* B6 สามารถย่อยสลายไซแลนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลไซโลส และผลิตภัณฑ์รองเป็นไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ ที่มีความยาวตั้งแต่ 3-5 ส่วนผลิตภัณฑ์จากการย่อยเปลือกข้าวโพด ได้แก่ น้ำตาลไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นๆ ขณะที่การใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลกลูโคส ส่วนผลิตภัณฑ์รองคือ เซลโลไบโอส และเซลโลเตตระโอส แสดงว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *B. circulans* B6 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลลิติกและไซลาโนลิติกทั้ง endo- และ exo-type โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยจะได้น้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน / ผลิตภัณฑ์จากการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ / *Bacillus circulans* B6 / cellulosome-like multienzyme complex

Abstract

173525

The aim of this research is to study the properties and characteristics of cellulosome-like multienzyme complex, produced from *B. circulans* B6, which was grown in the medium containing xylan as a sole source of carbon under anaerobic condition. The results showed that cellulosome-like multienzyme complex composed of cellulolytic and xylanolytic enzymes. Cellulosome-like multienzyme complex, eluted from pellet by stepwise at 2% triethylamine contained xylanase, carboxymethylcellulase, acetylsterase, arabinofuranosidase, β -xylosidase, β -glucosidase and cellobiohydrolase with the specific activities of 33.66, 16.51, 8.29, 1.48, 2.29, 1.94 and 0.29 U/g protein, respectively. Native-PAGE and SDS-PAGE analysis indicated that the multienzyme complex contained only one group of large protein, and zymograms indicated that the large protein contained at least 3 types of xylanase and 2 types of carboxymethylcellulase.

The gel filtration chromatography on Sephacryl S-400 high resolution column, showed that the multienzyme complex consisted of two peaks, peak I and peak II with estimated molecular weight of 3,083 kDa and 224 kDa respectively. SDS-PAGE analysis indicated that the peak I contained at least 2 types of protein and peak II had 12 types of protein. Peak I showed at least 3 types of xylanase and 1 type of carboxymethylcellulase and peak II showed at least 3 types of xylanase and 1 type of

carboxymethylcellulase on zymograms. In addition, cellulosome-like multienzyme complex from *B. circulans* B6 under anaerobic conditions is more stable, and could more strongly bind to cell surface and xylan when compared to that from *B. circulans* B6 grown under aerobic condition.

The hydrolysis products in the *B. circulans* B6 cultures grown on polysaccharides under anaerobic condition were determined by thin layer chromatography. In the xylan culture, the hydrolysis product of xylan by cellulosome-like multienzyme complex from *B. circulans* B6 was found to be xylose as a main product and short chain xylooligosaccharide including 3-5 monomers. In the corn hull culture, xylose, xylobiose and short chain xylooligosaccharide were detected. In the case of filter paper Whatman No.4, the hydrolysis products were glucose, cellobiose and cellotetraose. The results indicated that when *B. circulans* B6 grown on xylan under anaerobic conditions could produce endo and exo-type of cellulolytic and xylanolytic enzymes, and end products of hydrolysis were monosaccharides.

Keywords: Anaerobic Condition / *Bacillus circulans* B6 / Cellulosome-like Multienzyme Complex / Hydrolysis Products of Polysaccharides