

Abstract

Project Code: TRG5680025

Project Title: Identification and characterization of carbohydrate-binding module from xylanolytic-cellulolytic multienzyme complexes-producing bacterium, *Paenibacillus xylaniclasticus*

Investigator: Dr.Somphit Sornyotha King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

E-mail Address: somphit.so@kmitl.ac.th, kssomphi@staff.kmitl.ac.th, somphitsorn@yahoo.com

Project Period: 2 years

A facultative anaerobic bacterium *Paenibacillus xylaniclasticus* strain TW1, isolated from an anaerobic digester fed with pineapple waste, produces an extracellular xylanolytic-cellulolytic multienzymes system when grown on corn hull under aerobic conditions. The crude enzyme was found to be capable of binding to insoluble xylan and cellulose and efficiently hydrolyzed raw agricultural residues. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of a crude enzyme preparation exhibited at least 12 proteins could be bound to cellulose. Moreover, the results from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS) found that the peptide mass fingerprints of the unknown components from SDS-PAGE were almost identical as unknown proteins. This result suggested that the other proteins possibly present as new glycoside hydrolase family. The only two bands from SDS-PAGE could be identified as the glycoside hydrolase family 31 (CBP5) and family 11 (CBP12). Although CBP5 showed similarity to published glycoside hydrolase family 31 sequences from *P. curdlanolyticus* YK9 but no information on the carbohydrate-binding module (CBM) appearing in the glycoside hydrolase family 31 from *P. curdlanolyticus* YK9 was presented. In case of CBP12, the peptide sequence of CBP12 showed similarity to *P. curdlanolyticus* B6 xylanase family 11 with a calcium-dependent-carbohydrate-binding module family 36 (CBM36). However, the only CBM36 currently was characterized, that from *P. polymyxa* ATCC 842 xylanase 43A (*Pp*CBM36). In addition, CBM36 from *P. xylaniclasticus* TW1 showed only 50% amino acid sequence identity with CBM36 of the strain ATCC 842. Thus, the CBM36 from *P. xylaniclasticus* TW1 (*Px*TW1CBM36) was still attracted and, henceforth, was produced and characterized of this CBM.

PxTW1CBM36 was cloned, expressed, purified and studied for binding characteristics. The results found that *PxTW1CBM36* displayed broad binding ability to carbohydrates which had a high affinity for xylans and insoluble cellulose. Interestingly, this is the first study that indicated that CBM36 had an affinity for insoluble cellulose. Although the ligand-binding apparatus of *PxTW1CBM36* and *PpCBM36* display similarity, the binding capacity of *PxTW1CBM36* do not perturb by the addition of the chelating agent such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). It is possible that calcium-dependency might not be the only mode of substrate binding by *PxTW1CBM36*. In addition, the binding characteristic of *PxTW1CBM36* on carbohydrates embedded within plant cell walls was also elucidated. It displayed the strong recognition for ligands located in the epidermal tissue of sweet potato roots. This result shows that the cell wall components and the polysaccharides configuration in the plant cell wall might differ between tissues. Thus, this CBM can represent valuable tools with which to probe the intricate architecture of plant cell walls, and also possible as a new tool for immobilization enzyme for targeting enzymes to surface of plant tissue.

Furthermore, in this report not only carbohydrate-binding module but carbohydrate-active enzymes in *Paenibacillus xylanoclasticus* TW1 genome were also investigated. From nucleotide sequence, the data exhibited many carbohydrate-active enzymes in *P. xylanoclasticus* TW1 genome. It contained 28 xylanolytic enzymes, 9 cellulolytic enzymes and 3 other plant cell wall-degrading enzymes. In addition, not only CBM36 but *P. xylanoclasticus* TW1 contained many CBM which different family. As many reports, the complete and rapid hydrolysis of polysaccharides in agricultural residues requires not only cellulolytic enzymes but also the cooperation of many enzymes such as xylanolytic enzymes and side chain-cleaving enzymes such as deacetylase and α -L-arabinofuranosidase. Thus, this result explained that why crude enzyme produced from *P. xylanoclasticus* TW1 displayed the capable of binding to insoluble xylan and cellulose and efficiently hydrolyzed raw agricultural residues.

Keywords: Carbohydrate-binding module family 36, MALDI-TOF/TOF MS, *Paenibacillus xylanoclasticus*, Xylanolytic-cellulolytic multienzyme complexes

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: TRG5680025

ชื่อโครงการ: การจำแนกและศึกษาคุณสมบัติของ carbohydrate-binding module จากเอนไซม์
เชิงซ้อนไซลาลโนไลติกและเซลลูโลสไลติกที่ผลิตจาก *Paenibacillus xylaniclasticus*

ชื่อนักวิจัย: ดร.สมพิศ สอนโยธา สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail Address: somphit.so@kmitl.ac.th, kssomphi@staff.kmitl.ac.th, somphitsorn@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

แบคทีเรีย *Paenibacillus xylaniclasticus* สายพันธุ์ TW1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobic bacterium) ถูกคัดแยกจากถังหมักก๊าซชีวภาพที่มีเปลือกสับปะรดเป็นวัตถุดิบ สามารถผลิตเอนไซม์เชิงซ้อนในกลุ่มไซลาลโนไลติกและเซลลูโลสไลติก (xylanolytic-cellulolytic multienzyme complexes) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยเอนไซม์เชิงซ้อนดังกล่าวสามารถยึดเกาะกับไซเลนและเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำได้ และยังสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพอีกด้วย เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์เชิงซ้อนประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อยอย่างน้อย 12 ชนิดที่สามารถยึดเกาะกับเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำได้ และเมื่อนำโปรตีนทั้ง 12 ชนิดไปตรวจสอบด้วยเทคนิค matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF-MS) เพื่อระบุชนิดของโปรตีนดังกล่าว พบว่าโปรตีนที่ยึดเกาะกับเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำได้ส่วนใหญ่ไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ เป็นไปได้ว่าโปรตีนเหล่านี้อาจจัดอยู่ใน glycoside hydrolase แฟมิลีใหม่ที่ยังไม่มีรายงานในปัจจุบัน จากการศึกษาดังกล่าวพบโปรตีนเพียง 2 ชนิดที่สามารถระบุชนิดได้ โดยโปรตีน CBP5 มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ glycoside hydrolase แฟมิลี 31 ที่ผลิตโดย *P. curdlanolyticus* YK9 แต่เอนไซม์ดังกล่าวไม่มีรายงานว่าพบ carbohydrate-binding module เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่โปรตีน CBP12 มีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์ไซลาลเนสแฟมิลี 11 ที่ผลิตโดย *P. curdlanolyticus* B6 และมี carbohydrate-binding module แฟมิลี 36 (CBM36) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษาคุณสมบัติของ CBM36 จากเอนไซม์ไซลาลเนส 43A ที่ผลิตโดย *P. polymyxa* ATCC 842 เพียงรายงานเดียว และ CBM36 จาก *P. xylaniclasticus* TW1 มีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ CBM36 ของ *P. polymyxa* ATCC 842 (PpCBM36) เพียงร้อยละ 50 ดังนั้น CBM36 จาก *P. xylaniclasticus* TW1 จึงยังคงมีความน่าสนใจและได้ถูกนำไปศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

CBM36 ของ *P. xylaniclasticus* TW1 (PxTW1CBM36) ได้ถูกโคลนและนำมาแสดงออก จากนั้นถูกทำให้บริสุทธิ์เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป จากการศึกษพบว่า PxTW1CBM36 สามารถยึดเกาะกับคาร์โบไฮเดรตได้หลายชนิด โดยสามารถยึดเกาะกับไซแลนและเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำได้ดีที่สุด ซึ่งการศึกษานี้เป็นรายงานฉบับแรกที่พบว่า CBM36 สามารถยึดเกาะกับเซลลูโลสได้ และจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า CBM36 จัดเป็น calcium-dependent-carbohydrate-binding module ซึ่งต้องอาศัยแคลเซียมในการยึดเกาะกับสับสเตรท โดยจากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่าง PxTW1CBM36 และ PpCBM36 พบว่ากรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกับสับสเตรทของ CBM36 จากทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกัน แต่จากการศึกษานี้กลับพบว่าแม้จะมีการเติม EDTA ซึ่งเป็น chelating agent ลงไป แต่ PxTW1CBM36 ยังคงสามารถยึดเกาะกับคาร์โบไฮเดรตได้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า PxTW1CBM36 นอกจากจะอาศัยแคลเซียมในการยึดเกาะกับสับสเตรทแล้ว ยังอาจมีกรดอะมิโนบริเวณอื่นที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการยึดเกาะกับสับสเตรทได้โดยไม่ต้องอาศัยแคลเซียม นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของ PxTW1CBM36 กับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรากมันเทศ พบว่า PxTW1CBM36 มีความจำเพาะในการยึดเกาะกับคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่บริเวณเนื้อเยื่อ epidermal tissue จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อพืชแต่ละบริเวณอาจมีชนิดและองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตที่แตกต่างกัน ดังนั้น CBM36 ที่ถูกศึกษาในครั้งนี้อาจสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในผนังเซลล์พืชต่าง ๆ รวมทั้งสามารถนำไปเชื่อมต่อกับเอนไซม์เพื่อให้มีเป้าหมายในการย่อยสลายที่บริเวณพื้นผิวด้านนอกของเนื้อเยื่อพืชได้

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมที่สกัดจาก *P. xylaniclasticus* TW1 พบว่าจีโนมของแบคทีเรียสายพันธุ์ TW1 มียีนที่ผลิตเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกอย่างน้อย 28 ชนิด เอนไซม์ในกลุ่มเซลลูโลไลติกอย่างน้อย 9 ชนิด และเอนไซม์อื่น ๆ ที่ย่อยสลายผนังเซลล์พืชอีกอย่างน้อย 3 ชนิด และพบว่านอกจาก CBM36 แล้ว ยังสามารถพบ CBM แฟมิลีอื่น ๆ อีกหลายแฟมิลีที่ผลิตได้โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ TW1 ซึ่งจากรายงานหลายฉบับได้กล่าวไว้ว่าการที่จุลินทรีย์จะสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ทั้งในกลุ่มเซลลูโลไลติก กลุ่มไซลาโนไลติก รวมทั้งเอนไซม์ที่ย่อยสลายกิ่งก้านต่าง ๆ อาทิเช่น เอนไซม์ deacetylase และ α -L-arabinofuranosidase เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงแสดงให้เห็นว่าเพราะเหตุใดเอนไซม์ที่ผลิตจาก *P. xylaniclasticus* TW1 จึงมีความสามารถในการยึดเกาะได้ทั้งกับไซแลนและเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ และมีความสามารถในการย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ที่ไม่ผ่านกระบวนการปรับสภาพได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก: Carbohydrate-binding module แฟมิลี 36, MALDI-TOF/TOF MS, *Paenibacillus xylaniclasticus*, เอนไซม์เชิงซ้อนในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก