

ความจำเพาะของไซลานเนสบริสุทธิ์จาก *alkaliphilic Bacillus halodurans*
สายพันธุ์ C-1 ต่อการย่อยไซแลนละลายน้ำต่างๆ

จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ¹ คิน เลย์ คู² และ กนก รัตนะกนกชัย³
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 7 มีนาคม 2546 ตอบรับเมื่อ 1 ตุลาคม 2546

บทคัดย่อ

ไซลานเนสที่ถูกผลิตออกนอกเซลล์จาก *alkaliphilic Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต DEAE-Toyopearl คอลัมน์ และ DEAE-HiPrep FF 16/10 และ Mono-Q HR 5/5 fast performance liquid chromatography และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ active-PAGE พบว่าไซลานเนสบริสุทธิ์ที่ได้มีขนาดประมาณ 47 กิโลดาลตัน การศึกษาผลของไซลานเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อยไซแลนชนิดต่างๆ ที่ละลายน้ำ พบว่าไซลานเนสย่อย soluble birchwood xylan ได้ดีกว่า soluble oat spelt และ larchwood xylans การศึกษาจลนศาสตร์ของไซลานเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อยไซแลนที่ละลายน้ำพบว่าค่า K_m ของไซลานเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อย soluble birch wood oat spelt และ larchwood xylans เท่ากับ 1.63 1.83 และ 2.76 มก./มล. ตามลำดับ ขณะที่ค่า V_{max} ของไซลานเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อย soluble birchwood oat spelt และ larchwood xylans เท่ากับ 0.175 0.150 และ 0.125 mMmin⁻¹/mg ตามลำดับ อัตราส่วนของ V_{max}/K_m ของไซลานเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อย soluble birchwood xylan เท่ากับ 1.3 และ 2.4 เท่าของ soluble oat spelt และ larchwood xylans ตามลำดับ

คำสำคัญ : *alkaliphilic Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 / ไซลานเนสบริสุทธิ์ /
คำจำเพาะของไซลานเนส / ไซแลนละลายน้ำ

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

² ผู้เชี่ยวชาญต่างประเทศ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

³ รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี

Specificity of Purified Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus halodurans* Strain C-1 on Hydrolysis of Soluble Xylans

Chakrit Tachaapaikoon¹, Khin Lay Kyu² and Khanok Ratanakhanokchai³

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Received 7 March 2003 ; accepted 1 October 2003

Abstract

An extracellular xylanase from alkaliphilic *Bacillus halodurans* strain C-1 was purified to homogeneity, as demonstrated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and active-PAGE, by means of ammonium sulfate precipitation, DEAE-Toyopearl column, and DEAE-HiPrep FF 16/10 and Mono-Q HR 5/5 fast performance liquid chromatographies. The molecular weight of the purified xylanase was estimated to be about 47 kDa. The hydrolysis rate of soluble birchwood xylan by the purified enzyme was higher than those of soluble oat spelt and larchwood xylans. The K_m value of the enzyme is 1.63, 1.83 and 2.76 mg/ml, against soluble birchwood, oat spelt and larchwood xylans, respectively, while the V_{max} value of the enzyme is 0.175, 0.150 and 0.125 mMmin⁻¹/mg, respectively. The V_{max}/K_m ratio of xylanase on soluble birchwood xylan was approximately 1.3 and 2.4 fold higher than those of soluble oat spelt and larchwood xylans, respectively.

Keywords : Alkaliphilic *Bacillus halodurans* strain C-1 / Purified xylanase /
Specificity of xylanase / Soluble xylan

¹ Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

² Expert, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

³ Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.

1. บทนำ

ไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์พืช โครงสร้างของไซแลนมีลักษณะเป็นสายโพลีเมอร์ของน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -D-1,4-linkage และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลและอนุพันธ์ของน้ำตาลชนิดอื่น [1] ในการย่อยไซแลนให้สมบูรณ์ ต้องการการทำงานร่วมกันของกลุ่ม xylanolytic enzyme เช่น endo- β -1,4-xylanase และ β -xylosidase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยโครงสร้างหลัก และ α -arabinofuranosidase และ acetyl esterase ซึ่งย่อยส่วนที่เป็นกิ่งก้านของไซแลน เป็นต้น [2] นอกจากนี้มีรายงานว่าไซแลนเนสเป็นเอนไซม์หลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายไซแลน ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดมักผลิตไซแลนเนสออกมาภายนอกเซลล์มากกว่า 1 ชนิด และไซแลนเนสแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อการย่อยไซแลนต่างกัน และทำงานร่วมกันในการย่อยไซแลน [3]

ปัจจุบันมีการนำไซแลนเนสไปใช้ทางการค้าในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ (pulp and paper) อาหาร และอาหารสัตว์ ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ ไซแลนเนสช่วยในกระบวนการฟอกสีเยื่อกระดาษคราฟต์ ลดปริมาณคลอรีนที่ใช้ในกระบวนการฟอกสีกระดาษ และช่วยลดปริมาณสาร adsorbable organic halogen ซึ่งเป็นสารพิษที่ย่อยได้ยากมากในธรรมชาติ ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างลิกนินและสารคลอรีน [4] ในอุตสาหกรรมอาหาร ไซแลนเนสช่วยเร่งการเกิด dough ในการทำขนมปัง คุกกี้ เค้ก และ แครกเกอร์ [5] และมีรายงานว่า xylooligosaccharides ที่ได้จากการย่อยไซแลนโดยไซแลนเนสถูกนำไปใช้เป็น thickeners หรือสารทดแทนไขมัน และใช้เป็น antifreeze food additive นอกจากนี้มีการนำ xylooligosaccharides ไปผสมในยาเม็ดเพื่อยืดระยะเวลาการออกฤทธิ์ของตัวยา [6] ส่วนในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ไซแลนเนสช่วยให้สัตว์ปีกและสุกรนำเศษพืชต่างๆ มาใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น ทำให้ได้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น โดยไซแลนเนสช่วยลดความหนืดในระบบย่อยอาหารของสัตว์ที่เกิดจากสารพวกเฮมิเซลลูโลส ระบบการดูดซึมอาหารจึงดีขึ้น [7]

Alkaliphilic *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ผลิตไซแลนเนสอย่างน้อย 6 ชนิด ซึ่งมีขนาดที่แตกต่างกัน [8] โดยไซแลนเนสแต่ละชนิดอาจมีความจำเพาะต่อการย่อยไซแลนต่างๆ แตกต่างกัน ดังนั้นในรายงานนี้จะทำการแยกบริสุทธิ์ไซแลนเนสที่ถูกผลิตออกนอกเซลล์จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 และศึกษาความจำเพาะของไซแลนเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อยไซแลนต่างๆ เพื่อความเข้าใจบทบาทการย่อยอย่างจำเพาะของไซแลนเนสต่อไซแลนแต่ละชนิด รวมทั้งการนำไซแลนเนสไปใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมในโอกาสต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 สารเคมี

ซบสเตรทที่ใช้ในการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside, *p*-nitrophenyl acetate, ost spelt xylan, birchwood xylan รวมทั้ง bovine serum albumin, ammonium sulfate และ sodium dodecyl sulphate สั่งจากบริษัท Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis MO) larchwood xylan จากบริษัท NBS Biologicals ส่วน DEAE-Toyopearl จากบริษัท TOSOH (Tokyo, Japan), คอลัมน์ DEAE-HiPrep FF 16/10 และ Mono-Q HR 5/5 จากบริษัท Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden) Standard markers สำหรับ SDS-PAGE และ Coomassie brilliant blue R-250 ที่ใช้ย้อมแถบโปรตีน สั่งจากบริษัท Bio-Rad (Richmond, CA)

ในส่วนของไซแลนชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองนั้น มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดย birchwood และ larchwood xylan เป็นไซแลนจากไม้เนื้อแข็ง ซึ่ง birchwood xylan ประกอบด้วย น้ำตาลไซโลสร้อยละ 94.1 กลูโคสร้อยละ 1.4 และกาแลคโตสร้อยละ 4.5 ในขณะที่ larchwood xylan มีกึ่งกำนของอนุพันธ์น้ำตาลและหมู่แทนที่ชนิดอื่นมากกว่าโดยประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสร้อยละ 47.5 กลูโคสร้อยละ 26.5 และแมนโนสร้อยละ 26.0 ส่วน oat spelt xylan ซึ่งเป็นไซแลนจากไม้เนื้ออ่อนประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสร้อยละ 52.5 กลูโคสร้อยละ 15.7 กาแลคโตสร้อยละ 9.5 และอะราบีโนสร้อยละ 22.3 [22]

2.2 การผลิตเอนไซม์ไซลานเนส

ทำการเพาะเลี้ยง alkaliphilic *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 [8] ในสูตรอาหารเหลวของ Berg และคณะ [9] ซึ่งประกอบด้วย NaNO_3 ร้อยละ 0.2, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.02, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.002, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.002 และ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ร้อยละ 0.002 ซึ่งปรับพีเอชเป็น 10.0 หลังจากที่ผ่านมาการนิ่งฆ่าเชื้อแล้วด้วยโซเดียมคาร์บอเนตร้อยละ 10 และมี oat spelt xylan ร้อยละ 0.5 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มไว้ใน incubator shaker ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่ได้คือ crude enzyme ซึ่งเก็บไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ [11]

ตรวจสอบกิจกรรมไซลานเนส โดยเติม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายไซแลนร้อยละ 1 ใน 100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีของ Miller [10] โดยใช้ไซโลสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบกิจกรรมเซลลูเลสมีขั้นตอนการวิเคราะห์และสภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมของไซลานเนส แต่ใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสแทนไซแลน และใช้กลูโคสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐานแทนไซโลส

ปริมาณ 1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ไซลานเนสหรือเซลลูเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยซับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

การตรวจวัด β -xylosidase ทำโดยผสม crude enzyme และ *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยปรับปริมาตรให้เป็น 1.1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยโซเดียมคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วตรวจวัดปริมาณของ *p*-nitrophenol ที่ถูกผลิตขึ้น โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

กิจกรรมของ β -glucosidase และ arabinofuranosidase ตรวจวัดภายใต้สภาวะเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมของ β -xylosidase แต่เปลี่ยนซับสเตรทเป็น *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside ความเข้มข้น

1 มิลลิโมลาร์ และ *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside ความเข้มข้น 0.83 มิลลิโมลาร์ สำหรับ β -glucosidase และ α -arabinofuranosidase ตามลำดับ

การตรวจวัด acetyl esterase ทำโดยผสม crude enzyme และ *p*-nitrophenyl acetate ใน Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยปรับปริมาตรให้เป็น 2.5 มิลลิลิตร ซึ่งซับสเตรทจะถูกละลายใน เมธานอลร้อยละ 50 (V/V) ก่อนนำไปใช้ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณของ *p*-nitrophenol ที่ถูกผลิตขึ้น โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ปริมาณ 1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ β -xylosidase β -glucosidase arabinofuranosidase และ acetyl esterase หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยซับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็น *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมล ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนใน crude enzyme ตรวจวัดโดยวิธีของ Lowry และคณะ [12] และใช้สารละลาย bovine serum albumin ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน ส่วนปริมาณโปรตีนที่ได้จากการชะคอลัมน์ต่างๆ ใช้วิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

2.5 การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์

ทำให้ไซลาเนสบริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่าน ion-exchange chromatography ต่างๆ ทั้ง packed column และ fast performance liquid chromatography (FPLC)

2.6 Gel electrophoresis และ active-PAGE

การตรวจสอบความบริสุทธิ์และจำนวนของโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง ใช้วิธี SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli [13] โดยต้มตัวอย่างโปรตีนใน sample buffer ซึ่งประกอบด้วย SDS ร้อยละ 2 (W/V), 2-mercaptoethanol ร้อยละ 5 (V/V), glycerol ร้อยละ 10 (V/V) และ Tris-HCl 15 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 6.8) นาน 3 นาที โดยใช้ stacking และ separating gel ที่ประกอบด้วย polyacrylamide ร้อยละ 5 และ 12 ตามลำดับ และใช้โปรตีนมาตรฐานต่างๆ (prestained low molecular weights calibration kit, control No. 89694) จากบริษัท Bio-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา ภายหลังจากที่ electrophoresis เสร็จแล้ว นำเจลไปย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

การตรวจสอบเพื่อยืนยันความบริสุทธิ์ของไซลาเนสใน SDS-PAGE ใช้วิธี active-PAGE ตามวิธีการของ Nakamura และคณะ [14] โดยใช้ polyacrylamide ร้อยละ 12 ที่ประกอบด้วย oat spelt xylan ที่ละลายน้ำร้อยละ 0.1 ภายหลังจากที่ electrophoresis เสร็จ โดยใช้สภาวะการทดลองเช่นเดียวกับ SDS-PAGE นำเจลไปล้างด้วย isopropanol ร้อยละ 25 (V/V) โดยเขย่าเบาๆ เพื่อล้าง SDS ออก และ renature โปรตีนที่ติดบนเจล

หลังจากนั้นล้างเจล 4 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 7) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเจลไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสารละลาย Congo red ร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์ จนกระทั่ง excess dye ถูกชะออกจาก active band จนหมด เมื่อเติมกรดอะซิติกร้อยละ 0.5 ลงไปจะเกิด zymogram ที่เป็นแถบใสของ active xylanase ส่วน background จะปรากฏสีม่วงน้ำเงิน

2.7 การเตรียมไซแลนที่ละลายและไม่ละลายน้ำ

การเตรียมไซแลนที่ละลายและไม่ละลายน้ำ ทำได้โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ghangas และคณะ [15] โดยผสม commercial oat spelt xylan 10 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับให้พีเอชเป็น 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำมาปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยกรดอะซิติก 1 โมลาร์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารที่ได้ในส่วนนี้คือไซแลนที่ละลายน้ำ ส่วนที่เป็นตะกอนนำมาเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยกรดอะซิติก 1 โมลาร์ แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารที่ได้ในส่วนนี้คือ ไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ

2.8 การตรวจสอบการยึดเกาะกับเซลลูโลสและไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ

การทดสอบคุณสมบัติการยึดเกาะทำตามวิธีของ Ratanakhanokchai และคณะ [11] โดยผสม crude enzyme ที่มีปริมาณโปรตีน 0.23 มิลลิกรัมต่อ avicel (เซลลูโลส) หรือไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ 50 มิลลิกรัม ใน Tris-HCl buffer 0.1 โมลาร์ พีเอช 9.0 1.0 มิลลิลิตร ใน Eppendorf tubes เก็บตัวอย่างในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 80,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปตรวจสอบกิจกรรมของไซแลเนส กิจกรรมของไซแลเนสที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ crude enzyme เป็นปริมาณไซแลเนสที่ยึดเกาะกับไซแลน

2.9 การย่อยไซแลน

ทำการบ่มไซแลนสบริสุทธิที่มีความเข้มข้น 0.042 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับไซแลนที่ละลายน้ำร้อยละ 0.5 (W/V) ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ แล้วนำมาตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ถูกผลิตขึ้นโดยวิธีของ Miller [10]

2.10 ตัวแปรจลนศาสตร์ของไซแลเนสสบริสุทธิต่อการย่อยไซแลน

การตรวจวัดตัวแปรจลนศาสตร์ของไซแลเนสต่อการย่อยไซแลนต่างๆ ทำโดยใช้ความเข้มข้นของไซแลนที่ละลายน้ำระหว่าง 0.125 ถึง 0.450 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.042 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ค่า K_m และ V_{max} คำนวณจาก Lineweaver-Burk plot

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

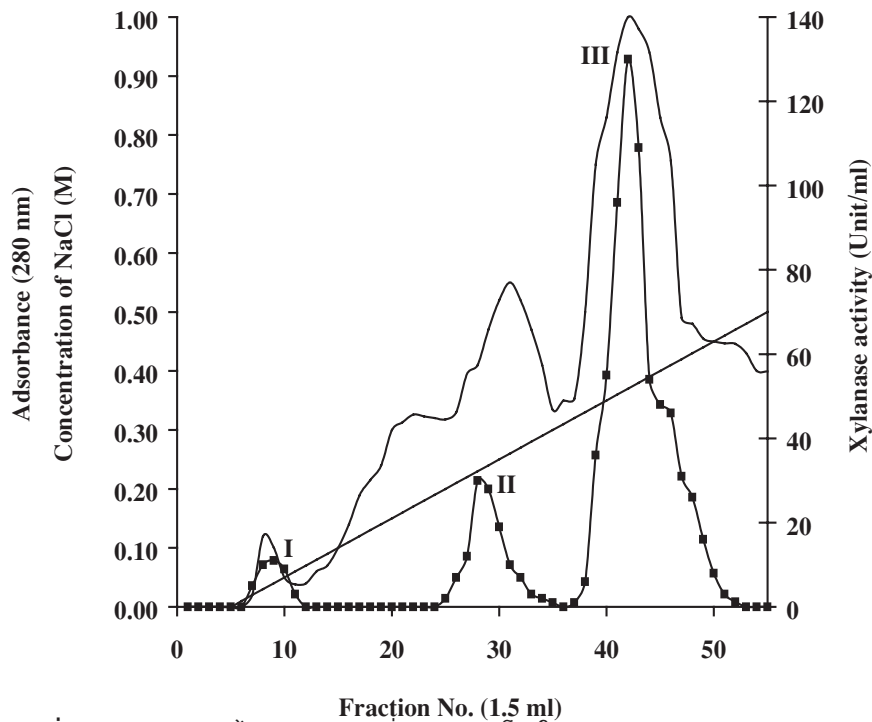
3.1 การผลิตไซลานเนส

B. halodurans C-1 ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี oat spelt xylan เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะเป็นด่าง ผลิตไซลานเนส arabinofuranosidase และ β -xylosidase ออกมาภายนอกเซลล์ได้ 4.3, 0.09 และ 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ภายในเวลา 2 วัน [8] ส่วนคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส β -glucosidase และ acetyl esterase ไม่สามารถตรวจพบ แม้ว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบถูกทำให้เข้มข้น 100 เท่า โดยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว

3.2 การทำให้ไซลานเนสบริสุทธิ์

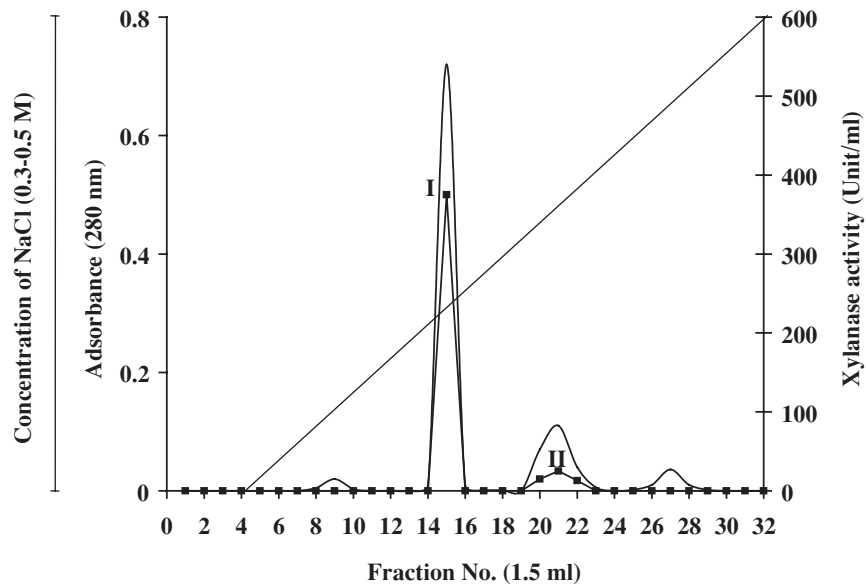
crude xylanase จาก *B. halodurans* C-1 ปริมาณ 5 ลิตรถูกทำให้เข้มข้น โดยการตกตะกอนด้วยเกลือ แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 90 ภายหลังจากปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนที่ได้ด้วย Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 แล้ว dialysis ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันหลายๆ ครั้ง เอนไซม์เข้มข้นที่ได้นำไปผ่าน DEAE-Toyopearl 650M column (2.0 x 20 cm) ที่ถูก equilibrate ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ภายหลังจากเติมเอนไซม์และล้างคอลัมน์ (washing) สามารถตรวจพบกิจกรรมของไซลานเนส ในน้ำล้าง แต่ไม่ได้มีส่วนนี้มาศึกษาต่อในรายงานนี้ เนื่องจากมีปริมาณไซลานเนสไม่มากนัก และมีปริมาณโปรตีนปนเปื้อนสูง หลังจากนั้นชะเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วย Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งปรากฏ peak ของโปรตีนและไซลานเนสเพียง peak เดียว ที่มีลักษณะค่อนข้างกว้าง fraction ต่างๆ ที่ตรวจพบกิจกรรมไซลานเนสจาก peak ที่ได้ ถูกรวบรวมและนำไปทำให้เข้มข้น โดยตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวร้อยละ 90 แล้ว dialysis ใน Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0

เอนไซม์ที่ผ่านการ dialysis แล้วถูกนำไปผ่าน DEAE-HiPrep FF 16/10 column (10.0 x 1.6 cm, FPLC system, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) ที่ equilibrate ด้วย Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ภายหลังจากล้างคอลัมน์ ชะเอนไซม์ด้วย linear gradient ของ Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0 ถึง 0.5 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งปรากฏ peak ของโปรตีนและไซลานเนส 3 peaks ดังรูปที่ 1 โดย peak I และ II มีปริมาณไซลานเนส และ specific activity น้อยกว่า peak III ดังนั้น fractions ที่ 39-49 ซึ่งปรากฏกิจกรรมไซลานเนสใน peak III ถูกรวบรวม แล้ว dialysis ด้วย Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.30 โมลาร์

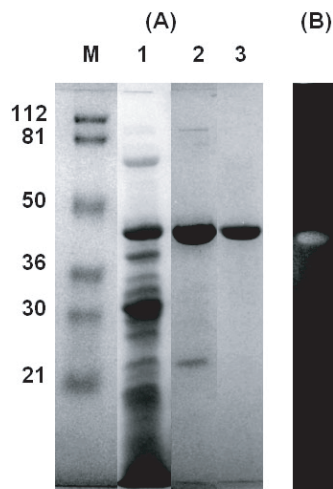


รูปที่ 1 รูปแบบการแยกไซลานเนสด้วยเครื่อง FPLC โดยใช้ DEAE-HiPrep FF 16/10 column โดย (—) แสดงปริมาณโปรตีน และ (—■—) แสดงกิจกรรมไซลานเนส

นำเอนไซม์ที่ dialysis แล้วไปผ่าน Mono-Q HR 5/5 column (5.0 x 0.5 cm, FPLC system, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) ที่ equilibrate ด้วย Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.30 โมลาร์ ภายหลังการล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เซอนไซม์ด้วย linear gradient ของ Tris-HCl buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.30 ถึง 0.50 โมลาร์ ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที รูปแบบของการแยกเอนไซม์ แสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งปรากฏ peak ของโปรตีน 4 peaks และไซลานเนส 2 peaks โดยไซลานเนส peak I มีปริมาณไซลานเนส และ specific activity มากกว่า peak II เมื่อนำไซลานเนสที่ได้จาก peak I (fraction ที่ 15) ไปตรวจสอบด้วย SDS-PAGE และ active-PAGE พบว่าเป็น ไซลานเนสบริสุทธิ์ที่มีขนาด 47 kDa ดังแสดงในรูปที่ 3A เลนที่ 3 และรูปที่ 3B ตามลำดับ ขั้นตอนต่างๆ ในการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งไซลานเนสถูกทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8 เท่า และ specific activity ของเอนไซม์บริสุทธิ์ มีค่าเท่ากับ 34.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับ crude enzyme ไซลานเนสบริสุทธิ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 8 เท่า เท่านั้น รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่หายไปร้อยละ 90.8 ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากเมื่อนำ crude enzyme มาตรวจสอบด้วย active-PAGE พบว่าประกอบด้วยไซลานเนสที่ผลิตออกมานอกเซลล์อย่างน้อย 6 ชนิดที่มีขนาดระหว่าง 20 kDa ถึง 66 kDa (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ซึ่งไซลานเนสแต่ละชนิดน่าจะทำงานร่วมกับ arabinofuranosidase และ β -xylosidase ในการย่อยไซลแลน [6] ดังนั้นเมื่อทำให้บริสุทธิ์ จึงมีผลให้กิจกรรมของไซลานเนสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นไม่มากนัก ซึ่งจากงานวิจัยของ Kang และคณะ [16] พบว่าไซลานเนส บริสุทธิ์ CX-I และ CX-II จาก alkalophilic *Cephalosporium* sp. สายพันธุ์ RYM-202 มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.3 และ 22.9 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ crude enzyme ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่หายไปร้อยละ 91.1 และ 85.0 ตามลำดับ



รูปที่ 2 รูปแบบการแยกไซลันเนสด้วยเครื่อง FPLC โดยใช้ Mono-Q HR 5/5 column โดย (—) แสดงปริมาณโปรตีน และ (—■—) แสดงกิจกรรมไซลันเนส



รูปที่ 3 SDS-PAGE (A) และ active-PAGE (B) ของไซลันเนสบริสุทธิ์จาก *B. halodurans* C-1

(A) Lane M : prestained molecular weight markers : phosphorylase B (112 kDa), bovine serum albumin (81 kDa), ovalbumin (50 kDa), carbonic anhydrase (36 kDa), soybean trypsin inhibitor (30 kDa) และ lysozyme (21 kDa)

Lane 1 : crude enzyme ที่ทำให้เข้มข้นด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ความเข้มข้นประมาณ 250 ไมโครกรัม)

Lane 2 : ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-HiPrep FF 16/10 (ความเข้มข้นประมาณ 75 ไมโครกรัม)

Lane 3 : ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Mono-Q HR 5/5 (ความเข้มข้นประมาณ 50 ไมโครกรัม)

(B) ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Mono-Q HR 5/5 (ความเข้มข้นประมาณ 15 ไมโครกรัม)

ตารางที่ 1 การทำให้ไซลานเนสจาก *B. halodulans* C-1 บริสุทธิ์

Purification step	Total Protein (mg)	Total Activity (Unit)	Specific Activity (Unit/mg)	Purification Factor	Yield (%)
Crude enzyme	1617.6	6950.0	4.3	1.0	100.0
DEAE-Toyopearl	381.0	4114.4	10.8	2.5	59.2
DEAE-HiPrep FF 16/10	71.6	1568.0	21.9	5.1	22.6
Mono-Q HR 5/5	18.7	643.3	34.4	8.0	9.2

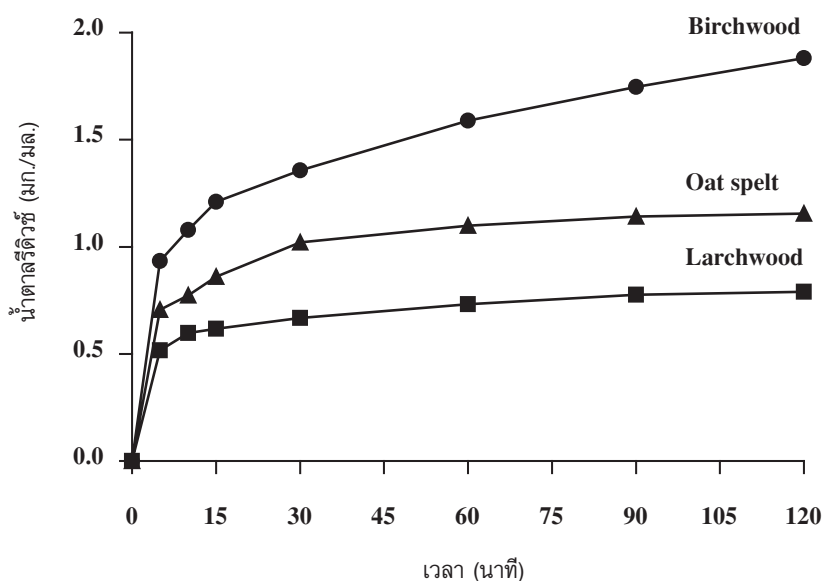
3.3 ความจำเพาะของไซลานเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อยไซแลน

มีรายงานว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ย่อยผนังเซลล์พืชจากจุลินทรีย์บางชนิดแสดงคุณสมบัติเป็น multiple functions เช่น β -xylosidase/ β -glucosidase จาก *Chaetomium trilaterale* [17] และ β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase จาก *Clostridium stercorearium* [18] และไซลานเนสจากจุลินทรีย์บางชนิดประกอบด้วย xylan-binding domain และ/หรือ cellulose-binding domain ซึ่งทำให้สามารถยึดเกาะกับไซแลนและเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ เช่น ไซลานเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 [11] สามารถยึดเกาะกับไซแลน ไซลานเนสจาก *Clostridium thermocellum* [19] *Cellulomonas fimi* [20] และ *Thermomonospora fusca* [21] สามารถยึดเกาะกับทั้งไซแลนและเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ไซลานเนส จาก *B. halodulans* C-1 แสดงคุณสมบัติเฉพาะไซแลน โดยย่อยได้เฉพาะไซแลน และไม่สามารถยึดเกาะกับไซแลนหรือเซลลูโลสที่ไม่ละลายน้ำ แม้ว่าจะได้เพิ่มความเข้มข้นของตัวอย่างเอนไซม์ถึง 100 เท่า จากตัวอย่างปกติในการตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ แล้วก็ตาม

3.4 การย่อยไซแลนที่ละลายน้ำโดยไซลานเนสบริสุทธิ์

อัตราการย่อย soluble birchwood larchwood และ oat spelt xylans โดยไซลานเนสบริสุทธิ์จาก *B. halodulans* C-1 แสดงในรูปที่ 4 ไซลานเนสสามารถย่อยไซแลนที่ละลายน้ำทั้ง 3 ชนิด โดยย่อย soluble birchwood xylan ได้ดีกว่า soluble oat spelt และ larchwood xylans ตามลำดับ ไซแลนมีโครงสร้างหลักเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลไซโลส [1] และจากการศึกษาองค์ประกอบของไซแลนที่ละลายน้ำโดย Li และคณะ [22] พบว่า soluble birchwood xylan ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสร้อยละ 94.1 กลูโคสร้อยละ 1.4 และกาแลคโตสร้อยละ 4.5 ขณะที่ soluble oat spelt xylan ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสร้อยละ 52.5 กลูโคสร้อยละ 15.7 กาแลคโตสร้อยละ 9.5 และอะราบีโนสร้อยละ 22.3 ส่วน soluble larchwood xylan ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสร้อยละ 47.5 กลูโคสร้อยละ 26.5 และแมนโนสร้อยละ 26.0 ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าไซลานเนสบริสุทธิ์จาก *B. halodulans* C-1 ชอบที่จะย่อยไซแลนที่มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลส และมีกิ่งก้านน้อย โดยย่อย soluble birchwood xylan (ไซโลส ร้อยละ 94.1) ได้ดีกว่า soluble oat spelt xylan (ไซโลสร้อยละ 52.5) และ soluble larchwood xylan (ไซโลส ร้อยละ 47.5) ตามลำดับ และจากผลการทดลองในรูปที่ 4 พบว่าอัตราการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์จากไซแลนที่ละลายน้ำทั้ง 3 ชนิด เพิ่มขึ้นเร็วมากใน 5 นาทีแรก หลังจากนั้นอัตราการปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง และภายหลังนาทีที่ 10

น้ำตาลรีดิวซ์ถูกปลดปล่อยเพิ่มขึ้นจาก soluble larchwood xylan น้อยมาก ขณะที่ soluble oat spelt xylan น้ำตาลรีดิวซ์ถูกปลดปล่อยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากที่ 30 ส่วน soluble birchwood xylan น้ำตาลรีดิวซ์ยังคงถูกปลดปล่อยเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาการทดสอบ (120 นาที) แสดงว่าน้ำตาลชนิดอื่นในส่วนกึ่งก้าน น่าจะมีผลขัดขวางการทำงานของไซลาเนส จาก *B. halodurans* C-1 ซึ่ง Vries และคณะ [23] รายงานว่าไซลาเนส จาก *Aspergillus* ย่อยไซแลนได้เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า หากเติม arabinofuranosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยส่วนกึ่งก้านที่เป็นน้ำตาลอะราบินอสออกจากไซแลนลงไปร่วมด้วย



รูปที่ 4 การย่อยไซแลนที่ละลายน้ำต่างๆ ด้วยไซลาเนสบริสุทธิ์จาก *B. halodurans* C-1

3.5 ตัวแปรจลนศาสตร์ของไซลาเนสต่อการย่อยไซแลน

ตารางที่ 2 แสดงค่าจลนศาสตร์ของไซลาเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อย soluble birchwood oat spelt และ larchwood xylans พบว่า ค่า K_m ของไซลาเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อย soluble birchwood oat spelt และ larchwood xylans เท่ากับ 1.63 1.83 และ 2.76 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่ค่า V_{max} ของไซลาเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อย soluble birchwood larchwood และ oat spelt xylans เท่ากับ 0.175 0.150 และ 0.125 $mMmin^{-1}/mg$ ตามลำดับ อัตราส่วนของ V_{max}/K_m ของไซลาเนสบริสุทธิ์ต่อการย่อย soluble birchwood xylan เท่ากับ 1.3 และ 2.4 เท่าของ soluble oat spelt และ larchwood xylans ตามลำดับ แสดงว่าไซลาเนสบริสุทธิ์จาก *B. halodurans* C-1 มีความจำเพาะต่อการจับและเร่งปฏิกิริยาต่อไซแลนที่มีกึ่งก้านน้อย มากกว่าไซแลนที่มีกึ่งก้านมาก ซึ่งค่า K_m และ V_{max} ของไซลาเนสบริสุทธิ์จาก *B. halodurans* C-1 ต่อไซแลนต่างๆ มีค่าอยู่ในช่วงเดียวกับค่า K_m และ V_{max} จาก *Bacillus* spp. อื่นๆ ซึ่งมีค่า K_m ระหว่าง 1.58-17.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ V_{max} ระหว่าง 0.017-288 $\mu Mmin^{-1}/mg$ ตามลำดับ [24]

ตารางที่ 2 ตัวแปรจลนศาสตร์ของไซลานเนสบริสุทธิ์จาก *B. halodurans* C-1 ต่อการย่อยไซแลนต่างๆ

Soluble xylan	K_m (mg/ml)	V_{max} (mMmin ⁻¹ /mg)	V_{max}/K_m (mMmin ⁻¹ /mg)/(mg/ml)
Birchwood	1.63	0.175	0.107
Oat spelt	1.83	0.150	0.82
Larchwood	2.76	0.125	0.45

4. สรุปผลการวิจัย

ไซลานเนสขนาด 47 kDa จาก *B. halodurans* สายพันธุ์ C-1 ถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต DEAE-Toyopearl คอลัมน์ และ DEAE-HiPrep FF 16/10 และ Mono-Q HR 5/5 fast performance liquid chromatographys และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE และ active-PAGE ไซลานเนสบริสุทธิ์ที่ได้สามารถย่อยไซแลนที่ละลายน้ำต่างๆ ได้ดี โดยมีความจำเพาะต่อการจับและเร่งปฏิกิริยาต่อ soluble birchwood xylan ซึ่งมีกึ่งกำนน้อย มากกว่า soluble oat spelt และ larchwood xylans ที่มีกึ่งกำนมากกว่า

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ภายใต้โครงการแลกเปลี่ยนระหว่างไทยและญี่ปุ่น (NRCT-JSPS) ที่ให้ทุนวิจัยสนับสนุนงานวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

1. Bachmann, S.L. and McCarthy, A.J., 1991, "Purification and Cooperative Activity of Enzymes Constitution the Xylan-Degrading System of *Thermomonospora fusca*," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, pp. 2121-2130.
2. Kelett, L.E., Poole, D.M., Ferreira, L.M.A., Durrant, A.J., Hazlewood, G.P., and Gilbert, H.J., 1990, "Xylanase B and an Arabinofuranosidase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Cellulosa* Contain Identical Cellulose-Binding Domains and are Encoded by Adjacent Genes," *Biochemical Journal*, Vol. 272, pp. 369-376.
3. Wang, K.K.Y., Tan, L.U.L., and Saddler, J.N., 1988, "Multiplicity of β -1,4-Xylanase in Micro organisms: Function and Applications," *Microbiology Reviews*, Vol. 52, pp. 305-317.

4. Sunna, A. and Antranikien, G., 1997, "Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacterial," *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 17, pp. 39-67.
5. Godfrey, T. and West, S., 1992, *The Application of Enzyme in Industry. In: Industrial Enzymology*, New York, MacMillan.
6. Wong, K.K.Y. and Saddler, J.N., 1992, *Trichoderma xylanases: Their Properties and Applications. In: Xylans and Xylanases (Visser, J., Beldman, G., Someren, M.A.K. and Voragen, A.G.J., Eds.)*, Elsevier, Amsterdam, pp. 171-186.
7. Gerand, A.W., Ronar, F.P., and Denis, R.H., 1993, "Enzyme in the Animal-Feed Industry," *Trends in Biotechnology*, Vol. 11, pp. 424-430.
8. Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K. L., 2003, "Cellulase-free Xylanase from Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* Strain C-1 for Hydrolysis of Agricultural Residues and Kraft Pulps," *KMUTT Research and Development Journal*, Vol. 26, pp. 201-217. (In Thai)
9. Berg, B., Hofstan, B.V., and Petterson, B., 1972, "Growth and Cellulose Formation by *Cellulivibrio folvus*," *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 35, pp. 201-214.
10. Miller, G.L., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Analytical Chemistry*, Vol. 31, pp. 426-428.
11. Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., and Tanticharoen, M., 1999, "Purification and Properties of a Xylan-Binding Endoxylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 65, pp. 690-697.
12. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 93, pp. 265-275.
13. Laemmli, U.K., 1970, "Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685.
14. Nakamura, S., Wakabayashi, K., Nakai, R., Aono, R., and Horikoshi, K., 1993, "Purification and Some Properties of an Alkaline Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain 41 M-1," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, pp. 2311-2316.
15. Ghangas, G.S., Hu, Y.J., and Wilson, D.B., 1989, "Cloning of a *Thermomonospora fusca* Xylanase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans*," *Journal of Bacterio-*

logy, Vol. 171, pp. 2963-2969.

16. Kang, M.K., Maeng, P.J., and Rhee, Y.H., 1996, "Purification and Characterization of Two Xylanases from Alkalophilic *Cephalosporium* sp. Strain RYM-202," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, pp. 3480-3482.

17. Uziie, M., Matsuo, M., and Yasui, T., 1985, "Possible Identity of β -Xylosidase and β -Glucosidase of *Chaetomium trilaterale*," *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 49, pp. 1167-1173.

18. Sakka, K., Yoshikawa, K., Kojima, Y., Karita, S., Ohmiya, K., and Shimada, K., 1993, "Nucleotide Sequence of the *Clostridium stercoarium xylA* Gene Encoding a Bifunctional Protein with β -D-xylosidase and α -L-arabinofuranosidase Activities, and Properties of the Translated Product," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 57, pp. 268-272.

19. Fernandes, A.C., Fontes, C.M., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Fernandes, T.H., and Ferreira, L.M., 1999, "Homologous Xylanase from *Clostridium thermocellum* : Evidence for Bi-functional Activity, Synergism between Xylanase Catalytic Modules and the Presence of Xylan-Binding Domains in Enzyme Complexes," *Biochemical Journal*, Vol. 342, pp. 105-110.

20. Black, G.W., Hazlewood, G.P., Millward-Sadler, S.J., Laurie, J.I., and Gillbert, H.J., 1995, "A Modular Xylanase Containing a Novel Non-Catalytic Xylan-Specific Binding Domain," *Biochemical Journal*, Vol. 307, pp. 191-195.

21. Irwin, D., Jung, E.D., and Wilson, D.B., 1994, "Characterization and Sequence of a *Thermomonospora fusca* Xylanase," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, pp. 763-770.

22. Li, K., Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J.S., and Eriksson, K.E.L., 2000, "Relationships between Activities of Xylanases and Xylan Structures," *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 27 pp. 89-94.

23. Vries, de R.P., Kester, H.C.M., Poulsen, C.H., Benen, J.A.E., and Visser, J., 2000, "Synergy between Enzymes from *Aspergillus* Involved in the Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides," *Carbohydrate Research*, Vol. 327 pp. 401-410.

24. Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., and Hoondal, G.S., 2001, "Microbial Xylanases and Their Industrial Applications: a Review," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 56, pp. 326-338.