เอนไซม์แมนนาเนสและไซลาเนสจาก alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 และสมบัติในการยึดเกาะกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ

จิรนาถ บุญคง [1]
มหาวิทยาลัยสยาม ถนนเพชรเกษม ภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10163
คิน เลย์ คู [2] **และ กนก รัตนะกนกชัย** [3]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

รับเมื่อ 14 กันยายน 2547 ตอบรับเมื่อ 25 กุมภาพันธ์ 2548

บทคัดย่อ

แบคทีเรีย alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสและไซลาเนสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกาแลคโตแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะเป็นด่าง จากการใช้เทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ active-PAGE ตรวจสอบ crude enzyme พบว่า *B. firmus* K-1 ผลิตโปรตีนหลัก 5 ชนิดที่มีขนาด 45 42 37 29 และ 23 กิโลดาลตัน และผลิตไซลาเนส 3 ชนิดที่มีขนาด 66 45 และ 23 กิโลดาลตัน และแมนนาเนส 3 ชนิดที่มีขนาด 66 42 และ 23 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของ crude enzyme จาก *B. firmus* K-1 กับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ พบว่า crude enzyme ยึดเกาะกับไซแลนได้ดี ยึดเกาะกับเซลลูโลสได้น้อย แต่ไม่สามารถยึดเกาะกับแมนแนน โดยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 42 และ 23 กิโลดาลตันสามารถยึดเกาะกับไซแลน ซึ่งโปรตีนที่มีขนาด 42 กิโลดาลตันเป็นแมนนาเนส ขณะที่โปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตันตรวจพบทั้งไซลาเนสและแมนนาเนส นอกจากนั้นพบว่าโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลนที่มีขนาด 66 กิโลดาลตันเป็นทั้งแมนนาเนสและไซลาเนส

คำสำคัญ : alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 / แมนนาเนส / ไซลาเนส / แมนนาเนสที่ยึดเกาะกับไซแลน / ไซลาเนสที่ยึดเกาะกับไซแลน

---

[1] *อาจารย์ โปรแกรมเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ (อดีตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มจธ.)*
[2] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*
[3] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Mannanases and Xylanases from Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 and Their Binding Properties on Insoluble Polysaccharides

Jiranart Boonkong [1]

Siam University, Petchkasem Rd., Phasi-Charoen, Bangkok 10163

Khin Lay Kyu [2], **and Khanok Ratanakhanokchai** [3]

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

Received 14 September 2004 ; accepted 25 February 2005

Abstract

Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 produces not only mannanase but also xylanase when grown in an alkaline galactomannan medium. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and active-PAGE showed that the crude enzyme of *B. firmus* K-1 had 5 major protein bands at the molecular weight of 45, 42, 37, 29 and 23 kDa and contained 3 active bands of xylanases with molecular masses of 66, 45 and 23 kDa and 3 active bands of mannanases with molecular masses of 66, 42 and 23 kDa. The binding of crude enzyme from *B. firmus* K-1 on insoluble polysaccharides was conducted. It was found that crude enzyme could not bind on mannan and partially bind on cellulose. However, the enzyme was found to bind readily on xylan. The xylan-binding proteins were found to be 42 and 23 kDa. The 42 kDa protein was mannanase and the 23 kDa protein showed mannanase and xylanase activities, whereas the 66 kDa unbound protein had activities of mannanase and xylanase.

Keywords : Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 / Mannanase / Xylanase / Xylan-binding Mannanase / Xylan-binding Xylanase

[1] *Lecturer, Food Technology Program, Faculty of Science (Former Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, KMUTT)*

[2] *Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

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

1. บทนำ

เฮมิเซลลูโลสเป็น heteropolysaccharides ที่พบในธรรมชาติ โดยเกาะอยู่กับเซลลูโลสและลิกนินในผนังเซลล์พืช องค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสนอกจากไซแลนแล้วยังประกอบด้วยแมนแนน [1] ดังนั้นการย่อยเฮมิเซลลูโลสให้สมบูรณ์จึงต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ไซลาเนสและแมนนาเนส [2] ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยผนังเซลล์พืชได้ดีโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพใดๆ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีส่วนประกอบที่สามารถยึดเกาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ (non-catalytic polysaccharide-binding regions) [3] ดังนั้นส่วนประกอบที่สามารถยึดเกาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำจึงมีบทบาทที่สำคัญต่อการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืช กลไกในการยึดเกาะระหว่างเอนไซม์และพอลิแซ็กคาไรด์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าส่วนประกอบที่สามารถยึดเกาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำทำหน้าที่ในการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ นอกจากนี้มีรายงานว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยผนังเซลล์ของพืชซึ่งเป็นสารพอลิเมอร์ มักผลิตเอนไซม์ชนิดหนึ่งออกมาภายนอกเซลล์มากกว่า 1 isoform และแต่ละ isoform มักมีความจำเพาะต่อการย่อยสับสเตรทต่างกัน และทำงานร่วมกันในการย่อยสลายสับสเตรท [4]

จากการศึกษาของกลุ่มวิจัยพบว่า alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 ผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสที่ปราศจากเซลลูเลส เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีสารประกอบแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะเป็นด่าง และสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสในเยื่อกระดาษต่างๆ ได้ดี [5] ดังนั้นจึงสนใจที่จะศึกษารูปแบบการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสจาก *B. firmus* K-1 ที่สามารถย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งการยึดเกาะระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทนอกจากจะทำให้ประสิทธิภาพการย่อยสารพอลิแซ็กคาไรด์ดีขึ้นแล้ว ยังสามารถช่วยให้เอนไซม์บริสุทธิ์ได้ด้วย [6] ข้อมูลจากงานวิจัยนี้จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำให้แมนนาเนสและไซลาเนสจาก *B. firmus* K-1 บริสุทธิ์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 แหล่งของจุลินทรีย์

B. firmus K-1 แยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานกระดาษบางปะอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่มีฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ [6]

2.2 การผลิตเอนไซม์

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ Berg's mineral medium [7] ที่มีสูตรดังนี้ คือ $NaNO_3$ 0.2 กรัม K_2HP0_4 0.05 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 กรัม $MnSO_4.H_2O$ 0.002 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.002 กรัม และ $FeSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยมีกาแลคโตแมนแนน (โลคัสบีนกัม) (Sigma) 0.5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที รอให้เย็น ปรับพีเอชเป็น 10.5 โดยการเติม Na_2CO_3 ความเข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) จากนั้นถ่ายเชื้อ *B. firmus* K-1 (ร้อยละ 2, v/v) แล้วนำไปเขย่าในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 ชั่วโมง หลัง

จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ (supernatant) เก็บไว้เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และศึกษาการยึดเกาะ

2.3 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ทำการตรวจวัดกิจกรรมของแมนนาเนสโดยเติม crude enzyme 0.1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายกาแลคโตแมนแนน (Sigma) 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ใน 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Somogyi [8] และใช้ D-mannose (Merck, analytical grade) เป็นสารมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบกิจกรรมไซลาเนสและเซลลูเลสมีขั้นตอนการวิเคราะห์และสภาวะการทดสอบเช่นเดียวกับการตรวจสอบกิจกรรมของแมนนาเนส แต่ใช้ oat spelt xylan (Sigma) และ carboxymethyl cellulose (Sigma) เป็นสับสเตรท แทนกาแลคโตแมนแนน และใช้ D-xylose (Merck, analytical grade) และ D-glucose (Merck, analytical grade) ตามลำดับ เป็นสารมาตรฐานแทน D-mannose

หนึ่งหน่วย (U) ของเอนไซม์แมนนาเนส ไซลาเนส และเซลลูเลส หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรท โดยให้ผลิตภัณฑ์คิดเทียบเท่าเป็นน้ำตาลแมนโนส ไซโลส และกลูโคส ตามลำดับ 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างตามวิธีของ Lowry และคณะ [9] และใช้สารละลาย bovine serum albumin (Sigma, analytical grade) เป็นสารมาตรฐาน

2.5 การเตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายและไม่ละลายน้ำ

เตรียมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายและไม่ละลายน้ำ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ghangas และคณะ [10] โดยผสมพอลิแซ็กคาไรด์ทางการค้า 10 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ปรับให้พีเอชเป็น 10 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลาร์ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำมาปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยกรดอะซิติก 1 โมลาร์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารที่ได้ในส่วนนี้คือพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำ ส่วนที่เป็นตะกอนนำมาเติมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ด้วยกรดอะซิติก 1 โมลาร์ แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง จากนั้นนำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สารที่ได้ในส่วนนี้คือพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ

2.6 Gel electrophoresis และ active-PAGE

ตรวจสอบขนาดและจำนวนของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างด้วยวิธี SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli [11] 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 (w/v) และร้อยละ 10 (w/v) ตามลำดับ

และใช้โปรตีนมาตรฐาน (prestained low molecular weights calibration kit, control no. 89694) จากบริษัท Bio-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา ภายหลังจากที่ electrophoresis เสร็จแล้ว นำเจลไปย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250

หากิจกรรมเอนไซม์ใน PAGE (active-PAGE) ตามวิธีการของ Nakamura และคณะ [12] โดยใช้ polyacrylamide ร้อยละ 10 (w/v) ที่เติม oat spelt xylan หรือกาแลคโตแมนแนนที่ละลายน้ำร้อยละ 0.1 (w/v) ลงในแผ่นเจล และดำเนินการทดลองไปพร้อมกับ SDS-PAGE 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 ^{o}ซ นำเจลไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ^{o}ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสารละลาย Congo red ร้อยละ 0.1 (w/v) ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 มิลลิโมลาร์จนกระทั่งสีถูกชะออกหมด เมื่อเติมกรดอะซิติกร้อยละ 0.5 (v/v) ลงไป บริเวณที่มีกิจกรรมไซลาเนสหรือแมนนาเนสจะปรากฏเป็นแถบใส ขณะที่บริเวณอื่นมีสีม่วงน้ำเงิน

2.7 การตรวจสอบการยึดเกาะของ crude enzyme กับพอลิแซ็กคาไรด์

ทดสอบสมบัติการยึดเกาะของโปรตีนใน crude enzyme กับพอลิแซ็กคาไรด์ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Ratanakhanokchai และคณะ [6] โดยผสม crude enzyme ที่มีปริมาณโปรตีน 0.23 มิลลิกรัมต่อพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ กาแลคโตแมนแนน avicel (เซลลูโลส) หรือไซแลน 50 มิลลิกรัม ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.0 1.0 มิลลิลิตร ใน Eppendorf tubes เก็บตัวอย่างในอ่างน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปตรวจสอบโปรตีน ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนเริ่มต้นใน crude enzyme เป็นปริมาณโปรตีนที่ยึดเกาะกับพอลิแซ็กคาไรด์

ภายหลังการยึดเกาะและล้างด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดิมหลายๆ ครั้ง จนไม่สามารถตรวจพบโปรตีนและเอนไซม์ ชะโปรตีนที่ยึดเกาะกับพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย triethylamine (TEA) 1% (v/v) หลายๆ ครั้ง ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร และนำแต่ละส่วนไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ และขนาดของโปรตีนและเอนไซม์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อเพาะเลี้ยง *B. firmus* K-1 ใน Berg's mineral salt medium ที่มีกาแลคโตแมนแนน 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 60 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีกิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และแมนนาเนสเท่ากับ 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมเซลลูเลส แม้ว่าจะทำให้ตัวอย่างเอนไซม์เข้มข้นขึ้นแล้วก็ตาม

3.1 ความสามารถในการยึดเกาะของแมนนาเนสและไซลาเนสกับพอลิแซ็กคาไรด์

ปัจจุบันพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืชได้ดีโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพใดๆ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีส่วน

ประกอบที่สามารถยึดเกาะกับเซลลูโลส หรือไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ (cellulose- หรือ xylan-binding regions) [3] ดังนั้นส่วนประกอบที่สามารถยึดเกาะกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำจึงมีบทบาทที่สำคัญต่อการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืช ผลการทดสอบการยึดเกาะระหว่าง crude enzyme ที่ผลิตจาก *B. firmus* K-1 ที่ทำให้เข้มข้นขึ้น (โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 90) กับพอลิแซ็กคาไรด์ ได้แก่ ไซแลน แมนแนน และเซลลูโลส พบว่า crude enzyme ที่ *Bacillus firmus* K-1 ผลิตขึ้นสามารถยึดเกาะกับไซแลนได้มากกว่าเซลลูโลส แต่ไม่ยึดเกาะกับแมนแนน (ตารางที่ 1) การที่สามารถตรวจพบสมบัติการยึดเกาะของ crude enzyme กับไซแลนมากกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น น่าจะมีสาเหตุจาก *B. firmus* K-1 คัดแยกได้จากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตเยื่อกระดาษที่มีฟางข้าวเป็นวัตถุดิบ ซึ่งมีปริมาณไซแลนในน้ำเสียสูงมาก (องค์ประกอบของกระดาษส่วนใหญ่เป็นเซลลูโลส ส่วนเฮมิเซลลูโลสและลิกนินถูกกำจัดออก และถูกปล่อยทิ้งในน้ำเสียเพื่อรอการบำบัด) แต่มีปริมาณเซลลูโลสและแมนแนนต่ำ ดังนั้น *B. firmus* K-1 จึงผลิต crude enzyme ที่สามารถยึดเกาะกับไซแลนมากกว่าพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น สำหรับสาเหตุที่ crude enzyme สามารถยึดเกาะกับเซลลูโลสทั้งที่ไม่สามารถผลิตเซลลูเลสนั้นน่าจะมีสาเหตุจากเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชทุกชนิดมีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4-glycosidic linkage แบบเป็นเส้นตรงเหมือนกัน ไม่เปลี่ยนแปลงตามชนิดของพืช เพียงแต่มีขนาดสั้นยาวไม่เท่ากัน ขณะที่โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสที่มีไซแลนและแมนแนนเป็นองค์ประกอบหลักมีโครงสร้างเปลี่ยนแปลงตามประเภทของพืช ดังนั้นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์พืชจึงยึดเกาะกับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช เพื่อให้มีโอกาสได้ใกล้ชิดกับสับสเตรท (เฮมิเซลลูโลส) [13] ซึ่งเกี่ยวพันกันอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช [3] เช่นไซลาเนส I และ II และ acetyl xylan esterase จาก *Streptomyces thermoviolaceus* ยึดเกาะได้ดีกับเซลลูโลส [14] ปัจจุบันมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่สายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีสมบัติที่สามารถยึดเกาะกับไซแลน เช่น ไซลาเนสจาก *Bacillus* sp. [6] *Cellulomonas fimi* [15] *Streptomyces thermoviolaceus* [14] และ *Thermomonospora fusca* [16] และมีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่มีสมบัติยึดเกาะกับแมนแนนน้อยมาก เช่น แมนนาเนสจาก *Cellulomonas fimi* [17] และ *Cellvibrio japonicus* [18] เป็นต้น

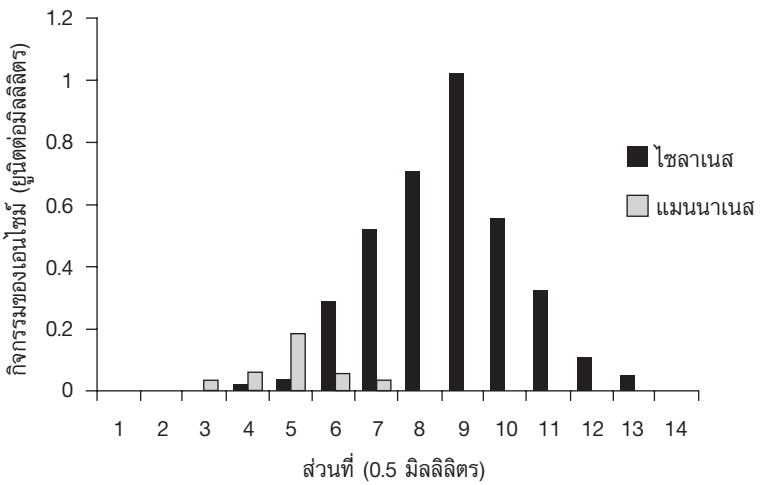
ตารางที่ 1 การยึดเกาะระหว่างโปรตีนใน crude enzyme กับพอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์	ปริมาณโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	การยึดเกาะ (ร้อยละ)
แมนแนน	0.230	0
เซลลูโลส	0.218	5
ไซแลน	0.126	45

3.2 รูปแบบของไซลาเนสและแมนนาเนสที่ผลิตจาก *B. firmus* K-1 เมื่อใช้กาแลคโตแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำ crude enzyme จาก *B. firmus* K-1 มาบ่มร่วมกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิ 4 °ซ พีเอช 5 นาน 30 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว และแยกส่วนของโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลนออก แล้วล้างโปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5 (ใช้พีเอช 5 เนื่องจากทำให้โปรตีนยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำได้ดี และเอนไซม์ไม่สูญเสียสภาพ) จนกระทั่งน้ำล้างสุดท้ายตรวจไม่พบโปรตีนและกิจกรรมของแมนนาเนสและไซลาเนส หลังจากนั้นชะโปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนออกด้วยสารละลาย TEA ร้อยละ

1 ครั้งละ 0.5 มิลลิลิตร และเมื่อนำโปรตีนที่ยึดเกาะในแต่ละส่วนที่ชะได้มาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าในส่วนที่ 3 ตรวจพบเฉพาะแมนนาเนส ส่วนที่ 4-7 ตรวจพบทั้งแมนนาเนสและไซลาเนส ขณะที่ส่วนที่ 8-13 ตรวจพบเฉพาะไซลาเนส โดยตรวจพบกิจกรรมแมนนาเนสสูงสุดในส่วนที่ 5 เท่ากับ 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไซลาเนสสูงสุดในส่วนที่ 9 เท่ากับ 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 1) ขั้นตอนการตรวจสอบกิจกรรมของแมนนาเนสและไซลาเนสก่อนและหลังการยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ แสดงดังตารางที่ 2



รูปที่ 1 กิจกรรมของไซลาเนสและแมนนาเนสจากส่วนต่างๆ หลังการชะโปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนออกด้วย TEA 1%

ตารางที่ 2 กิจกรรมของไซลาเนสและแมนนาเนสที่ตรวจพบจากตัวอย่างก่อนและหลังการยึดเกาะกับไซแลน

ขั้นตอน	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	
	แมนนาเนส	ไซลาเนส
Crude enzyme	0.93	3.48
โปรตีนที่ไม่ยึดเกาะ	0.30	1.29
น้ำล้างสุดท้าย*	-	-
โปรตีนที่ยึดเกาะ	0.19**	1.02***

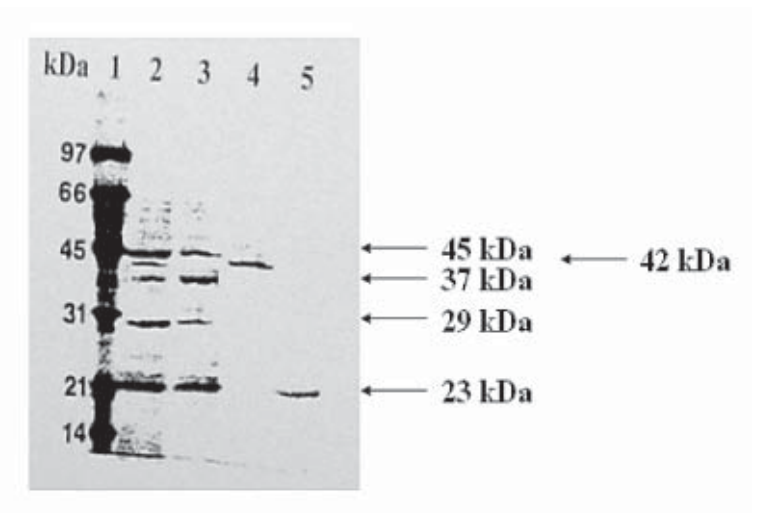
* ใช้ตัวอย่างจากการล้างโปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนปริมาตรสุดท้าย

\- หมายถึงไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของแมนนาเนสและไซลาเนสภายใต้สภาวะทดสอบ

** ตัวอย่างที่ใช้คำนวณเลือกจากส่วนที่ 5 ในรูปที่ 1 ซึ่งให้กิจกรรมแมนนาเนสสูงสุด

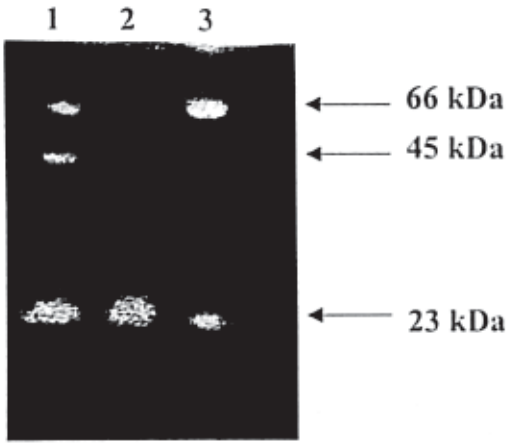
*** ตัวอย่างที่ใช้คำนวณเลือกจากส่วนที่ 9 ในรูปที่ 1 ซึ่งให้กิจกรรมไซลาเนสสูงสุด

เมื่อนำโปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนจากส่วนที่มีเพียงกิจกรรมของแมนนาเนส (ส่วนที่ 3 จากรูปที่ 1) และไซลาเนส (เลือกส่วนที่ 9 ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดจากรูปที่ 1) มาตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาขนาดโมเลกุล เปรียบเทียบกับ crude enzyme และโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลน โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ active-PAGE ควบคู่กัน ซึ่งขนาดของเอนไซม์ใน active-PAGE คำนวณได้จากการนำไปเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานใน SDS-PAGE ที่ทำการทดลองไปพร้อมกัน ซึ่งสับสเตรทที่ใช้ใน active-PAGE เป็นชนิดที่ละลายน้ำที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจึงไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโปรตีน [19] โดย xylan activity-PAGE ใช้เพื่อศึกษาไซลาเนส และ mannan activity-PAGE ใช้ศึกษาแมนนาเนส ผลของ SDS-PAGE แสดงดังรูปที่ 2 และ xylan และ mannan activities-PAGE แสดงดังรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ



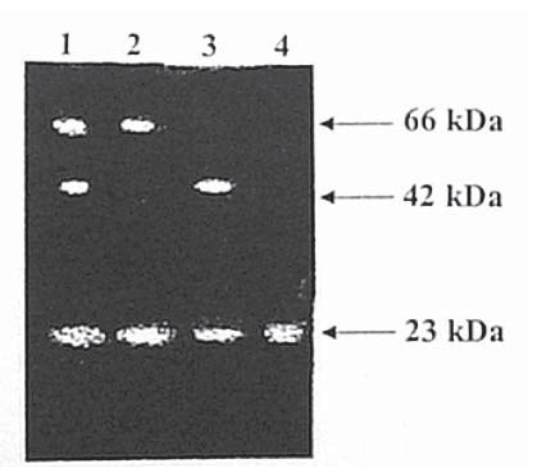
รูปที่ 2 การตรวจสอบชนิดและขนาดของโปรตีนที่ผลิตจาก *B. firmus* K-1 เมื่อใช้กาแลคโตแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

แถวที่ 1 : โปรตีนมาตรฐาน
แถวที่ 2 : crude enzyme (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 40 ไมโครกรัม)
แถวที่ 3 : โปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 40 ไมโครกรัม)
แถวที่ 4 : โปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครกรัม) ที่ชะด้วย TEA 1% จากส่วนที่ 3 ในรูปที่ 1
แถวที่ 5 : โปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครกรัม) ที่ชะด้วย TEA 1% จากส่วนที่ 9 ในรูปที่ 1



รูปที่ 3 การตรวจหาชนิดของไซลาเนสโดยเทคนิค xylan activity-PAGE

แถวที่ 1 : crude enzyme (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 20 ไมโครกรัม)
แถวที่ 2 : โปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครกรัม) จากส่วนที่ 9 ในรูปที่ 1
แถวที่ 3 : โปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครกรัม)



รูปที่ 4 การตรวจหาชนิดของแมนนาเนส โดยเทคนิค mannan activity-PAGE

แถวที่ 1 : crude enzyme (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 20 ไมโครกรัม)
แถวที่ 2 : โปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครกรัม)
แถวที่ 3 : โปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครกรัม) จากส่วน 3 ในรูปที่ 1
แถวที่ 4 : โปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลน (โปรตีนที่ใช้ประมาณ 10 ไมโครกรัม) จากส่วนที่ 9 ในรูปที่ 1

จาก SDS-PAGE พบว่าใน crude enzyme มีแถบโปรตีนหลักที่มีขนาดโมเลกุล 45 42 37 29 และ 23 กิโลดาลตัน (รูปที่ 2 แถวที่ 2) ใน xylan activity-PAGE พบไซลาเนส 3 แถบใน crude enzyme ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 66 45 และ 23 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3 แถวที่ 1) และจาก mannan activity-PAGE มีแถบแมนนาเนส 3 แถบใน crude enzyme ที่มีขนาด 66 42 และ 23 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4 แถวที่ 1) ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่าโปรตีนที่มีขนาด 66 กิโลดาลตัน ซึ่งไม่พบใน SDS-PAGE และไม่สามารถยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ปรากฏแถบใสทั้งใน xylan activity-PAGE (รูปที่ 3 แถวที่ 3) และ mannan activity-PAGE (รูปที่ 4 แถวที่ 2) แสดงว่าแม้ว่าโปรตีนขนาด 66 kDa มีปริมาณโปรตีนต่ำ ซึ่งไม่สามารถถูกตรวจพบโดยการย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 ซึ่งจะต้องมีโปรตีนในเนื้อเจลมากกว่า 0.5 ไมโครกรัมต่อตารางเซ็นติเมตร [20] แต่เอนไซม์นี้มีกิจกรรมมาก ส่วนโปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนที่ได้จากการชะด้วย TEA 1% ในส่วนที่ 3 จากรูปที่ 1 พบโปรตีน 1 แถบใน SDS-PAGE ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 42 กิโลดาลตัน (รูปที่ 2 แถวที่ 4) แต่ใน mannan activity-PAGE กลับปรากฏกิจกรรมแมนนาเนสที่ตำแหน่ง 42 และ 23 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4 แถวที่ 3) แสดงว่าในส่วนที่ 3 จากรูปที่ 1 มีแมนนาเนสขนาด 23 กิโลดาลตันปนอยู่ ซึ่งแม้ว่าจะมีปริมาณโปรตีนต่ำ จนตรวจไม่พบด้วย SDS-PAGE แต่มีกิจกรรมที่ตรวจวัดได้ และโปรตีนที่ยึดเกาะที่ได้จากการชะด้วย TEA 1% ในส่วนที่ 9 พบโปรตีน 1 แถบที่มีขนาด 23 กิโลดาลตันใน SDS-PAGE (รูปที่ 2 แถวที่ 5) และปรากฏไซลาเนส 1 แถบ (รูปที่ 3 แถวที่ 2) และแมนนาเนส 1 แถบ (รูปที่ 4 แถวที่ 4) ณ ตำแหน่งเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตัน มีสมบัติเป็น bifunctional enzyme ที่สามารถย่อยสับสเตรทได้ทั้งไซแลนและแมนแนน หรือใน crude enzyme ประกอบด้วยแมนนาเนสและไซลาเนสที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (23 กิโลดาลตัน) ซึ่งจะต้องทำการพิสูจน์ต่อไปว่าโปรตีนนี้บริสุทธิ์หรือไม่ เช่น การตรวจสอบด้วยวิธี isoelectric focusing ว่ามีประจุเหมือนกันหรือไม่ เป็นต้น ขณะที่โปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลนเมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบโปรตีนคล้ายกับใน crude enzyme แต่โปรตีนที่มีขนาด 42 กิโลดาลตันหายไป (รูปที่ 2 แถวที่ 3) แสดงว่าโปรตีนขนาด 42 กิโลดาลตันยึดเกาะกับไซแลนได้ดี ส่วนโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลนตรวจพบไซลาเนสขนาด 66 และ 23 กิโลดาลตัน ใน xylan activity-PAGE (รูปที่ 3 แถวที่ 3) และแมนนาเนสขนาด 66 และ 23 กิโลดาลตันใน mannan activity-PAGE (รูปที่ 4 แถวที่ 2) ดังนั้นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 66 และ 23 กิโลดาลตันอาจจะมีคุณสมบัติเป็น bifunctional enzyme ของไซลาเนสและแมนนาเนส แต่ไม่มีสมบัติในการยึดเกาะกับไซแลน อย่างไรก็ตามโปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตันที่พบในโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะอาจจะเป็นโปรตีนชนิดเดียวกันกับที่ยึดเกาะกับไซแลน แต่บางส่วนหลุดออกมา หรือเป็นคนละชนิดกับที่ยึดเกาะกับไซแลน แต่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน ในรูปที่ 3 ไซลาเนสขนาด 45 กิโลดาลตันพบใน crude enzyme แต่ไม่ปรากฏทั้งในส่วนที่ยึดเกาะและไม่ยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเอนไซม์นี้น่าจะหายไปในระหว่างการล้าง ก่อนที่จะชะโปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำออก

B. firmus K-1 ที่เพาะเลี้ยงในกาแลคโตแมนแนนผลิตโปรตีนที่มีสมบัติยึดเกาะกับไซแลน 2 ชนิด โดยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 42 กิโลดาลตันเป็นแมนนาเนส และโปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตันแสดงสมบัติของไซลาเนสและแมนนาเนส ส่วนโปรตีนที่มีขนาด 66 กิโลดาลตันที่ไม่ยึดเกาะกับไซแลนอาจเป็นโปรตีนที่มีสมบัติ bifunctional activities ของไซลาเนสและแมนนาเนส ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีโปรตีนบางชนิดที่แสดงสมบัติเป็น bifunctional activities เช่น Kimura และคณะ (1995) [21] พบว่า *Aspergillus sojae* ผลิต β-glucosidase ที่มีสมบัติ bifunctional activity โดยพบกิจกรรมของ β-xylosidase นอกเหนือจากกิจกรรมของ β-glucosidase โดยเมื่อ crude extract ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephaecryl S-200 HR และ Q-Sepharose HP column หลัง

จากนั้นตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบโปรตีนบริสุทธิ์ขนาดโมเลกุล 118 กิโลดาลตันที่มีสองกิจกรรม และจากรายงานของ Flint และคณะในปี 1993 [22] พบว่ายีน *xyn*A จาก *Ruminococcus flavefaciens* 17 แปลรหัสให้ bifunctional enzyme โดยมีด้าน N-terminal (domain A) เกี่ยวข้องกับไซลาเนส family G (XYLD) และด้าน C-terminal (domain C) เกี่ยวข้องกับ β(1,3-1,4) glucanase และจากการศึกษาลำดับกรดอะมิโน พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 802 residues โดยมี catalytic domain 2 ส่วน ซึ่งการเป็น bifunctional organization ของ XYLD ทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไซแลนและกลูแคน (เซลลูโลส) ในผนังเซลล์พืชได้ นอกจากนี้ Mitsutomi และคณะ [23] พบว่า *Bacillus circulans* WL-12 ผลิตโปรตีนบริสุทธิ์ที่มีกิจกรรมของ chitosanase และ β(1,3-1,4) glucanase เป็นต้น

ไซลาเนสที่มีขนาด 23 กิโลดาลตัน นอกจากอาจจะมีสมบัติเป็น bifunctional enzyme ซึ่งมีกิจกรรมของแมนนาเนสและไซลาเนสแล้ว ยังพบว่ามีสมบัติในการยึดเกาะกับไซแลนที่ไม่ละลายน้ำด้วย ซึ่งผลการทดลองคล้ายกับรายงานของ Fernandes และคณะ (1999) [24] ซึ่งทำการโคลนยีน *xyN* จาก *Clostridium thermocellum* สายพันธุ์ YS และอนุพันธ์ของยีน *xyN* ต่างๆ เมื่อนำไปแสดงออกใน *Escherichia coli* พบว่าสามารถผลิตโปรตีนที่มีสมบัติ bifunctional activities รวมถึงสมบัติการยึดเกาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำในโปรตีนเดียว โดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *xyN* มีกิจกรรมของไซลาเนสและ deacetylase และสามารถยึดเกาะกับไซแลน ซึ่งแต่ละหน้าที่ช่วยส่งเสริมการทำงานร่วมกันต่อการย่อยสลายไซแลนซึ่งเป็นโครงสร้างพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างหลักเป็นไซแลนและโครงสร้างกิ่งเป็น acetyl group ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

4. สรุปผลการวิจัย

เมื่อเพาะเลี้ยง *B. firmus* K-1 ในอาหารที่มีกาแลคโตแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่านอกจากไซลาเนสแล้ว *B. firmus* K-1 ยังผลิตแมนาเนสด้วย การศึกษาสมบัติการยึดเกาะของ crude enzyme กับแมนแนน ไซแลน และเซลลูโลส พบว่าสามารถยึดเกาะกับไซแลนได้ดีกว่าเซลลูโลสมาก ขณะที่ไม่สามารถยึดเกาะกับแมนแนน เมื่อตรวจสอบ crude enzyme ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ xylan และ mannan activities-PAGE พบว่าโปรตีนขนาด 66 45 และ 23 กิโลดาลตันมีกิจกรรมไซลาเนส และขนาด 66 42 และ 23 กิโลดาลตันเป็นแมนนาเนส โปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนซึ่งมีขนาด 42 กิโลดาลตัน ตรวจพบกิจกรรมของแมนนาเนส ขณะที่โปรตีนที่ยึดเกาะกับไซแลนขนาด 23 กิโลดาลตันตรวจพบกิจกรรมของทั้งไซลาเนสและแมนนาเนส ส่วนโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะไซแลนที่มีขนาดโมเลกุล 66 กิโลดาลตัน พบทั้งกิจกรรมของไซลาเนสและแมนนาเนส

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน หมวดเงินอุดหนุนการวิจัย ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

6. เอกสารอ้างอิง

1. Arisan-Atac, I., Hodits, R., Kristufek, D., and Kubicek, C. P., 1993, "Purification and Characterization of a β–Mananase of *Trichoderma reesei* C-30," *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 39, pp. 58-62.

2. Clark, T. A., McDonald, A. G., Senier, D. J., and Mayers, P. R., 1990, "Mannanase and Xylanase Treatment of Softwood Chemical Pulps: Effects on Pulp Properties and Bleachability," In: Kirk, T. K., and Chang, H. M. (eds.), *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture*. Butterworth-Heineman. Toronto, pp. 153-167.

3. Tomme, P., Werren, R. A. J., and Gilkes, N. R., 1995, "Cellulose Hydrolysis by Bacteria and Fungi," *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 37, pp. 1-81.

4. Wong, K. K. Y., Tan, L. U. L., and Saddler, J. N., 1988, "Multiplicity of β-1,4-Xylanase in Microorganisms: Functions and Applications," *Microbiology Reviews*, Vol. 52, pp. 305-317.

5. Boonkong, J., Ratanarojmongkol, T., Kyu, K. L., and Ratanakhanokchai, K., 2005, "Properties of Mannanase and Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus firmus* K-1 and Their Hydrolysis on Kraft Pulps," *KMUTT Research and Development Journal*, in press.

6. 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.

7. Berg, B., Hofstan, B. V., and Petterson, B., 1972, "Growth and Cellulase Formation by *Celluvibrio fulvus*," *Journal of Applied Bacteriology,* Vol. 35, pp. 201-214.

8. Somogyi, M., 1952, "Notes in Sugar Determination," *Journal of Biological Chemistry,* Vol. 195, pp. 19-23.

9. 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. 193, pp. 265-275.

10. 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 Bacteriology*, Vol. 171, pp. 2963-2969.

11. Laemmli, U. K., 1970, "Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4," *Nature*, Vol. 227, pp. 680-685.

12. 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.

13. Ohmiya, K., Sakka, K., Karita, S., and Kimura, T., 1997, "Structure of Cellulases and Their Applications," *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, Vol. 14, pp. 365-414.

14. Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Ilo, T., Yamazaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M., and Inamori, Y. 1997. Cloning and Sequence Analysis of Genes Encoding Xylanases and Acetyl Xylan Esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520," *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 63, pp. 661-664.

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

16. 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.

17. Stoll, D., Boraston, A., Stålbrand, H., McLean, B. W., Kilburn, D. G., and Warren., R. A. J. 2000, "Mannanase Man26A from *Cellulomonas fimi* has a Mannan-Binding Module," *FEMS Microbiology Letters*, Vol. 183, pp. 265-269.

18. Hogg, D., Pell, G., Dupree, P., Goubet, F., Martin-Orue, S. M., Armand, S., and Gilbert, H. J., 2003, "The Modular Architecture of *Cellvibrio japonicus* Mannanases in Glycoside Hydrolase Families 5 and 26 Points to Differences in Their Role in Mannan Degradation," *Biochemical Journal*, Vol. 371, pp. 1027–1043.

19. Moya, T. F. M., Newbold, C. J., Wallace, R. J., and Moyano, F. J., 2002, "Effects of High-Molecular-Mass Substrates on Protein Migration during Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis," *Electrophoresis*, Vol. 23, pp. 1-7

20. Harris, E. L. V., 1989, "Initial Planning," In: Harris, E. L. V., and Angal, S. (eds.), *Protein Purification Methods: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp. 1-66.

21. Kimura, I., Sasahara, H., and Tajima, S., 1995, "Purification and Characterization of Two Xylanases an Arabinofuranosidase from *Aspergillus sojae,*" *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 80, pp. 334-339.

22. Flint, H. J., Martin, J., Mcpherson, C. A., Daniel, A. S., and Zhang, J. X., 1993, "A Bifunctional Enzyme, with Separate Xylanase β(1,3-1,4)-Glucanase Domain, Encoded by the *xynD* Gene of *Ruminococcus flavefaciens,*" *Journal of Bacteriology*, Vol. 175, pp. 2943-2951.

23. Mitsutomi, M. M., Isono, M., Uchiyama, A. Nikaidou, N., Ikegami, T., and Watanabe, T., 1998, "Chitosanase Activity of the Enzyme Previously Reported as β(1,3-1,4)-Glucanase from *Bacillus circulans* WL-12," *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 62, pp. 2107-2114.

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