



**UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA**

**PENKLOANAN DAN PENGEKSPRESAN GEN XILANASE  
TERMOSTABIL DARIPADA *Bacillus coagulans* ST-6  
KE DALAM *Escherichia coli* HB101**

**NORWATI ADNAN**

**FSAS 1996 11**

**PENGLONAN DAN PENGEKSPRESAN GEN XILANASE  
TERMOSTABIL DARIPADA *Bacillus coagulans* ST-6  
KE DALAM *Escherichia coli* HB101**

**NORWATI ADNAN**

**MASTER SAINS  
UNIVERSITI PERTANIAN MALAYSIA**

**1996**



**PENGLONAN DAN PENGEKSPRESAN GEN XILANASE TERMOSTABIL  
DARIPADA *Bacillus coagulans* ST-6 ke dalam *Escherichia coli* HB101**

**Oleh**

**NORWATI ADNAN**

**Tesis dikemukakan untuk memenuhi keperluan Ijazah Master Sains  
Daripada Fakulti Sains dan Pengajian Alam Sekitar  
Universiti Pertanian Malaysia  
Mei 1996**



## **PENGHARGAAN**

Dengan nama Allah yang Maha Pemurah lagi Maha Penyayang. Selawat dan salam ke atas junjungan Rasulullah s.a.w. Alhamdulillah dengan keizinanNya dapat saya menyiapkan tesis ini.

Jutaan terima kasih saya ucapkan kepada Prof. Madya Dr. Abdullah Sipat, selaku Pengerusi Jawatankuasa Penyeliaan, Prof. Madya Dr. Khatijah Yussof dan Prof. Madya Dr Mohd Ariff Syed selaku ahli jawatankuasa penyelia di atas segala tunjuk ajar, teguran dan nasihat yang diberikan sepanjang saya menyiapkan projek. Ribuan terima kasih juga diucapkan kepada rakan-rakan Makmal 115 dan 202 (Yeoh No Na, Encik Mokhtar, Norhaizan, Geok Yong, Hisamudin dan lain-lain) di atas segala kerjasama yang telah diberikan.

Akhir sekali buat ahli keluarga yang dikasihi lagi disayangi terutamanya emak (Hatijah Hj. Omar), bapa (Adnan Ariffin), makcik (Ramlah Hj. Omar) dan pakcik (Hussin Hj. Ahmad) dengan berkat doa dan nasihat kalian dapat juga kejayaan ini dicapai. Hanya Tuhan saja yang dapat membalas segala kebaikan pihak yang terlibat sepanjang saya menyudahkan projek ini.

**Semoga Allah Memberi keredhaan dan kerahmatanNya kepada kita semua.**

**Wassalam**



## SENARAI KANDUNGAN

	<b>Muka Surat</b>
PENGHARGAAN .....	ii
SENARAI JADUAL .....	iv
SENARAI GRAF .....	vii
SENARAI GAMBAR .....	viii
SENARAI SINGKATAN .....	ix
ABSTRAK .....	xi
ABSTRACT .....	xii
<b>BAB</b>	
<b>I    Pengenalan .....</b>	<b>1</b>
<b>II    Sorotan Literatur</b>	
Xilan .....	4
Enzim xilanase .....	7
Pengklonan gen xilanase .....	12
<b>III   Bahan dan Kaedah</b>	
Bahan kimia dan biokimia .....	15
Sumber dan pertumbuhan bakteria .....	16
Penyediaan DNA genomik untuk pengklonan .....	16
Pemotongan DNA dengan enzim pembatas .....	18
Penyediaan vektor pengklonan .....	18
Penyediaan perpustakaan DNA .....	19



## Muka surat

Proses ligasi .....	19
Proses transformasi ke dalam <i>E. coli</i> HB101 .....	19
Penyaringan transforman yang mengandungi gen xilanase ..	20
Penganalisan DNA plasmid .....	21
Perlabelan DNA selitan sebagai prob .....	22
Penyediaan prob DNA .....	22
Pemblotan Southern .....	23
Elektroforesis gel agaros .....	24
Elektroelusi di dalam tiub dialisis .....	25
Penyediaan enzim xilanase kasar .....	26
Pengasaan aktiviti xilanase .....	26
Penentuan kandungan protein .....	27
Penentuan lokasi untuk aktiviti xilanase .....	28
Kesan pH ke atas aktiviti enzim xilanase .....	28
Kesan suhu ke atas aktiviti enzim kasar .....	29
Kesan suhu ke atas kestabilan enzim kasar .....	29
Pengsubklonan gen xilanase .....	30
<b>IV KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN</b>	
Pertumbuhan mikroorganisma .....	31
Pengekstrakan dan pemotongan DNA genomik .....	31
Pengklonan gen xilanase .....	34



## Muka surat

Pengekstrakan plasmid rekombinan dan tindakan enzim pembatas ke atasnya .....	39
Pemblotan Southern .....	44
Pemetaan plasmid pBNX .....	47
Penentuan lokasi selular untuk aktiviti xilanase dalam <i>E. coli</i> (pBNX) .....	54
Kajian ciri-ciri enzim xilanase terklon .....	56
pH optimum bagi enzim kasar .....	56
Kesan suhu ke atas aktiviti dan kestabilan enzim xilanase ..	58
Pengsubklonan gen xilanase .....	63
V KESIMPULAN .....	73
BIBLIOGRAFI .....	75
LAMPIRAN .....	83
VITA .....	93
SENARAI TERBITAN .....	94

## SENARAI JADUAL

Jadual		Muka surat
1	Ciri-ciri fraksi bagi penulenan separa bagi enzim xilanase daripada <i>B. coagulans</i> ST-6 (Jaafar et al., 1990).....	12
2	Pengklonan gen xilanase daripada mikroorganisma ke dalam <i>E.coli</i> .....	14
3	Saiz fragmen DNA plasmid pBNX apabila ditindakbalaskan dengan beberapa enzim pembatas.....	52
4	Taburan intrasel aktiviti spesifik xilanase <i>E. coli</i> (pBNX) .....	55
5	Perbezaan ciri-ciri enzim xilanase di antara klon <i>E. coli</i> (pBNX) dengan jenis liar ( <i>B. coagulans</i> ST-6) .....	76





## SENARAI RAJAH

<b>Rajah</b>	<b>Muka surat</b>
1 Prinsip penambahan residu pada rantai sisi tulang belakang xilan (Joseleau et al., 1992) .....	6
2 Tindakan enzim-enzim xilanolitik ke atas fragmen heteroxilan tumbuhan .....	9
3 Peta plasmid pBNX .....	53
4 Profil pH optimum bagi enzim xilanase kasar yang dihasilkan oleh <i>E. coli</i> (pBNX) dan <i>B. coagulans</i> ST-6 .....	59
5 Profil suhu optimum bagi xilanase kasar yang dihasilkan oleh <i>E. coli</i> (pBNX) dan <i>B. coagulans</i> ST-6.....	61
6 Profil kestabilan enzim xilanase kasar yang dihasilkan oleh <i>E. coli</i> (pBNX) dan <i>B. coagulans</i> ST-6 pada suhu yang berlainan .....	62
7 Peta plasmid pBNX1 .....	70
8 Peta plasmid pBNX2 .....	71
9 Penanda Lambda (DNA Lambda/ <i>Hind</i> III) .....	91

## SENARAI GAMBAR

Gambar	Muka surat
1 Koloni <i>Bacillus coagulans</i> ST-6 di atas agar Yis-Trypton RBB+xilan .....	32
2 Elektroforesis DNA genomik sebelum dan selepas melalui turus Chroma-Spin -1000 .....	32
3 Tindakbalas enzim pembatas ke atas DNA genomik dalam masa yang berlainan .....	35
4 Koloni transforman yang berzon cerah di sekelilingnya (anak panah) di atas piring agar RBB+xilan .....	37
5 Semua koloni transforman berzon cerah di atas agar RBB+xilan (saringan berikutnya) .....	38
6 Pengekstrakan plasmid rekombinan .....	41
7 Plasmid rekombinan ditindakbalaskan dengan enzim pembatas...	42
8 Pemotongan plasmid pBNX oleh enzim <i>Bam</i> H1 .....	43
9 Penghibridan dengan prob DNA selitan .....	46
10 Pemotongan plasmid pBNX oleh enzim pembatas .....	48
11 Pemotongan plasmid pBNX oleh enzim pembatas .....	49
12 Pemotongan plasmid pBNX oleh enzim pembatas .....	50
13 Koloni subklon pertama (berzon cerah) .....	65
14 Tindakbalas enzim pembatas ke atas plasmid pBNX1 .....	66
15 Koloni subklon kedua (berzon cerah) .....	67
16 Tindakbalas enzim pembatas ke atas plasmid pBNX2 .....	68
17 Pemotongan plasmid pBNX1 & pBNX2 oleh enzim <i>Sal</i> 1 .....	69

## SENARAI SINGKATAN

DNA	`deoxyribonucleic acid`
RNA	`ribonucleic acid`
EDTA	`ethylenediamine tetra acetic acid`
SDS	`sodium dodecyl sulfate`
RBB	`remazol brilliant blue`
ATP	adenosin trifosfat
CIAP	`calf intestinal alkaline phosphatase`
DIG	`digoxigenin`
NaCl	natrium klorida
LiCl	litium klorida
CaCl <sub>2</sub>	kalsium klorida
NaOH	natrium hidroksida
NaAc	natrium asetat
ZnCl <sub>2</sub>	zink klorida
SSC	`saline sodium citrate`
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	disodium hidrogen fosfat
EtOH	etanol
YT	yis tripton
kb	kilobes
kDa	kilodalton
ml	mililiter

ul	mikroliter
M	molar
mM	milimolar
mg	miligram
ug	mikrogram
ng	nanogram
nm	nanometer
U	unit untuk aktiviti enzim
mU	miliunit untuk aktiviti enzim
ppm	pusingan per minit
°C	darjah Celsius

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Pertanian Malaysia untuk memenuhi keperluan Ijazah Master Sains.

**PENGLONAN DAN PENGEKSPRESAN GEN XILANASE TERMOSTABIL  
DARIPADA *Bacillus coagulans* ST-6 KE DALAM *Escherichia coli* HB101**

Oleh

**NORWATI ADNAN**

Mei 1996

Pengerusi : Profesor Madya Dr. Abdullah Sipat

Fakulti : Sains dan Pengajian Alam Sekitar

*Bacillus coagulans* ST-6 merupakan bakteria termofilik yang berupaya mengekspreskan aktiviti xilanase termostabil. Gen xilanase tersebut telah berjaya diklonkan dengan menyelitkan serpihan DNA daripada genom *B. coagulans* ST-6 yang telah dipotong oleh enzim *Bam* H1 ke dalam tapak *Bam* H1 yang terdapat di dalam vektor pBR322. Seterusnya plasmid rekombinan tersebut ditransformasikan ke dalam *Escherichia coli* HB101 dan koloni yang mengandungi gen xilanase dipilih dengan menggunakan agar media bercampur substrat RBB-xilan. Daripada 3,270 transforman yang terpilih, hanya dua koloni didapati mengekspreskan aktiviti xilanase iaitu dengan kewujudan zon cerah di sekelilingnya. Penyaringan seterusnya mendapati hanya satu koloni sahaja yang stabil untuk kajian selanjutnya. Plasmid rekombinan tersebut dinamakan sebagai pBNX. Pemotongan plasmid pBNX dengan enzim *Bam* H1 mendapati DNA selitan tersebut bersaiz 2.56 kb. Kajian selanjutnya menunjukkan ia mengandungi tapak pemotongan bagi enzim *Hind* III, *Sal* I dan *Eco* RV tetapi tiada



tapak bagi enzim *Eco* R1, *Pst* 1, *Kpn* 1 dan *Sac* 1. Keputusan daripada penghibridan dengan prob DNA selitan melalui kaedah pemblotan Southern telah mengesahkan DNA selitan bagi plasmid rekombinan (pBNX) tersebut berasal daripada *B. coagulans* ST-6. Enzim xilanase kasar yang dihasilkan oleh klon tersebut menunjukkan ciri-ciri yang sama dengan enzim xilanase kasar daripada *B. coagulans* ST-6, di mana suhu dan pH optimumnya adalah 50°C dan 7.2. Enzim xilanase daripada *E. coli* (pBNX) dan *B. coagulans* ST-6 juga stabil pada suhu 60°C. Pengsubklonan DNA selitan dalam plasmid pBNX ke dalam pUC19 dan pUC18 juga telah dilakukan dan kedua-duanya mengekspreskan aktiviti xilanase. Plasmid kedua-duanya dikenali sebagai pBNX1 dan pBNX2. Tindakbalas dengan enzim pembatas *Sal* 1 menunjukkan cara kemasukan DNA selitan dalam kedua-dua subklon mempunyai orientasi yang sama.

Abstract of thesis submitted to the Senate of Universiti Pertanian Malaysia in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science.

**MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF THERMOSTABLE  
XYLANASE GENE FROM *Bacillus coagulans* ST-6 into *Escherichia coli*  
HB101.**

By

**NORWATI ADNAN**

May 1996

Chairman : Assoc. Prof. Dr. Abdullah Sipat

Faculty : Science and Environmental Studies

*Bacillus coagulans* ST-6 is a thermophilic bacterium producing a thermostable xylanase. The gene for this enzyme was cloned by inserting the *Bam* H1 generated fragments of the genomic DNA from *B. coagulans* ST-6 into the *Bam* H1 site of the vector pBR322. The recombinant plasmids were transformed into *Escherichia coli* HB101 and xylanase clones were selected using RBB+xylan media. Of the 3,270 transformants obtained, two produced a clearing zone, indicating the expression of the xylanase activity. Only one of these was found to be stable upon further screening to obtain a pure culture. The recombinant plasmid is named pBNX. Digestion by *Bam* H1 on the recombinant plasmid showed the presence of an insert of 2.56 kb in size. Restriction mapping of this plasmid revealed the presence of *Sal* 1, *Eco* RV and *Hind*



111 sites, but there were no sites for *Eco* R1, *Pst* 1, *Kpn*1 and *Sac* 1. Southern blot analysis using the insert DNA as the probe confirmed that the insert was from *B. coagulans* ST-6. The crude xylanase enzyme produced by the *E. coli* (pBNX) was shown to have properties similar to the crude xylanase from *B. coagulans* ST-6; having an optimum temperature and pH of 50°C and 7.2 respectively. The xylanase enzyme from *E. coli* (pBNX) and *B. coagulans* ST-6 were also stable up to the temperature of 60°C. Sub-cloning of the insert DNA in pBNX into pUC19 and pUC18 was also accomplished, and both subclones could express xylanase activity. The plasmids of these subclones were named pBNX1 and pBNX2. Digestion by *Sal* 1 showed that both recombinant plasmids from the subclones have the same orientation for the insert DNA.





## BAB 1

### PENGENALAN

Kebanyakan industri pertanian menghasilkan sisa buangan yang mana sebahagian besar darinya terdiri daripada polimer xilan. Xilan merupakan komponen utama dalam hemiselulosa (Bernard, 1992) yang terdapat pada dinding sel tumbuhan (Timell, 1964) dan ia wujud dalam bentuk polimer D-xilosa yang mempunyai ikatan  $\beta$ -xilosidik (Panbangred et al., 1983). Penukaran xilan kepada gula ringkas oleh tindakan bakteria merupakan satu proses yang sangat berfaedah dan penting dari segi penggunaan semula sisa-sisa pertanian.

Penghidrolisisan berenzim bagi komponen xilan dilakukan oleh endo 1,4- $\beta$ -xilanase yang akan menghasilkan xilobios dan oligosakarida xilosa. Gula ini akan didegradasikan oleh  $\beta$ -xilosidase kepada xilosa (Biely, 1985). Xilosa merupakan sumber karbon bagi mikrob (Han, 1983) dan juga substrat bagi proses fermentasi. Ia boleh ditukarkan kepada xilulosa atau xilitol secara enzimatik atau kepada etanol secara fermentasi (Wang et al., 1980; Jeffries, 1981).



Mikroorganisma merupakan penghasil enzim xilanase, antaranya ialah kulat (Gorbacheva dan Radionova, 1977), yis (Biely et al., 1980) dan bakteria (Matte dan Forsberg, 1992). Famili *Bacillaceae* didapati menunjukkan keunggulannya dalam penghasilan enzim xilanase (Uchino dan Nakane, 1981 ; Esteban et al., 1982). Bakteria yang menghasilkan enzim xilanase wujud sama ada dari jenis mesofilik atau pun termofilik. Bagi bakteria termofilik ianya akan menghasilkan enzim xilanase termostabil. Dalam industri fermentasi dan kebanyakan proses bioteknologi, penggunaan mikroorganisma termofilik mempunyai beberapa kelebihan seperti produktiviti yang tinggi dan risiko kontaminasi yang rendah (Rossi et al., 1989).

*Bacillus coagulans* ST-6 merupakan salah satu bakteria termofilik yang berkeupayaan tinggi dalam penghasilan enzim xilanase (Sipat et al., 1995). Ia boleh hidup sehingga ke suhu 60°C, jenis Gram positif, motil, sel berbentuk rod, aerobik dan membentuk spora (kebanyakannya di hujung sel) serta menghasilkan enzim katalase (Sharifah, 1990).

Kajian dari segi kejuruteraan genetik berkaitan dengan gen xilanase daripada mikroorganisma telah banyak dilakukan terutamanya pengklonan gen xilanase dan pengekspresannya di dalam *Escherichia coli* yang melibatkan berbagai strategi. Di antara strategi tersebut ialah penggunaan bakteriofaj (Gilbert et al., 1988; Ghangas et al., 1989; Lee et al., 1993) dan plasmid (Zappe et al., 1987; Yang et al., 1988; Romaniec et al., 1989) sebagai vektor. Pengekspresan enzim xilanase daripada klon yang diperolehi juga dikaji sama ada secara ekstrasel ataupun intrasel (Bernier et al.,

1985; Lee et al., 1985a; Zappe et al., 1987). Kebanyakannya mendapati enzim xilanase daripada klon diekspreskan secara ekstrasel.

Tesis ini melaporkan tentang kajian pengklonan gen xilanase daripada *B.coagulans* ST-6 ke dalam *E. coli* HB101. Kajian awal melibatkan penentuan pengekspresan enzim daripada stok kultur asal *B. coagulans* ST-6 yang disimpan di dalam simpanan nitrogen cecair.

Objektif utama kajian ini adalah:

1) Mengklonkan gen xilanase daripada *B. coagulans* ST-6 ke dalam *E. coli* HB101 dengan menggunakan vektor plasmid pBR322.

2) Mengkaji ciri-ciri plasmid rekombinan yang terbentuk dan seterusnya melakukan kajian pengsubklonan bagi serpihan gen xilanase yang diperolehi ke dalam vektor pUC18 dan pUC19.

3) Mengkaji dan membandingkan ciri-ciri enzim xilanase terklon dengan enzim xilanase daripada *B. coagulans* ST-6.

## BAB 11

### OROTAN LITERATUR

#### Xilan

Xilan adalah komponen utama di dalam hemiselulosa dan ia banyak didapati dalam sisa-sisa pertanian seperti jerami padi, kelapa sawit dan juga pembalakan. Xilan banyak didapati dalam dinding sel bagi tumbuhan daratan yang mana ianya meliputi lebih 30% daripada berat kering. Ia juga merupakan biopolimer yang banyak disintesis di biosfera selepas selulosa serta mempunyai struktur kimia yang berbeza di antara tumbuhan terrestrial dengan alga laut. Bagi tumbuhan terrestrial, pembentukan xilan adalah berasaskan kepada rantaian  $\beta$ -1,4-D-xilosa manakala bagi alga laut pula ianya berasaskan kepada rantai  $\beta$ -1,3-D-xilosil (Joseleau, 1992).

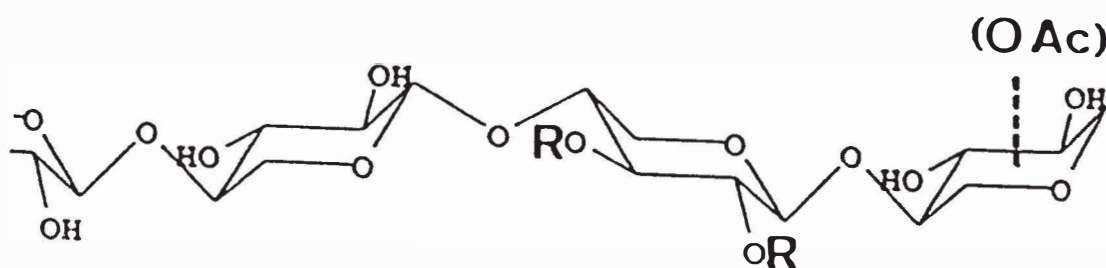
Bagi kebanyakan spesies *Chlorophyceae* dan *Rhodophyceae* ia tidak mempunyai selulosa maka xilan merupakan bahan 'fibriller crystalline' yang tinggi. Xilan daripada tumbuhan daratan terdiri daripada heteropolisakarida yang membentuk

kumpulan besar bagi hemiselulosa di mana ia menunjukkan pelbagai pengubahsuaian di dalam strukturnya. Ini menghasilkan struktur xilan yang kompleks dan membentuk berbagai jenis polimer xilan (Joseleau, 1992).

Xilan yang terdapat pada tumbuhan berkayu mengandungi kumpulan asetil (Biely, 1985) dan ia terikat pada kedudukan 0-3 dan 0-2 pada unit xilosa. Kehadiran kumpulan ini membolehkan xilan larut di dalam air berbanding dengan xilan yang tidak mempunyai kumpulan asetil (Dekker dan Richards, 1976).

Xilan boleh dibahagikan kepada dua kumpulan (Aspinal, 1970; Biely, 1985). Kumpulan termudah, yang dikenali sebagai Esparto xilan, terdiri daripada struktur lurus rantai polisakarida yang terikat dengan ikatan  $\beta$ -1,4-D-xilopiranosil. Kumpulan kedua bagi xilan merupakan kumpulan kompleks dan ia terdiri daripada heteropolisakarida bercabang dan darjah percabangannya bergantung kepada punca tumbuhan tersebut.

Daripada rantaian mudah  $\beta$ -1,4-D-xilopiranosil, kekompleksan struktur xilan semakin bertambah dengan penambahan bilangan monosakarida dan oligosakarida yang terikat pada rantai  $\beta$ -1,4-xilosil. Timell (1964) telah mengkaji hemiselulosa secara kimia bagi tumbuhan Angiosperma dan Gimnosperma manakala Willie (1976) pula telah menerangkan kriteria struktur xilan yang berbeza daripada spesies monokotiledon. Secara amnya struktur xilan daripada kayu keras, kayu lembut dan rumput adalah seperti Rajah 1.



R :  $\alpha$ -D-Glcp A (1→2)Xyl...

4-OMe- $\alpha$ -D-Glcp A (1→2)Xyl...

$\alpha$ -L-Araf (1→3)Xyl...

$\alpha$ -L-Araf (1→2)Xyl...

$\beta$ -D-Galp (1→5) $\alpha$ -L-Araf (1→3)Xyl...

$\beta$ -D-Xylp (1→2) $\alpha$ -L-Araf (1→3)Xyl...

$\alpha$ -L-Araf (1→2, 1→3 dan 1→2,3 Araf)<sub>n</sub>(1→3)Xyl...

Feruloyl

p. coumaroyl

Lignin

Rajah 1 : Prinsip penambahan residu pada rantai sisi tulang belakang xilan  
(Joseleau et al., 1992)

Kandungan kumpulan sisi dan frekuensi penambahannya bergantung kepada sumber xilan tersebut (Timell, 1964). Oleh itu, xilan bagi kayu keras biasanya terdiri daripada 0-asetil-4-0-metilglukoronoxilan dengan purata lebih kurang 10% xilosa berunit  $\alpha$ -1,2 yang terikat pada asid 4-0-metilglukoronik di rantai sisi dan 70% xilosa dengan residu asetil pada kedudukan C-2 dan C-3. Xilan dari kayu lembut mengandungi purata rantaian yang lebih pendek berbanding dengan xilan dari kayu keras dan biasanya residu xilosa menjadi tulang belakang dengan penambahan residu  $\alpha$ -1,3-arabinofuranosa.

### **Enzim xilanase**

Xilanase adalah sejenis enzim hidrolitik yang spesifik terhadap ikatan glikosidik yang khusus (Hall et al., 1970) dan sangat penting dalam proses pendegradasian xilan kepada molekul yang lebih ringkas seperti xilosa, arabinosa dan sebagainya. Ianya dihasilkan oleh mikroorganisma seperti kulat (Matsuo et al., 1975), bakteria (Deschamps et al., 1982) dan yis (Biely et al., 1980) dan sekurang-kurangnya terdapat dua jenis enzim yang diperlukan untuk menghidrolisiskan ikatan pada xilan (Kaisa et al., 1986) iaitu :

a) (1-4)- $\beta$ -D-xilan xilanohidrolase (EC 3.2.1.8) atau xilanase atau dikenali juga sebagai endo-xilanase. Ianya menyerang teras utama polisakarida.

b) (1-4)- $\beta$ -D-xilan xilohidrolase (EC 3.2.1.37) atau  $\beta$ -xilosidase ataupun ekso-xilanase dan ianya memecahkan xilooligosakarida kepada xilosa.

Secara umumnya tindakan enzim-enzim xilanolitik ke atas serpihan heteroxilan tumbuhan adalah seperti Rajah 2.

Enzim penghadaman ini juga penting dari segi perdagangan di mana ia terlibat dalam sistem pencernaan herbivor (Williams, 1989) dan juga dalam industri palpa dan kertas, kain dan makanan terutamanya yang melibatkan proses pembuangan xilan dan pengekalan kandungan selulosa (Biely, 1991). Dalam biojisim, hemiselulosa yang mengandungi xilan akan terikat kuat kepada selulosa dan lignin. Bagi membolehkan proses penghidrolisisan secara berenzim berlaku secara *in vitro* maka perawatan secara kimia hendaklah dilakukan terlebih dahulu. Salah satu kaedah yang digunakan melibatkan perawatan 'thermomechanical steam' dan diikuti oleh pengestrakan secara air panas (Chahal et al., 1987).

Untuk memastikan kejayaan proses hidrolisis berenzim bagi rangkaian xilan kepada oligomer atau monomer, adalah amat penting untuk memperbaiki lagi sistem enzim tersebut dan diharapkan ia boleh berfungsi dalam keadaan yang bersuhu tinggi (seperti 70°C) dan pH asid (sekitar 4.0). Tetapi kedua-dua parameter tersebut adalah tidak sesuai bagi kebanyakan xilanase yang telah diketahui. Misalnya, xilanase 11 daripada *Streptomyces roseiscleroticus* yang bersifat mesofilik mempunyai aktiviti kurang dari 5% pada pH 4.0 berbanding dengan aktivitinya pada pH 6.0-6.5 (Grabski dan Jeffries, 1991). Manakala xilanase daripada *Aureobasidium pullulans* (Myburgh et al., 1991) mempunyai pH optimumnya di antara 3.5-4.0 dan pengurangan aktiviti yang mendadak pada suhu lebih daripada 35°C.



