

Mikrobiyal Ksilanazlar ve Gıda Endüstrisinde Kullanım Alanları

Sırma Yeğın¹ ✉, Ali Oğuz Büyükkilleci²¹Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir²İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Bölümü, Urla, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 14.03.2015, Kabul Tarihi (Accepted): 04.05.2015

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): sirma.yegin@ege.edu.tr (S. Yeğın)

☎ 0 232 311 19 21 📠 0 232 342 75 92

ÖZ

Ksilanazlar, doğada bitki hücre duvarının yapısında bulunan ksilanın hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Çok yaygın kullanım alanı bulunan bu enzimler gıda ve yem sektörü açısından da büyük önem taşımaktadırlar. Endüstriyel ksilanaz üretimi mikrobiyal biyoproseslerle gerçekleştirilmektedir. Söz konusu enzimlerin biyosentez düzeyi, biyokimyasal ve teknolojik özellikleri, üretimde kullanılan mikroorganizma ve biyoproses koşullarına göre farklılık göstermektedir. Son zamanlarda ksilanazların üretim düzeylerinin artırılması, saflaştırılması ve karakterizasyonu üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Ancak günümüzde sürdürülebilir, çevreci ve ekonomik proseslerin geliştirilmesi adına alışılmışın dışında ve çok yönlü kullanılabilen yeni enzim sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu derlemede, ksilanın yapısı, ksilanaz grubu enzimlerin sınıflandırılması, mikrobiyal ksilanaz üretimi, saflaştırılması, karakterizasyonu ve gıda sektöründe uygulamaları üzerinde durulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ksilanaz, Lignoselüloz, Biyoproses, Endüstriyel uygulamalar

Microbial Xylanases and Their Applications in Food Industry

ABSTRACT

Xylanases are the enzymes that are responsible for the hydrolysis of xylans existing in the plant cell wall. These enzymes, which are having widespread applications, are also very important for food and feed industries. Industrial production of xylanase is carried out by the microbial bioprocesses. The biosynthesis level and the biochemical and technological properties of these enzymes are influenced by the microbial strain chosen and the features of the bioprocess. In recent years, several studies have been conducted on the production, purification and characterization of these enzymes. However, today there is still a need for novel and versatile enzymes for the development of sustainable, environmentally friendly and economically feasible processes. This review emphasizes on the bioprocess routes to obtain high enzyme titer, the purification and characterization of xylanases and the industrial applications of xylanases with the focus on food industry.

Keywords: Xylanase, Lignocellulose, Bioprocess, Industrial applications

GİRİŞ

Lignoselülozik maddeler dünya üzerindeki toplam biyokütlenin yaklaşık %50'sini oluşturmaktadır. Bitkiler tarafından fotosentez yolu ile yıllık $10-50 \times 10^{12}$ ton lignoselülozik madde oluşturulduğu tahmin edilmektedir [1]. Lignoselülozik maddeler temel olarak üç polimerden

oluşmaktadırlar: selüloz, hemiselüloz ve lignin. Hemiselüloz bir heteropolisakkarit olup selüloz ve bir polifenol olan lignin polimeriyle birlikte oldukça karmaşık bir yapı sergilemektedir [2]. Hemiselüloz kendi başına da fazlasıyla karmaşık bir polimerdir. Yapısında temel olarak ksilan, mannan, galaktan ve arabinan heteropolimerlerini içermektedir. Hemiselüloz

fraksiyonlarının sınıflandırılması içerdikleri şeker gruplarına göre yapılmaktadır. D-ksiloz, D-mannoz, D-galaktoz ve L-arabinoz hemiselüloz yapısını meydana getiren temel monomerlerdir [3].

Ksılan bitki hücre duvarında bulunan hemiselülozun temel bileşenidir. Doğada selülozdan sonra ikinci sırada en yaygın bulunan polisakkarittir ve toplam biyokütlenin yaklaşık %20-30'unu oluşturmaktadır [4]. Bir heteropolimer olan ksılan temel zinciri, birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarıyla bağlı beş karbonlu bir şeker olan ksiloz ünitelerinden oluşmaktadır. Kara bitkilerinde temel zinciri oluşturan ksiloz üniteleri birbirlerine β -1,4-glikosidik bağlarıyla bağlyken alglerde durum farklı olup ksiloz üniteleri birbirine β -1,3-glikosidik bağlarıyla bağlıdır [5]. Temel zincire bağlı dallanmış yapıda D-ksiloz ünitelerine çoğunlukla 0-3 pozisyonlarında bağlı L-arabinofuranoz, 0-2 pozisyonlarında bağlı D-glukuronik asit ya da 4-O-metil-D-glukuronik asit üniteleri yer alabilmektedir. Yan zincirlerdeki şekerler α -glikosidik bağlarıyla bağlıdır [5]. Sert odunsu bitkilerden elde edilen ksılan yüksek miktarda asetil grupları içermektedir. Asetil grupları ksılanın suda çözünürlüğü üzerinde kısmen etkilidir [3]. Yumuşak odunsu bitkilerden elde edilen ksılan asetil grubu içermez, asetil grupları yerine α -L-arabinofuranoz üniteleri içermektedir [6]. Yumuşak odunsu bitkilerdeki ksılan, sert odunsu bitkilere göre daha kısa zincirlidir [5].

Karmaşık kimyasal yapısı nedeniyle ksılanın tam olarak yıkımı farklı spesifiteye ve mekanizmaya sahip çeşitli hidrolitik enzimlerin kullanımını gerektirmektedir. Bu enzimlerden endo- β -1,4-ksılanaz (EC.3.2.1.8), ksılan temel zincirini rastgele olarak parçalayarak ksilo-oligosakkarit oluştururken β -ksilosidaz (EC.3.2.1.37) ise ksilo-oligosakkaritlerin ve ksilobiyozun indirgen olmayan uçlarına etki ederek ksiloz oluşturur. Bu temel iki enzim dışında, α -L-arabinofuranosidaz (EC.3.2.1.55), α -glukoronidaz (EC.3.2.1.139), asetil ksılan esteraz (EC.3.1.1.72), ferulik asit esteraz (EC.3.1.1.73) ve *p*-kumarik asit esteraz (EC.3.1.1.-) ise temel zincire bağlı yan grupların hidrolizinde etkilidir [7].

Ksılanazlar; küf, bakteri, maya, alg, protozoa, salyangoz, kabuklular, böcekler ve tohumlar gibi pek çok canlı grubu tarafından üretilmektedirler. Ticari olarak ksılanaz üretimi çeşitli mikroorganizmalar ile gerçekleştirilmektedir. Ancak küfler endüstriyel ksılanaz üretimi için temel kaynaktır [5]. Ticari olarak üretilen ksılanazlar, kağıt endüstrisi başta olmak üzere, son zamanlarda gıda ve yem sektörlerinde çok yaygın kullanım alanı bulmaktadırlar. Ayrıca atık arıtım ve değerlendirme proseslerinde ksilana yönelik uygulamalar bulunmaktadır. Ksılanın başka biyoprosesler için substrat olarak kullanılabilmesi ksılanın enzimatik hidrolizini ön plana çıkarmaktadır. Bu derlemede, ksılanaz grubu enzimlerin sınıflandırılması, ksılanaz üreten mikroorganizmalar, ksılanaz üretimi, saflaştırılması ve gıda sektöründe uygulamaları üzerinde durulmuştur.

KSİLANAZLARIN SINIFLANDIRILMASI

Ksılanazların sınıflandırılması pek çok farklı şekilde yapılmıştır. Wong ve ark. [8] ksılanazları fizyokimyasal özelliklerine göre iki farklı sınıfa ayırmışlardır: 1) Bazik izoelektirik pH'ya sahip olup molekül ağırlıkları 30 kDa'dan küçük olanlar, 2) Asidik izoelektirik pH'ya sahip olup molekül ağırlığı 30 kDa'dan büyük olanlar. Ancak bu sınıflandırma ksılanazların % 70'i için doğru olmakla beraber söz konusu sınıflandırmaya uymayan istisnai ksılanazlar da mevcuttur. Bunlar genellikle küf kaynaklı enzimlerdir [7]. Başka bir sınıflandırma sistemine göre ise ksılanazlar; aile 10'a ait olanlar (önceki adıyla aile F) ve aile 11'e ait olanlar (önceki adıyla aile G) olmak üzere temel iki gruba ayrılmaktadırlar. Aile 10'a ait olan endo-ksılanazlar büyük molekül ağırlıklı, düşük izoelektirik pH'ya sahip proteinlerdir [9, 10]. Bu enzimler özellikle kısa zincirli ksilo-oligosakkaritler üzerinde yüksek aktiviteye sahiptirler [9]. Ayrıca aile 10 ait olan ksılanazlar tamamen ksilana spesifik olmayıp düşük molekül ağırlıklı selülozik substratlar üzerinde de aktivite gösterebilmektedirler. Aile 11'e ait olan endo-ksılanazlar ise küçük molekül ağırlıklı, yüksek izoelektirik pH'ya sahip proteinlerdir. Bu aileye ait enzimler "gerçek ksılanazlar" olarak bilinirler ve bu enzimler uzun zincirli ksilo-oligosakkaritler üzerinde etkilidirler [7]. Diğer taraftan enzim sınıflandırma numarası EC.3.2.1.8 kullanılarak CAZY gibi bazı bilgi bankalarında yapılan taramalarda ksılanaz aktivitesi, aile 5, 7, 8, 16, 26, 43, 52 ve 62'de de görülebilmektedir. Ancak söz konusu enzim grupları ile yapılan çalışmalar dikkatlice incelendiğinde sadece aile 5, 7, 8, 10, 11 ve 43'e ait dizilimlerin tam olarak endo- β -1,4-ksılanaz aktivitesi gösterdikleri görülmektedir [7]. Aile 16, 52 ve 62'ye ait olan enzimlerin iki farklı katalitik bölgeye sahip oldukları, bunlardan birinin aile 10 ya da aile 11'e ait olup diğerinin ise glikosidaz katalitik bölgesi olduğu belirtilmektedir. *Ruminococcus flavefaciens* enzimi bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Söz konusu mikroorganizmaya ait enzim amino-terminal dizilimi aile 11, karboksi-terminal dizilimi ise aile 16'ya aittir [11]. Aile 26'ya ait olan enzimler ise endo- β -1,4-ksılanaz aktivitesi göstermeyip endo- β -1,3-ksılanaz aktivitesi göstermektedirler. Sonuç olarak ksılanazlar temelde aile 10 ve 11 olarak sınıflandırılırsalar bile aile 5, 7, 8 ve 43'ün göz önüne alınması gerekmektedir [7].

KSİLANAZ ÜRETEN MİKROORGANİZMALAR

Doğada bitki hücre duvarının yapısında bulunan ksılanın tamamen yıkımı oldukça zordur. Bu işlem çoğunlukla geniş bir enzim sentezleme yelpazesine sahip küf ve bakteriler tarafından gerçekleştirilmektedir. Buradan yola çıkarak söz konusu lignoselülozik maddelerin parçalanması, pek çok pahalı, tehlikeli veya insan sağlığına ve çevreye zararlı olabilecek kimyasal proseslerin yerine, belirtilen mikroorganizmalardan elde edilen enzimler ile gerçekleştirilebileceği düşünülmüş ve bu konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır. Söz konusu enzimlerin ticari olarak üretimi mikroorganizmalar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ksılanın mikroorganizmalar tarafından hidrolizi 19. yüzyılda ortaya konmuştur. Ancak ksılanaz enziminin ilk olarak üretimi ve saflaştırılması sadece yarım yüzyıl öncesinde

Aspergillus foetidus kullanılarak gerçekleştirilebilmiştir [12]. Sonrasında pek çok farklı küf, bakteri ve maya ile ksilanaz üretilmiş ve saflaştırılmıştır. *Aspergillus* sp. [13], *Penicillium* sp. [14], *Bacillus* sp. [15], *Trichoderma* sp. [16] ve *Streptomyces* sp. [17, 18] bu mikroorganizma gruplarının üzerinde en çok çalışılanlardır. Endüstriyel boyutta ksilanaz üretimi temel olarak *Aspergillus* sp. ve *Trichoderma* sp. kullanılarak gerçekleştirilmiştir [19]. Moleküler tekniklerin de gelişmesi ile söz konusu mikroorganizmalarda ksilanaz enziminin üretiminden sorumlu genler tanımlanmış ve farklı mikroorganizmalarda ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ksilanazların *Escherichia coli*'de ekspresyonu sonrasında fonksiyonel olarak çalışmadıkları belirlenmiştir. Bu durumun ksilanazların seyrek bulunan kodon kodlarına sahip olmaları, di-sülfid bağ oluşumu [20] ve N-glikozilasyon [21] gibi bir takım post-translasyonel modifikasyonlara olan ihtiyaçlarından kaynaklandığı ortaya konulmuştur. Sıra dışı olarak sadece *Phytophthora thermophila* ksilanazına ait genin fonksiyonel olarak *E. coli*'de ekspresyonu gerçekleştirilmiş olup 98.0 U/ml dolaylarına bir aktivite elde edilmiştir [22]. Ksilanazların *Lactobacillus* sp. ve *Bacillus* sp.'ta ekspresyonu *E. coli*'ye göre daha yüksek oranda verim sağlamıştır. *Lactobacillus* sp. türlerinin GRAS (Generally Regarded As Safe) statülerinden dolayı bu mikroorganizmaya ait türlerde ekspresyonu gerçekleştirilen proteinlerin gıdalarda kullanımı mümkün olabilmektedir. Mayalar; post-translasyonel modifikasyonlar sağlayabilmeleri, güvenli olmaları ve toksin üretmemeleri gibi avantajları nedeniyle ksilanazların ekspresyonunda kullanılmışlardır. *Trichoderma reesei*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus nidulans* ve *Aspergillus niger* 'e ait ksilanaz genlerinin *Saccharomyces cerevisiae*'de fonksiyonel ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak ksilanazların mayalarda ekspresyonunda da pek çok problemle karşılaşmıştır. Bunlar stabil olmayan ekspresyon düzeyleri, fermantatif büyüme, hiper-glikolizasyon ve proteinlerin periplasmik bölgede kalması gibi problemlerdir [23]. Ksilanazların, ökaryotik proteinlerin ekspresyonunda çok başarılı sonuçlar veren *Pichia pastoris*'te de ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Ancak ksilanazların *P. pastoris*'te ekspresyonu sırasında da söz konusu ökaryotik ksilanaz genlerinin maya hücrelerinin fizyolojisi ve strese tepkileri üzerinde negatif etkilerinin bulunduğu ve bundan dolayı ekspresyon düzeylerinin düşük olduğu belirtilmiştir [23]. Diğer taraftan, son yıllarda *P. pastoris* ile yapılan bazı çalışmalarda yüksek düzeyde ksilanaz ekspresyonu elde edildiği belirtilmiştir. Bu çalışmalarda ekspresyonu gerçekleştirilen genler ya mutasyona uğratılmış ya da kodon optimizasyonu tekniğine başvurulmuş ve genin yapısında bir takım değişiklikler yapıldıktan sonra *P. pastoris*'te ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Örneğin, Jia ve ark. [24] *Thermotoga maritima* ksilanaz geninin kodon optimizasyonunu gerçekleştirdikten sonra söz konusu genin *P. pastoris*'te yüksek düzeyde ekspresyonunu başarıyla gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Li ve ark. [25] ise mutant *T. reesei* ksilanaz genini *P. pastoris*'e klonlayarak yüksek ekspresyon düzeylerine eriştiklerini ifade etmişlerdir. Ancak bu çalışmalarda rekombinant mikroorganizma ve ksilanaz geninin alındığı kaynak mikroorganizma, ekspresyon düzeyleri açısından

karşılaştırılmamıştır. Bu nedenle gen klonlanması ve ekspresyonu nedeniyle ortaya çıkan avantaj ve dezavantajların ortaya konması mümkün değildir. Diğer taraftan söz konusu rekombinant mikroorganizmalar ile sentetik ortam kullanılarak enzim üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu mikroorganizmalar ile gerçekleştirilen, ucuz ve bol bulunan tarımsal atıklar ve yan ürünlerin kullanıldığı ortam formülasyonu çalışmalarına rastlanmamıştır. Ksilanazların küflerde de ekspresyonu sağlanmıştır. Örneğin *Penicillium griseofulvum* ksilanaz geninin *Aspergillus oryzae*'de ekspresyonu gerçekleştirilmiştir [26]. Ancak daha yüksek verimlilikte, düşük maliyette ve farklı karakteristikte enzim üreten mikroorganizma arayışları sürekli devam etmiştir. Ksilanazlar üzerinde pek çok çalışma yapılmış olmakla beraber bu konudaki bilimsel çalışmalar sürekli artan bir eğilim göstermiştir. Bu çalışmalarda, ksilanaz yanında farklı yan enzim aktivitelerini minimum düzeyde içeren yüksek üretim sistemleri geliştirmek hedeflenmiştir.

KSİLANAZ ÜRETİMİ

Endüstriyel enzim üretiminde ilk basamak yüksek düzeyde enzim üreten bir mikroorganizmanın tespit edilmesi ve/veya moleküler teknikler kullanılarak geliştirilmesidir. Uygun üretici mikroorganizmanın elde edilmesinden sonraki aşama, üretim ortamı bileşimi ve biyoproses koşullarının optimize edilerek enzim üretiminin maksimize edilmesidir. Ksilanazlar, hem katı kültür fermantasyon hem de sıvı kültür fermantasyon ile üretilebilmektedirler. Endüstriyel ksilanaz üretimi çoğunlukla sıvı kültür fermantasyon ile gerçekleştirilmektedir. Ticari olarak üretilen ksilanazların yaklaşık olarak %90'ı sıvı kültür fermantasyon ile üretilmektedir [27]. Ancak katı kültür fermantasyon ile ksilanazlar da dahil olmak üzere pek çok fungal enzimin üretimi konusunda önemli çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Katı kültür fermantasyon ile ksilanaz üretimi çeşitli tarımsal ve endüstriyel atıkların üretim ortamı formülasyonunda karbon kaynağı olarak kullanılması ile gerçekleştirilmektedir. Küflerin büyüme ve gelişmeleri için bakteri ve mayalara göre daha düşük su aktivitelerine ihtiyaç duymaları katı kültür fermantasyonu söz konusu mikroorganizmalar için daha uygun kılmaktadır. Katı kültür fermantasyon ile gerçekleştirilen üretimlerde sıvı kültür fermantasyona göre daha yüksek enzim aktiviteleri elde edilmesi katı kültür fermantasyonun en önemli avantajıdır. Basit olması, üretim maliyetlerinin düşük olması, biyoproses sonucu üretilen atık sıvı miktarının az olması ve daha konsantre formda enzim preparatlarının elde edilebilmesi bu tekniğin diğer önemli avantajlarıdır [28]. Katı kültür fermantasyon sırasında nem, pH, serbest oksijen ve karbondioksit düzeylerinin kontrol edilmesi için çok gelişmiş sistemlerin bulunmaması ve bu nedenle ölçek büyütmenin daha zor olması söz konusu fermantasyon tekniğinin dezavantajlarıdır [29]. Sıvı kültür fermantasyon tekniği için belirtilen parametrelerin kontrol edilmesine olanak sağlayan gelişmiş sistemlerin bulunması bu teknikte ölçek büyütme işlemini daha kolay kılmaktadır. Ayrıca sıvı kültür fermantasyon tekniği ile üretilen metabolitlerin saflaştırılması çoğunlukla daha

kolaydır. Genellikle sıvı kültür fermentasyon yüksek saflıkta enzim elde edilmesi gerektiğinde tercih edilmektedir [5].

Uygun substrat seçimi, yüksek verimlilikte ksilanaz üretimi için oldukça önemlidir. Katı kültür fermentasyon ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği çalışmalarda ekonomik değeri düşük çok sayıda tarımsal yan ürün mikrobiyal substrat olarak değerlendirilmiştir. Katı kültür ve sıvı kültür fermentasyonlarda ksilanaz üretimi için en tipik substrat buğday kepeği olup pek çok çalışmada oldukça yüksek verimlilik sağlanmıştır [30, 31]. Bu durumun buğday kepeğinin yüksek ksilan içeriğinden (%40) kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir [30]. Lignoselülozik materyal içeren üretim ortamlarına düşük düzeylerde saf ksilan [32] veya ön işlemle kısmen saflaştırılmış lignoselülozik materyal ilave edildiğinde ksilanaz üretiminde artışlar tespit edilmiştir. Ncube ve ark. [33] tarafından yapılan bir çalışmada *A. niger* FGSCA733 ile ksilanaz üretimi için endüstriyel bir atık olan hint fıstığı (*Jatropha curcas*) tohumu keki kullanılmıştır. Söz konusu üretim ortamına sülfürik asit muamelesi ile ön işlem görmüş çimen (% 0.1) ilave edildiğinde ksilanaz üretiminde beş kat artış tespit edilmiştir. Bu durumun hemiselülozun yapısında bulunan ksilanın uygulanan ön işlem nedeniyle mikroorganizma tarafından erişilebilirliğinin kolaylaşmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir. *A. foetidus* ile gerçekleştirilen bir çalışmada ise buğday samanı ve mısır koçanı, alkali muamelesinin ardından enzim üretiminde kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada ksilanaz üretiminde önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir [34]. Alkali muamelesinin lignoselülozik materyallerden lignini uzaklaştırarak selülozik ve hemiselülozik substratların erişilebilirliğini arttırdığı bilinmektedir. Ancak bu çalışmada enzim üretiminde meydana gelen düşüş karbon kaynaklarının hızlıca tüketilmesine ve açığa çıkan basit şekerlerin sebep olduğu katabolik represyona bağlanmıştır. Özetle, lignoselülozik materyallere uygulanan ön işlemler bazı durumlarda avantaj teşkil ederken bazı durumlarda dezavantaja dönüşebilmektedir. Uygulanan ön işlemin kullanılan mikroorganizma tarafından ksilanın erişilebilirliğini arttırması avantaj iken kolayca metabolize edilebilen substratlara (basit şekerlere) dönüştürülmesi dezavantaj olabilmektedir. Farani de Souza ve ark. [35] tarafından *Aspergillus tamaris* ile gerçekleştirilen bir çalışmada çeşitli tarımsal yan ürünler ve atıklar ksilanaz üretimi açısından taranmıştır. Buğday kepeği, mısır koçanı ve şeker pancarı küspesi taranan atık ve yan ürünler arasında yüksek düzeyde ksilanaz üretilmesine olanak sağlamıştır. Aynı çalışmada çeşitli basit şekerlerin üretim ortamına ilavesi ile gerçekleştirilen üretimlerde mısır koçanı ve şeker pancarı küspesinin kullanıldığı ortamlarda basit şekerlerin ilavesi ile önemli düzeyde katabolik represyon gözlenirken buğday kepeği içeren ortamda katabolik represyonun önemsiz düzeyde olduğu gözlenmiştir. Buğday kepeği ve glikoz içeren üretim ortamı formülasyonunda glikoz miktarı arttıkça enzim aktivitesinde önemli düzeyde artış görülmüştür. %15 ve üzeri glikoz konsantrasyonlarında ksilanaz aktivitesinde düşüş görülmüştür. Katı kültür fermentasyonun katabolik represyonu minimize ettiğine dair çok sayıda

çalışma mevcuttur ancak bu çalışmalar da buğday kepeği ile gerçekleştirilmiştir [36, 37]. Bu durumun başta basit şekerlerin düşük su aktivitesine bağlı olarak yavaş ve az miktarlarda difüze olması gibi çok fazla faktöre bağlı olarak değişebildiği ifade edilmiştir [35].

Lignoselülozik materyallere uygulanan fiziksel ön işlemlerin söz konusu materyallerin yapılarında bulunan ksilanın mikroorganizma tarafından kullanılabilirliğini etkilediğine dair çalışmalar da mevcuttur. Özellikle boyut küçültme ve yüksek sıcaklıkta buhar uygulamasının ksilanaz üretimi üzerinde önemli etkileri olduğu ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada, buğday samanı 190°C'de 10 dakikalık bir buhar uygulamasının ardından boyut küçültme işlemine (0.25mm) tabi tutularak *Thermoascus aurantiacus* ile ksilanaz üretiminde kullanılmış ve ön işlem uygulanmamış substrata göre enzim üretiminde önemli düzeyde artışlar gözlenmiştir. Uygulanan fiziksel ön işlemlerle substrat yapısında meydana gelen değişikliklerin (ligninin fiziksel modifikasyonu, yüzey alanında ve gözenek çapında artış, selülozun kısmi dekrystalizasyonu, hemiselülozdan asetil gruplarının ayrılması veya hemiselülozun depolimerizasyonu) substratı mikroorganizma için daha elverişli hale getirdiği belirtilmiştir [38]. Diğer taraftan, ortam formülasyonunda kullanılan lignoselülozik materyallere uygulanan boyut küçültme işleminin ksilanaz üretimi üzerinde negatif etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Yapılan bir çalışmada buğday ve arpa samanına uygulanan boyut küçültme işleminin ksilanaz üretimi üzerine etkisi incelendiğinde, partikül boyutunun 2-3 mm'den 0.20-0.25 mm'ye düşürülmesi durumunda, *Sporotrichum thermophile* ile ksilanaz üretiminde düşüş meydana gelirken biyokütle üretiminde %50 oranında artış meydana gelmiştir [39]. Sonuç olarak, optimum partikül boyutunun tespit edilmesinin ksilanaz üretimi açısından önem taşıdığı söylenebilmektedir.

Ksilanaz üretimini indükleyen substratlar dışında bir takım mineral tuzların (KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$, NH_4^+ -tuzları, NO_3^- -tuzları vb.), bazı metal iyonlarının (Fe^{2+} , CO^{2+} , Zn^{2+} vb.), ve kompleks azot kaynaklarının (maya ekstraktı, et ekstraktı, mısır ıslatma suyu vb.) ortam formülasyonunda kullanımının da ksilanaz üretimi üzerinde önemli etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [32]. 17.5 g/L maya ekstraktının katı kültür üretim ortamı formülasyonunda kullanılmasının *Thermomyces lanuginosus* ile ksilanaz üretimi için optimum olduğu belirtilmiştir [40]. *Coprinellus disseminatus* kullanılarak katı kültür fermentasyon tekniği ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada kompleks azot kaynaklarının (pepton, et ekstraktı, soya küspesi, malt ekstraktı ve maya ekstraktı) ksilanaz üretimi üzerine etkisi incelendiğinde benzer şekilde en yüksek enzim aktivitesi maya ekstraktı kullanıldığında elde edilmiştir [41]. Kumar ve ark. [42] tarafından *T. lanuginosus* MC 134 ile gerçekleştirilen bir çalışmada mısır koçanı içeren üretim ortamına %1'lik (w/v) maya ekstraktı ilavesinin maksimum düzeyde enzim aktivitesi sağladığı belirtilmiştir. Pek çok çalışmada maya ekstraktının daha iyi sonuçlar vermesi maya ekstraktının içeriğindeki serbest aminoasitlerin ve diğer maddelerin pek çok mikroorganizma tarafından daha kolay kullanılmasından

kaynaklandığı ifade edilmiştir. Farklı kompleks azot kaynakları için değişik düzeylerde enzim aktivitesi elde edilmesi söz konusu azot kaynaklarının aminoasit, peptid, vitamin, iz element ve mineral tuz içeriklerinin farklılığından kaynaklandığı vurgulanmıştır. Lignoselülozik materyallere ek olarak kullanılan azot kaynaklarının daha yüksek enzim aktiviteleri sağlaması, lignoselülozik madde içeriğindeki azot ve/veya diğer esansiyel besin kaynaklarının miktarlarının mikroorganizmanın büyüme, gelişme ve enzim üretmesi için yeterli olamayabileceğini göstermektedir [32]. Pek çok küf için kompleks azot kaynaklarının inorganik azot kaynaklarına kıyasla daha yüksek ksilanaz aktivitelerinin elde edilmesine olanak sağladığı gösterilmiştir [32]. Ancak *Penicillium citrinum* xym2 ile ksilanaz üretiminin gerçekleştirildiği bir çalışmada enzim üretimi üzerine etkisi araştırılan organik ve inorganik azot kaynakları içerisinde maksimum enzim üretimi $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ile elde edilmiştir [43]. Adhyaru ve ark. [44] tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise denenen inorganik azot kaynakları arasında KNO_3 *Bacillus altitudinis* DHN8 ile ksilanaz üretiminde maksimum aktivite sağlamıştır. Nagar ve ark. [30] tarafından yapılan bir çalışmada da KNO_3 , pepton ve maya ekstraktı kombinasyonun maksimum düzeyde enzim üretimi sağladığı belirlenmiştir. Ortam formülasyonunda kullanılan azot kaynağının biyoproses süresince ortam pH'sındaki değişim üzerinde de önemli etkisi olduğu ifade edilmiştir [45]. Ortam pH'sının *T. reesei* ile ksilanaz üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğu belirlenmiştir [32].

Mikrobiyal ksilanaz üretimi üzerine ortam formülasyonu yanında pH, sıcaklık, çözülmüş oksijen konsantrasyonu, karıştırma gibi çevresel faktörler de etkilidir. Ancak söz konusu bu faktörlerin ksilanaz üretiminde kullanılacak olan mikroorganizmaya spesifik olarak belirlenmesi gerekmektedir.

KSİLANAZLARIN SAFLAŞTIRILMASI

Enzim saflaştırılması, enzimin yapı ve fonksiyonları hakkında bilgi sahibi olunarak kullanım alanlarının belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Enzim saflaştırılmasında izlenecek strateji enzimin kullanım alanıyla ilişkilidir. Saflaştırılmada amaç en az işlemle mümkün olan en yüksek verimlilik ve katalitik aktiviteye sahip arzu edilen saflıkta enzim elde etmektir. Enzim saflaştırılmasında kullanılan temel teknikler; filtrasyon, santrifugasyon, ultrafiltrasyon, diafiltrasyon, çöktürme, diyaliz ve kromatografik teknikler (iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, hidrofobik interaksiyon kromatografisi, afinite kromatografisi, vb.) şeklinde özetlenebilir.

Ksilanazlar çoğunlukla hücre dışı olarak üretilirler, ancak bazı mikroorganizmaların hücre içi ksilanaz ürettikleri de belirlenmiştir. *Ruminococcus flavefaciens* [46], *Bacillus stearothermophilus* T-6 [47], *Penicillium janthinellum* [48] hücre içi ksilanaz üreten mikroorganizmalara örnek verilebilir [5]. Hücre dışı üretilen enzimlerin saflaştırılması, hücre parçalama işlemine gerek duyulmaması nedeniyle hücre içi üretilen enzimlere göre daha basittir.

Ksilanazların saflaştırılmasında kullanılan işlemler arzu edilen saflık derecesine ve kullanım alanına göre çok büyük farklılıklar gösterir. Tek aşamalı bir saflaştırma tekniği kullanılabileceği gibi birden fazla basamaklı bir saflaştırma stratejisi de uygulanabilmektedir. Ksilanaz saflaştırılmasında iyon değişim kromatografisi ve jel filtrasyon kromatografisi ağırlıklı olarak kullanılmaktadır [5].

Ham enzim preparatları genellikle sekonder metabolitler ve bazı organik tuzlar içermektedir. Endüstriyel ölçekte, bu kontaminantlar bazı membran teknikler (ultrafiltrasyon ve ardı sıra uygulanan diafiltrasyon işlemi) kullanılarak uzaklaştırılırlar. Bahsedilen membran tekniklerine eşdeğer diğer bir teknik ise dializdir. Dializ genellikle amonyum sülfat ile çöktürme sonrası laboratuvar ölçeğinde uygulanan bir tekniktir. Organik moleküllerin ve tuzların uzaklaştırılmasında kullanılan diğer bir teknik ise jel filtrasyon kromatografisidir [28]. Ancak jel filtrasyon kromatografisi genellikle enzim saflaştırılmasında ilk aşama olarak uygulanmamaktadır.

Mikrobiyal ksilanazlar çoğunlukla 2 ila 5 basamaktan oluşan saflaştırma stratejileri kullanılarak saflaştırılmışlardır. Elde edilen verim %0.2 ile %78 arasında değişmektedir. Beklendiği gibi kullanılan basamak sayısı arttıkça verim azalmaktadır [5]. *Paenibacillus sp.* ASCD2 ile üretilen ksilanaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat ile çöktürme ve diyaliz yöntemlerinin uygulanması sonrasında %77.86 gibi bir verim elde edilirken, bu işlemlerin ardından uygulanan jel filtrasyon kromatografisi sonrasında verim %38.33'e düşmüştür [49]. *T. aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 tarafından üretilen ham ksilanaz enzim preparatı amonyum sülfat ile çöktürüldüğünde %28'lik bir verim elde edilirken jel filtrasyon kromatografisi sonrasında verim %6.0 ve iyon değişim kromatografisi sonrasında ise verim %2.3'e düşmüştür [50]. Tablo 1'de bazı mikrobiyal ksilanazların saflaştırılmasında kullanılan stratejiler özetlenmiştir.

Ksilanazlar mikrobiyal yolla üretilip saflaştırıldıktan sonra karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve bu enzimlerin özellikleri ortaya konmuştur. Enzimlerin özelliklerine göre kullanım alanları belirlenmiştir. Söz konusu enzimlerin karakteristikleri birbirinden oldukça farklıdır. Tablo 2'de bazı mikrobiyal ksilanazların karakteristikleri gösterilmiştir. Optimum pH değeri 2'den 10'a kadar geniş bir aralıkta olabilmektedir. Optimum sıcaklık ise 40°C ila 105°C arasında değişmektedir [3]. Sıcaklık ve pH stabilite değerleri, molekül ağırlıkları da çok büyük farklılıklar göstermektedir.

Ksilanazlar yem endüstrisi açısından büyük öneme sahiptirler, özellikle kanatlı yem katkısı olarak da kullanılmaktadırlar. Etlik piliç üretiminde kullanılan tahıl bazı yemler, yapılarında nişasta tabiatında olmayan ve antibesinsel faktör olarak kabul edilen çeşitli polisakaritleri içermektedir. Bu karbonhidratların su tutma kapasitesi yüksek olduğundan bağırsak viskozitesini arttırmaktadırlar [67]. Viskozitedeki bu artış ince bağırsaktaki besin maddelerinin sindirimini düşürmekte ve piliçlerde ağırlık artışının verilen besine oranla daha az olmasına neden olmaktadır.

Ksılanazların kullanımı ile belirtilen bu polisakaritlerin parçalanıp su tutma kapasitesi düşürülmekte ve söz konusu sorunlar ortadan kaldırılabilmektedir. Yem endüstrisinde pelet oluşturma işlemi yaklaşık 70-90°C dolaylarında gerçekleştirildiğinden genel olarak yüksek termal stabiliteye sahip olan ksılanazlara ihtiyaç

duyulmaktadır [7]. Ayrıca yem endüstrisinde kullanılan ksılanazların sindirim sisteminin sahip olduğu sıcaklık (yaklaşık 40°C) ve pH değerlerinde (yaklaşık pH 4.8) yüksek düzeyde aktivite göstermesi arzu edilmektedir [68].

Table 1. Mikrobiyal ksılanazların saflaştırılmasında kullanılan stratejiler

Saflaştırma stratejisi	Mikroorganizma	Referans
Diyaliz, iyon değişim kromatografisi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi	<i>Aspergillus phoenicis</i>	[51]
Ultrafiltrasyon, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi	<i>Acrophialophora nainiana</i>	[52]
Amonyum sülfat ile çöktürme, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, diyaliz	<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 288.54	[53]
Amonyum sülfat ile çöktürme, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi	<i>Paecilomyces themophila</i>	[54]
Amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz, iyon değişim kromatografisi	<i>Streptomyces cyaneus</i> SN32	[55]
Amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi	<i>Aspergillus ficuum</i> AF-98	[19]
Amonyum sülfat ile çöktürme, iyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi	<i>Chaetomium</i> sp.	[56]
Amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz, iyon değişim kromatografisi	<i>Bacillus</i> sp. JB 99	[57]
İyon değişim kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	[58]
Amonyum sülfat ile çöktürme, diyaliz, iyon değişim kromatografisi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi	<i>Aspergillus niger</i> DFR-5	[59]
Nikel afinite kromatografisi, diyaliz	<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> NTOU1	[60]
Diyaliz, iyon değişim kromatografisi, diyaliz, jel filtrasyon kromatografisi	<i>Trichoderma inhamatum</i>	[61]

Table 2. Bazı mikrobiyal ksılanazların karakteristikleri

Mikroorganizma	Molekül ağırlığı (kDa)	Optimum sıcaklık (°C)	Optimum pH	pl	Referans
<i>Thermotoga maritima</i> MSB8	40, 120	92-105	5.4, 6.2	5.6	[62]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> SSBP	23.6	70-75	6.5	3.8	[63]
<i>Aspergillus niger</i> DFR-5	32	40	5.0	-	[59]
<i>Penicillium occitanis</i> Pol6	22	45	3.0	-	[64]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> CBS 288.54	26.2	70-75	7.0-7.5	-	[53]
<i>Streptomyces cyaneus</i> SN32	20.5	60-65	6.0	8.5	[55]
<i>Bacillus</i> sp. JB 99	20.0	70	8.0	-	[57]
<i>Chaetomium</i> sp.	25.1	65	7.5	-	[56]
<i>Micrococcus</i> sp. AR-135	56	55	7.5-9	-	[65]
<i>Aureobasidium pullulans</i> Y-12311-1	25	54	4.4	9.4	[66]

KSİLANAZLARIN KULLANIM ALANLARI

Ksılanazların çok geniş uygulama alanları bulunmaktadır. Gıda ve yem sektörüne yönelik bazı ticari ksılanazlar ve kaynakları Tablo 3'te özetlenmiştir. Ksılanazlar ekmek üretim teknolojisi açısından da büyük önem taşımaktadırlar. Ekmekçilikte ksılanazlar hamurun yoğrulma özelliklerini iyileştirerek, ekmek içi yapısını ve son ürün hacmini artırarak un kalitesindeki çeşitlilikten doğabilecek sorunların azaltılmasına yardımcı olmaktadır. Ksılanaz enziminin arabinoksilanı parçalamasıyla, hamurda arabinoksilanların tuttuğu su

serbest kalmakta ve hamur daha yumuşak hale gelerek makine ile işlenebilme özelliği artmaktadır. Böylece, ekmek içi yapısının oluşumu gecikmekte ve yüksek hacimli, yumuşak bir ürün elde edilmektedir [69]. Gıda endüstrisinde kullanılan ksılanazların düşük ve orta sıcaklık değerlerinde yüksek aktivite göstermesi istenmektedir. Örneğin, fırın ürünleri sektöründe hamur yoğrulması ve işlenmesi 35°C'nin altındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilmektedir [7].

Meyve suyu sektöründe de ksılanazlar pektinazlarla birlikte berraklaştırma amaçlı kullanılmaktadırlar. Meyve

suyundaki indirgen şeker miktarını da artırarak işlem görmüş meyve suyunda yüksek verim elde edilmesine yardımcı olmaktadır [70].

Ksılanazlar, bira üretiminde arpanın yapısında bulunan uzun zincirli arabinoksılanların parçalanmasına olanak sağlayarak arpanın hidrolize olmasını kolaylaştırırlar. Böylelikle vizkoziteyi düşürerek bulanıklığın azaltılmasına katkıda bulunurlar [5].

Doğada ikinci sırada en yaygın bulunan bir madde olan ksılanın parçalanıp, başka biyoprosesler için substrat olarak kullanımının mümkün olması da (örneğin biyoetanol üretimi) araştırmaların bu yönde sürekli

artmasına neden olmuştur. Diğer taraftan ksılanazlar; ksiloz, ksilo-oligomerler ve yapay bir tatlandırıcı olan ksilitol üretiminde de kullanılmaktadır [23]. Ksilooligosakkaritler prebiyotik özellik göstermekte olup gıda, yem, ilaç gibi endüstrilerde kullanım alanı bulamaktadırlar. Son yıllarda fonksiyonel ksilooligomerlerin üretimine ilgi büyüktür. Başka bir bakış açısıyla da ksılanazlar, lignoseülozik atıkların değerlendirilip katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesi açısından da büyük önem taşımaktadırlar. Örneğin, buğday kepeği, pirinç kepeği, mısır koçanı, şeker pancarı küspesi gibi endüstriyel atıklar ve yan ürünler ksılanaz üretiminde kullanılmıştır.

Tablo 3. Ksılanaz üreten firmalar

Firma	Ticari adı	Mikroorganizma	Uygulama alanı
Novozyme	Panzea®	<i>Bacillus licheniformis</i>	Fırın ürünleri
AB Enzymes	Veron®	-	Fırın ürünleri, glutensiz ürünler
YoutellBio	Xylanase UTC-X50	-	Bira endüstrisi
DSM	Ronozyme® WX	<i>Aspergillus oryzae</i> *	Yem endüstrisi
Dupont	Phyzyme® XP	<i>Trichoderma reesei</i>	Yem endüstrisi
Alltech	Allzyme PT	<i>Aspergillus niger</i>	Yem endüstrisi
Adisseo**	Rovabio®	<i>Penicillium funiculosum</i>	Yem endüstrisi
Aveve Biochem**	AveMix®	<i>Trichoderma reesei</i>	Yem endüstrisi

*: Genetiği değiştirilmiş, **: Enzim karışımı

SONUÇ

Ksılanazların pek çok endüstriyel alana yönelik uygulamalarının bulunması nedeniyle bu konudaki çalışmalar sürekli artan bir eğilim göstermiştir. Günümüzde endüstriyel boyutta enzim üretimi için en önemli sorun enzim üretim maliyetlerinin düşürülmesidir. Ar-Ge çalışmalarının çoğu bu yönde devam etmektedir. Ksılanazın da aralarında bulunduğu pek çok enzim grubu için çalışmaların çoğunluğu uygun bir üretici mikroorganizmanın bulunması ve/veya moleküler teknikler ile geliştirilmesi, aynı zamanda ucuz ve bol bulunabilen kaynaklardan oluşan bir üretim ortamı kompozisyonun oluşturulması yönünde devam etmektedir. Çok yaygın kullanım alanı bulunan ksılanaz enziminin üretimi ve saflaştırılması konusunda çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen büyük ölçekte, verimli ve düşük maliyetli üretim sistemleri geliştirilmesi konusunda problemler ve dolayısıyla arayışlar devam etmektedir.

TEŞEKKÜR

S. Yeğın; ksılanaz grubu enzimlerle ilgili birikimlerin oluşmasına olanak sağlayan TÜBİTAK-TOVAG 112O521 numaralı projeye olan desteklerinden dolayı "Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu"na teşekkürlerini sunmaktadır.

KAYNAKLAR

[1] Claassen, P.A.M., van Lier, J.B., Lopez-Contreras, A.M., van Niel, E.W.J., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weusthuis, R.A., 1999. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52: 741-755.

- [2] Paës, G., Berrin, J.G., Beaugrand, J., 2012. GH11 xylanases: Structure/function/properties relationships and applications. *Biotechnology Advances* 30: 564-592.
- [3] Beg, Q.K., Kapoor, M., Mahajan, L., Hoondal, G.S., 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 326-338.
- [4] Ruanglek, V., Sriprang, R., Ratanaphan, N., Tirawongsaroj, P., Chantasigh, D., Tanapongpipat, S., Pootanakit, K., Eurwilachitr, L., 2007. Cloning, expression, characterization, and high cell-density production of recombinant endo-1, 4-β-xylanase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 19-25.
- [5] Bajpai, P., 2014. Xylanolytic enzymes, New York, Academic Press.
- [6] Puls, J., Schuseil, J., 1993. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzyme required for hydrolysis: Hemicellulose and Hemicellulases, Edited by M.P. Coughlan, G.P. Hazlewood, London, Oortland Press.
- [7] Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanase. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 3-23.
- [8] Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N., 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanases in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews* 52: 305-317.
- [9] Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D., 1997. "Endo-beta-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties", *Journal of Biotechnology* 57: 151-166.
- [10] Derewenda, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Morosoli, R., Shareck, F., Kluepfel, D., Derewenda, Z.S., 1994. Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of

- the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. *Journal of Biological Chemistry* 269: 20811-20814.
- [11] Flint, H.J., Martin, J., McPherson, C.A., Daniel, A.S., Zhang, J.X., 1993. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and beta(1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the xynD gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Bacteriology* 175: 2943-2951.
- [12] Whistler, R.L., Masak, E., 1955. Enzymatic hydrolysis of xylan. *Journal of the American Chemical Society* 77: 1241-1243.
- [13] Frederick, M.M., Kiang, C., Frederick, J.R., Reilly P.J., 1985. Purification and characterization of endo-xylanases from *Aspergillus niger*, I. Two isozymes active on xylan backbones near branch points. *Biotechnology Bioengineering* 27: 525-532.
- [14] Belancic, A., Scarpa, J., Peirano, A., Diaz, R., Steiner, J., Eyzayuirre, J., 1995. *Penicillium purpurogenum* produces several xylanases: purification and properties of two of the enzymes. *Journal of Biotechnology* 41: 71-79.
- [15] Sa-Pereira, P., Sofia, A., Carvalho Costa-Ferreira, L.M., 2004. Thermostabilization of *Bacillus subtilis* CCMI. *Enzyme and Microbial Technology* 34: 278-282.
- [16] Xiong, H., Weymarn, N., von Leisola, M., Turunen, O., 2004. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Process Biochemistry* 39: 731-736.
- [17] Wang, S.L., Yen, Y.H., Shih, I.L., Chang, A.C. 2003. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and Microbial Technology* 33: 917-925.
- [18] Suchita, N., Mukesh, K., Ramesh, C.K. 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology* 99 (5): 1252-1258.
- [19] Fengxia, L., Mei, L., Zhaoxin, L., Xiaomei, B., Haizhen, Z., Yi, W., 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresource Technology* 99: 5938-5941.
- [20] Stewart, E.J., Aslund, F., Beckwith, J., 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins, *EMBO Journal* 17: 5543-5550.
- [21] Messner, P. 2009. Prokaryotic protein glycosylation is rapidly expanding from curiosity to ubiquity. *ChemBiochem* 10: 2151-2514.
- [22] Teng, C., Jia, H., Yan, Q., Zhou, P., Jiang, Z., 2011. High-level expression of extracellular secretion of a β -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*. *BioresourceTechnology* 102: 1822-1830.
- [23] Juturu, V., Wu J.C. 2012. Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnology Advances* 30: 1219-1277.
- [24] Jia, H., Fan, G., Yan, Q., Liu, Y., Yan, Y., Jiang, Z., 2012. High-level expression of a hyperthermostable *Thermotoga maritima* xylanase in *Pichia pastoris* by codon optimization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 78: 72-77.
- [25] Li, Y., Zhong, K., Hu, A., Liu, D., Chen, L., Xu, S. 2015. High-level expression and characterization of a thermostable xylanase mutant from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 108: 90-96.
- [26] Nevalainen, K.M.H., Te'o, V.S.J., Bergquist, P.L. 2005. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* 23: 468-474.
- [27] Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 577-591.
- [28] Yegin, S., Fernandez-Lahore, M., Gama-Salgado, A. J., Guvenc, U., Goksungur, Y., Tari, C., 2011. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. *Applied Microbiology Biotechnology* 89: 949-960.
- [29] Aguilar, C. N., Gutiérrez-Sánchez, G., Rado-Barragán, P. A., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernandez, J. L., Contreras-Esquivel, J.C., 2008. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4 (4): 354-366,
- [30] Nagar, S., Mittal, A., Kumar, D., Kumar, L., Kuhad, R.C., Gupta, V.K., 2012. Hyper production of alkali stable xylanase in lesser duration by *Bacillus pumilus* SV-85S using wheat bran under solid state fermentation. *New Biotechnology* 28(6): 581-587.
- [31] Yegin, S., Sargin, S., Goksungur, Y., 2014. Bioprocess strategies for production of xylanase on agro-residual products with *Aureobasidium pullulans*. *New Biotechnology* 32: S62.
- [32] Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K.D., Steiner, W., Silvia Zupancic, S., 1996. Production of fungal xylanase. *Bioresource Technology* 58: 137-161.
- [33] Ncube, T., Howard, R.L., Abotsi, E.K., Jansen van Rensburg, E.L., Ncube, I., 2012. *Jatropha curcas* seed cake as substrate for production of xylanase and cellulase by *Aspergillus niger* FGSCA733 in solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products* 37: 118-123.
- [34] Shah, A.R., Madamwar, D., 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry* 40: 1763-1771.
- [35] Farani de Souza, D., Marques de Souza, C.G., Peralta, R.M., (2001). Effect of easily metabolizable sugars in the production of xylanase by *Aspergillus tamarii* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 36: 835-838.
- [36] Archana, A., Satyanarana, T., 1997. Xylanase production by thermophilic *Bacillus licheniformis* A99 in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 21: 12-17.
- [37] Gessesse, A., Mamo, G., 1999. High-level xylanase production by an alkaliphic *Bacillus* sp. using solid state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 68-72.
- [38] Gomes, D. J., Gomes, J., Steiner, W., 1994. Production of highly thermostable xylanase by a wild strain of thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and partial characterization of the enzyme. *Journal of Biotechnology* 37: 11-22.

- [39] Sugden, C., Bhat, M. K., 1994. Cereal straw and pure cellulose as carbon sources for growth and production of plant cell-wall degrading enzymes by *Sporotrichum thermophile*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 444-451.
- [40] Purkarthofer, H., Sinner, M., Steiner, W., 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and solid-state culture. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 677-682.
- [41] Singh, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bishnoi, N. R., 2009. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 48: 28-35.
- [42] Kumar, K.S., Manimaran, A., Permaul, K., Singh, S., 2009. Production of β -xylanase by a *Thermomyces lanuginosus* MC 134 mutant on corn cobs and its application in biobleaching of bagasse pulp. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107: 494-498.
- [43] Saha, S.P., Ghosh, S., 2014. Optimization of xylanase production by *Penicillium citrinum* xym2 and application in saccharification of agro-residues. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 188-196.
- [44] Adhyaru, D.N., Bhatt, N.S., Modi, H.A., 2014. Enhanced production of cellulase-free, thermo-alkali-solvent-stable xylanase from *Bacillus altitudinis* DHN8, its characterization and application in sorghum straw saccharification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 182-190.
- [45] Haapala, R., Linko, S., Parkkinen, E., Suominen, P., 1994. Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase by *Trichoderma reesei* immobilized on polyurethane foam. *Biotechnology Techniques* 8: 401-406.
- [46] Fontes, CMGA, Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Clarke, J.H., Prates, J.A.M., McKie, V.A., Nagy, T., Fernandes, T.H., Ferreira, L. M. A., 2000. A novel cell vibrio mixtus family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under noninducing conditions. *Microbiology* 146: 1959-1967.
- [47] Teplitsky, A., Shulami, S., Moryles, S., Shoham, G., 2000. Crystallization and preliminary X-ray analysis of an intracellular xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 56: 181-186.
- [48] Rodrigues, E.M.G., Tambourgi, E.B., 2001. Continuous extraction of xylanase from *Penicillium janthinellum* with reversed micelles using experimental design mathematical model. *Biotechnology Letters* 56: 765-766.
- [49] Chapla, D., Patel, H., Singh, A., Madamwar, D., Shah, A., 2012. Production, purification and properties of a cellulase-free thermostable endoxylanase from newly isolated *Paenibacillus* sp. ASCD2. *Annals of Microbiology* 62: 825-834.
- [50] Chanwicha, N., Katekaew, S., Aimi, T., Boonlue, S., 2015. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus* KKU-PN-I2-1 cultivated by solid-state fermentation. *Mycoscience* 56, 309-318.
- [51] Rizzatti, A.C.S., Jorge, J.A., Terenzi, H.F., Rechia, C.G.V., Polizeli, M.L.T.L., 2001. Purification and properties of a thermostable extracellular beta-D-xylanosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 156-160.
- [52] Cardoso, O.A.V., Filho, E.X.F., 2003. Purification and characterization of a novel cellulase-free xylanase from *Acrophialophora nainiana*. *FEMS Microbiology Letters* 223: 309-314.
- [53] Li, X.T., Jiang, Z.Q., Li, L.T., Yang, S.Q., Feng, W.Y., Fan, J.Y., Kusakabe, I., 2005. Characterization of a cellulase-free, neutral xylanase from *Thermomyces lanuginosus* CBS 288.54 and its biobleaching effect on wheat straw pulp. *Bioresource Technology* 96: 1370-1379.
- [54] Li, L., Tian, H., Cheng, Y., Jiang, Z., Yang, S., 2006. Purification and characterization of a thermostable cellulase-free xylanase from the newly isolated *Paecilomyces thermophila*. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 780-787.
- [55] Ninawe, S., Kapoor, M., Kuhad, R.C., 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology* 99: 1252-1258.
- [56] Jiang, Z., Cong, Q., Yan, Q., Kumar, N., Du, X., 2010. Characterisation of a thermostable xylanase from *Chaetomium* sp. and its application in Chinese steamed bread. *Food Chemistry* 120: 457-462.
- [57] Shrinivas, D., Savitha, G., Raviranjana, K., Naik, G.R., 2010. A Highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 2049-2057.
- [58] Knob, A., Carmona, E.C., 2010. Purification and characterization of two extracellular xylanases from *Penicillium sclerotiorum*: a novel acidophilic xylanase. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 162: 429-443.
- [59] Pal, A., Khanum, F., 2011. Purification of xylanase from *Aspergillus niger* DFR-5: Individual and interactive effect of temperature and pH on its stability. *Process Biochemistry* 46: 879-887.
- [60] Hung, K.S., Liu, S.M., Tzou, W.S., Lin, F.P., Pan, C.L., Fang, T.Y., Sun, K.H., Tang, S.J. 2011. Characterization of a novel GH10 thermostable, halophilic xylanase from the marine bacterium *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NT0U1. *Process Biochemistry* 46: 1257-1263.
- [61] Silva, L.A.O., Terrasan, C.R.F., Carmona, E. C., 2015. Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma inhamatum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.06.001>
- [62] Winterhalter, C., Liebel, W., 1995. Two extremely thermostable xylanases of the hyperthermo philic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1810-1815.
- [63] Lin, J., Ndlovu, L.M., Singh, S., Pillay, B., 1999. Purification and biochemical characteristics of β -D-xylanase from a thermophilic fungus, *Thermomyces*

- lanuginosus* SSBP. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30: 73-79.
- [64] Driss, D., Bhiri, F., Elleuch, L., Bouly, N., Stals, I., Miled, N., Blibech, M., Ghorbel, R., Chaabouni, S.E., 2011. Purification and properties of an extracellular acidophilic endo-1,4- β -xylanase, naturally deleted in the "thumb", from *Penicillium occitanis* Pol6. *Process Biochemistry* 46: 1299-1306.
- [65] Gessesse, A., Mamo, G., 1998. Purification and characterization of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Micrococcus* sp. AR-135. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 210-214.
- [66] Li, X.L., Zhang, Z.Q., Dean, J.F.D., Eriksson, K.E.L., Ljungdahl, L.G., 1993. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3212-3218.
- [67] Sargın, S., Öngen G., 2003. Kanatlı yemi katkısi olarak kullanılan ksilanaz enziminin katı kültür fermantasyon yöntemi ile üretiminde ölçek büyütme çalışmaları. *E.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi* 40(3): 145-152.
- [68] Campenhout, L.V., Somers, I., Van de Craen, S., Adams, C., 2003. In vitro test to evaluate protein degradation by feed enzymes: Recent Advances in Enzymes in Grain Processing, Edited by C.M Courtin, W.S., Veraverbeke, J.A., Delcour, Leuven.
- [69] Poldermans, B., Schoppnik, P., 1999. Controlling the baking process and product quality with enzymes. *Cereal Foods World* 44: 132-135.
- [70] Dhiman, S.S., Garg, G., Sharma, J., Mahajan, R., Methoxy, R., 2011. Characterization of statistically produced xylanase for enrichment of fruit juice clarification process. *New Biotechnology* 28(6): 746-755.
-