

Topraktan İzole Edilen *Streptomyces* sp.'den Ksilanaz Üretimi ve Karakterizasyonu

Barış ENEZ¹, Sema AGÜLOĞLU FİNCAN²

ÖZET: Bu çalışmada topraktan izole edilen *Streptomyces* sp.'nin izolasyonu, tanımlanması ve optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. *Streptomyces* sp.'nin optimum şartları belirlenerek optimum 35 °C, pH 7.0 ve 52. saat olarak maksimum üreme gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Ksilanaz üretiminin en iyi olduğu koşullar ise 35 °C, pH 7.0 ve 72. saat olarak belirlenmiş ve en iyi enzim aktivitesine 40°C ve pH 7.0'de ulaşılmıştır. Enzim aktivitesi üzerine metallere etkisi araştırıldığında Zn²⁺, Hg²⁺ ve Fe²⁺ elementlerinin güçlü bir şekilde enzim aktivitesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Kullanılan deterjanlardan Triton X-100 aktiviteyi artırırken SDS ise güçlü şekilde inhibe ettiği tespit edilmiş ve enzim aktivitesinin; 35°C-45°C aralıklarında da 1 saat boyunca stabil kaldığı, pH 6.0, ve 7.0 de 1 saat sonunda %100 korunduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Streptomyces* sp., ksilanaz, izolasyon, karakterizasyon, üretim

Production and Characterization of Xylanase from *Streptomyces* sp. which is Isolated from Soil

ABSTRACT: In this work, *Streptomyces* sp., was isolated from soil, identified and optimized. Optimum conditions of *Streptomyces* sp. were determined and it is observed that maximum reproduction is achieved at 35 °C, pH 7.0 and 52 hours. It was also revealed that the best conditions for producing xylanase was 35 °C, pH 7.0 and 72 hours and the best enzyme activity was achieved at 40 °C and pH 7.0. The effect of metals on enzyme activity was investigated, and it was observed that enzyme activity was strongly inhibited by Zn²⁺, Hg²⁺ and Fe²⁺. It was found that Triton X-100, one of the detergents was used, boosts activity, while other one, SDS, inhibits strongly and it is revealed that, enzyme activity remains stable for 1 hour at 35°C, 40°C and 45°C and also it is preserved 100% after 1 hour at pH 6.0 and pH 7.0.

Keywords: *Streptomyces* sp, xylanase, isolation, characterization, production

¹ Bingöl Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Veteriner Sağlığı Bölümü, Bingöl, Türkiye

² Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Sema AGÜLOĞLU FİNCAN, semaagul@dicle.edu.tr

GİRİŞ

Tarihsel gelişim açısından bakıldığında enzimlerin çok farklı kaynaklardan elde edildiği görülmektedir. Bunlar bitkisel, hayvansal ya da endüstriyel anlamda ihtiyacı karşılayabilen mikrobiyal kaynaklı enzimlerdir (Gupta et al., 2003). Bugüne kadar yaklaşık 2500 farklı enzim tanımlanmış ve bunların ancak %10'u ticari alanda kullanım için kendilerine yer bulmuşlardır. Bu %10 içinde 25 tanesi nişasta sanayi ile deterjan katkı maddesi olarak kullanılmış olup, ticari alanda yararlanılan bütün enzimlerin %80'ini oluşturmaktadırlar (Woodley, 2000). Bitkisel ve hayvansal enzimlerin endüstriyel ihtiyacı karşılayamaması, bu alandaki ilginin giderek artan bir şekilde mikrobiyal enzimlere yönelmesini sağlamıştır. Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı ideal bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao et al., 1998). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların faaliyetleri sonucunda üretilmektedir (Godfrey and West, 1996).

Ksilanaz, ksilandaki β -1,4-D-ksilozidik bağlarını zincirin iç kısımlarından hidrolizle kıran glikosidazlardır (o-glikozid hidrolazlar; E.C. 3.2.1). Bunlar, hücre metabolizması için karbon kaynağının sağlanmasında ve bitki patojenlerince bitki hücresinin enfeksiyonunda gerekli olan ve doğada yaygın bir enzim grubudur (Collins et al., 2005).

Günümüzdeki biyoteknolojik prosesler belli başlı organizmalar tarafından yürütülmektedirler. Bu sık kullanılan organizma türlerinden bir tanesi de *Streptomyces*' lardır. *Streptomyces* türleri funguslar gibi substrat miseli havasal misel ve spor oluşumunu içeren kompleks bir hayat döngüleri vardır. *Streptomyces*' lar birçok hücre dışı metabolit sentezleyebilmektedirler.

Bu metabolitler arasında antibiyotikler, pigmentler gibi ikincil metabolitler, hücre dışı enzimler ve proteinler gelmektedir. Hücre dışı enzimlerin salgılanması ile *Streptomyces*' lar, morfolojik farklılaşma, antibiyotik sentezinin, tamamlanması, pigmentasyon, hücre dışındaki rekalsitrant polimerik materyalin sindirimi gibi birçok metabolik fonksiyonu yerine getirebilmektedir (Duran, 2011).

MATERYAL VE YÖNTEM

Streptomyces sp.'in Biyokimyasal Testleri

İzole edilen mikroorganizma %0.5'lik ksilan içeren nutrient agarda üretilerek biyokimyasal testleri yapılmıştır.

Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Streptomyces sp. makam dağından alınan toprak örneklerinden izole edilerek Ref-Gen tarafından kısmi olarak 16S rRNA analizi yapılmıştır (METU Teknokent/Ankara). Mikroorganizma pH 7.0, sıcaklık 35°C ve % 0.5 ksilan içeren Nutrient Broth ortamında 72 saat üretilmiştir.

Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry metoduna göre yapılmıştır. (Lowry et al., 1951)

Ksilanaz Aktivite Tayini

Ksilanaz aktivite tayini Miller (1959) DNS metodunun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Aktivite tayini için enzim çözeltisi ile %0.5lik ksilan çözeltisi 40 °C de 45 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için 3,5 DNS ilave edilmiş ve 5 dakika kaynar su banyosunda bekletilmiştir. 535 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.

Streptomyces sp. ve Ksilanaz Üretimi Üzerine Sıcaklık, pH ve inkübasyon

Süresinin Etkisinin Belirlenmesi

100 ml'lik erlenlerde 25 ml sıvı besi yerleri hazırlanarak her birine 2 ml bakteri ekimi yapılmıştır. 25-55 °C sıcaklık aralıklarında bakteri ve enzim üretiminin optimum değerlerin belirlemek için 120 rpm'de çalkalamalı su banyosunda bekletilmiş ve spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Hazırlanan %0.5 ksilan içeren NB ortamında pH 4.0'ten başlayarak 0.5'lik artışlarla pH 10.0'a kadar farklı pH'larda enzim üretimi ve bakteri üretimi gerçekleştirilmiştir.

İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi ve enzim üretimine etkisi için; bakteri NB besi yerinde

(pH 7.0) ve 35 °C'de üretilerek 4-96 saatleri arasında her 4 saatte bir örnek alınarak spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapılmıştır.

Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Sıcaklık ve pH'nın ksilanaz aktivitesine etkisini araştırırken enzim olarak, NB besi ortamında üretilen bakteri kültürünün santrifüj edilmesiyle elde edilen üst sıvı kullanılmıştır.

Sıcaklık etkisi için; 25°C'den 5°C artan sıcaklık aralıklarıyla 55°C'ye kadar ksilanaz aktivitesi ölçüldü ve rölatif enzim aktivitesi saptanmıştır. pH etkisi için; substrat olarak kullandığımız ksilan %0,5'lik olacak şekilde sırasıyla sitrik asit, Tris-HCl ve karbonat/bikarbonat tamponları içerisinde ayrı ayrı hazırlanmıştır. Daha sonra ksilanaz aktivite tayini yapılarak rölatif enzim aktivitesi saptanmıştır.

Enzim Aktivitesi Üzerine Bazı Metal Maddelerin ve Deterjanların Etkisi

Enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisini saptamak için CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, HgCl₂, MnCl₂, ve FeCl₂ dan 50 mM'lık stok çözeltilerinden toplam hacimde (150 µl) 1.5 mM konsantrasyonu olacak şekilde 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda hazırlandı. Enzim aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisini araştırmak için % 0.5 oranında SDS, Tween-40, Tween-80, TritonX-100 kullanıldı. Bu deterjanlar 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda hazırlanmıştır

Sıcaklık ve pH'nın Ksilanaz Stabilitesine etkisi

Ksilanaz enziminin sıcaklık stabilitesi saptanması için 35°C, 40°C ve 45°C de sadece enzim kullanılarak 15-120 dakika arasında inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ön inkübasyon sonrası enzim substrat karışımı ile kalan enzim aktivitesini saptamak için enzimin aktivite gösterdiği optimum sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır.

pH stabilitesinin saptanması için 0.1 M Sitrik Asit, 0.1 M. Tris- HCl, 0.1 M karbonat / bikarbonat

hazırlandı. Enzim, farklı tamponlarla 180 dakika ön inkübasyon bırakılmıştır. Ön inkübasyon sonrasında substrat eklenerek kalan aktivite tayini deney koşulları altında ölçülmüştür.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Biyokimyasal Testler ve Mikroorganizmanın Tanımlanması

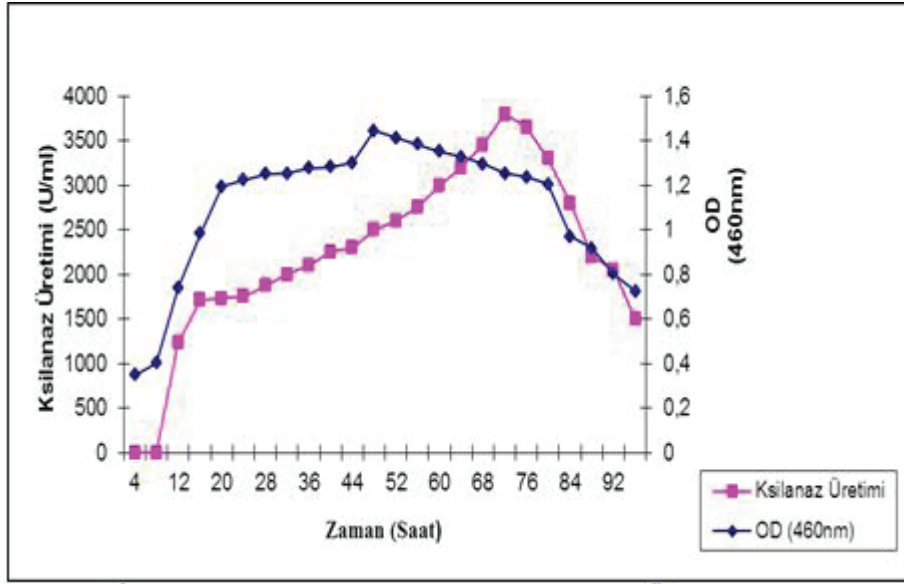
Yapılan biyokimyasal testler sonucunda mikroorganizmanın çizelge 1 de gösterildiği gibi gram pozitif, basil (çubuk) şeklinde ve ksilan ortamında ksilanaz enzimi ürettiği belirlenmiştir.

Ref-Gen tarafından kısmi olarak 16S rRNA analizi yapılan bakterinin *Streptomyces* sp. olduğu tespit edilmiştir (METU Teknokent/Ankara).

```
CCCTCACTCGCAGTCCACATTCGACAGCTCCC
TCCCACAAGGGGTTGGGCCACCGGCTTCGGGT
GTCACCGACTTTCGTGACGTGACGGGCGGTGT
GTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCA
ATGCTGATCTGCGATTACTAGCAACTCCGACTT
CATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAAC
TGAGACCGGCTTTTTGAGATTGCTCCGCCTC
ACGGCATCGCAGCTCTTGTACCGGCCATTGTA
GCACGTGTGCAGCCCAAGACATAAGGGGCATG
ATGACTTGACGTGTCGTCACCTTCCCTCCGAG
TTGACCCCGGCGGTCTCCTGTGAGTCCCATCA
CCCCGAAGGGCATGCTGGCAACACAGGACAA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCAACA
TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAC
CACCTGTATACCGACCACAAGGGGGGCACTAT
CTCTAATGCTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGG
TAAGGTTCTTCGCGTT...
```

Bakteri ve Ksilanaz Üretimi Üzerine İnkübasyon Süresinin, Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

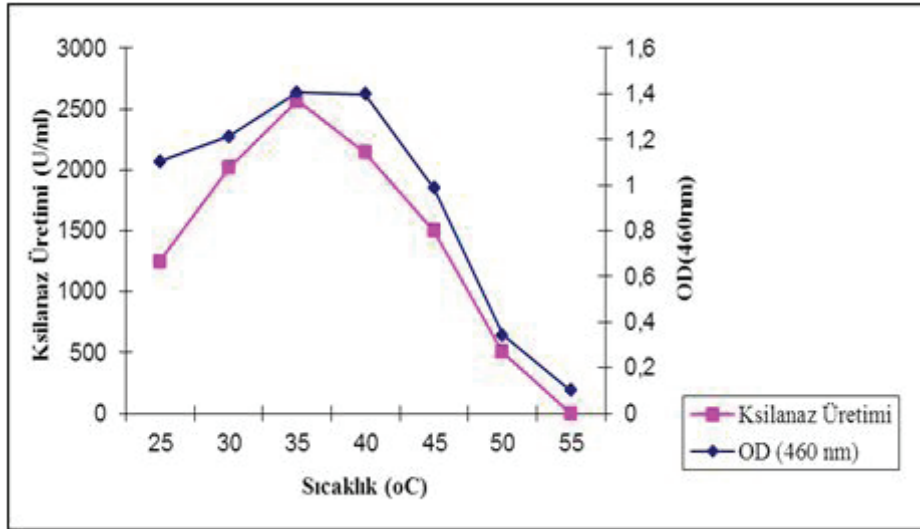
Farklı inkübasyon sürelerinin enzim üretimi ve *Streptomyces* sp.'nin üremesinin etkisini belirlemek için 4-96. saatleri arasındaki analiz sonucunda şekil 1 de görüldüğü gibi maksimum enzim üretiminin 72.saat ve üremenin ise 52 saatte olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. İnkübasyon süresinin Bakteri ve Ksilanaz Üretimine Etkisi

Sıcaklığın etkisini belirlemek için; 5 °C'lik artışla 25 °C 'den 55 °C 'ye kadar % 0,5 ksilanlı NB besi yerinde (pH 7.0) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda maksimum enzim

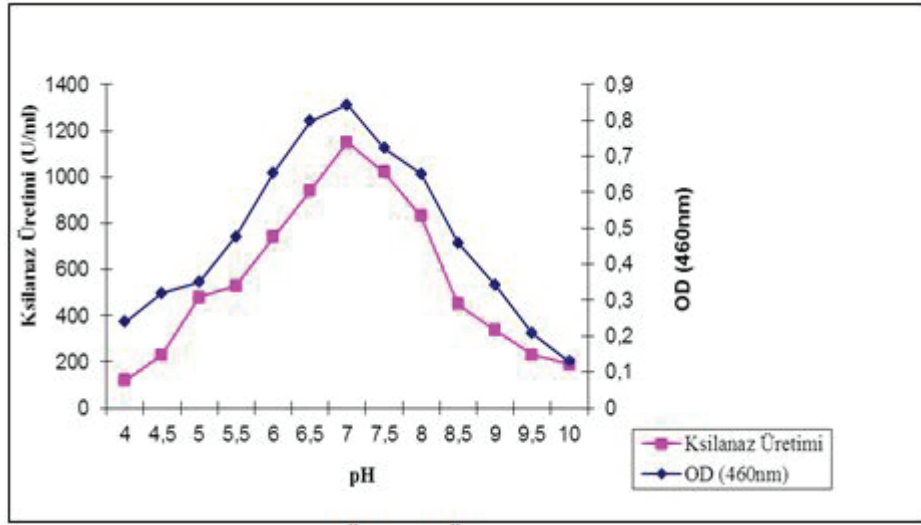
üretimi ve üremenin 35 °C'de olduğu belirlendi. Şekil 2'ye bakıldığında artan sıcaklıklarda hem bakteri üremesinin hem de enzim üretiminin giderek azaldığı görülmüştür.



Şekil 2. Bakteri ve Enzim Üretimi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Farklı pH'larda hazırlanan besi yerlerine ekimi yapılan bakterinin maksimum enzim üretimi ve optimum üremesinin pH 7.0 da olduğu görülmüştür. Şekil 3'te belirtildiği üzere artan pH'ların bakteri ve enzim üretimini olumsuz etkilediği belirlenmiştir. *Streptomyces* suşlarından üretilen ksilanaz'ın optimum aktivite gösterdiği değerler literatürlerde değişik

şekillerde (72 saat, pH:7.0 ve 30 °C; 120 saat, pH:7.0 ve 37 °C; 120 saat, pH:6.5 ve 28 °C; 96 saat, pH:6.5 ve 50 °C; 68 saat, pH:7.0, 36 °C; 96 saat, pH:7.0 ve 40 °C) yer almıştır. Sanjivkumar ve arkadaşları, 2017; Maheswari ve Chandra, 2000; Pradeep ve arkadaşları, 2013; Boonchuay ve arkadaşları, 2016; Lv ve arkadaşları, 2008; Chi ve arkadaşları, 2013).

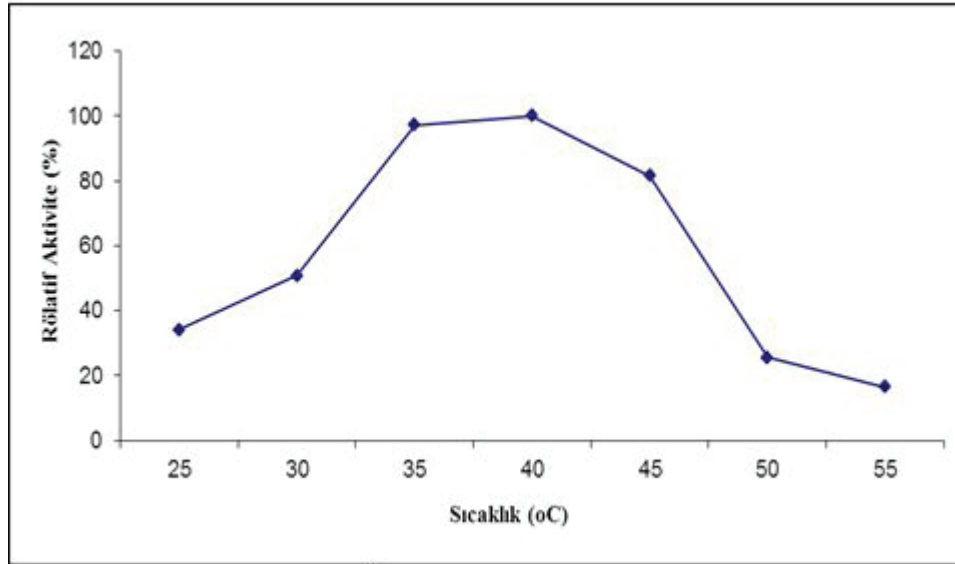


Şekil 3. Bakteri ve Enzim Üretimi Üzerine pH'nın Etkisi

Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklık ve pH'nın Etkisi

Optimum koşullarda üretilen mikroorganizma maksimum ksilanaz salgılandığı 35 °C, pH 7.0 ve 72. saat

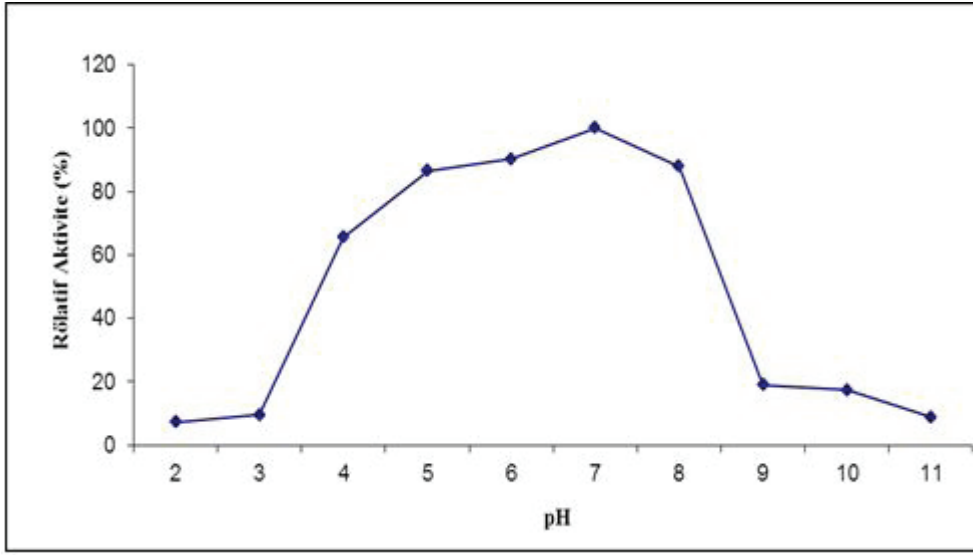
sonrasında elde edilen enzim üst sıvısından 25-55 °C aralığında yapılan sıcaklık tespitinde enzimin maksimum sıcaklık aktivitesinin 40 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Ksilanaz Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Aynı ortam koşullarında pH 2-11.00 aralığında yapılan incelemede ksilanaz aktivitesinin en fazla

pH 7.0 da olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5).

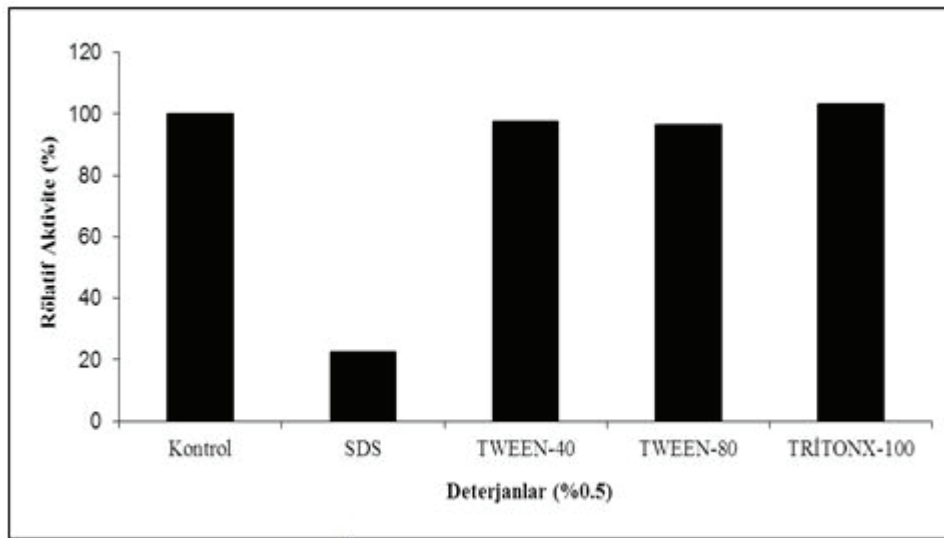


Şekil 5. Ksilanaz Aktivitesi Üzerine pH Etkisi

Yapılan araştırmada en yüksek enzim aktivitesi pH 7.0 ve 40 °C'de tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda, Sanjivkumar et al., (2017) *Streptomyces olivaceus*'ten elde ettikleri ksilanazın en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklığın 40 °C de; Chi et al., (2013) *Streptomyces thermocarboxyodus*'tan üretilen ksilanazın ise 65 °C olduğunu belirlemişlerdir. *Streptomyces* türlerinden elde edilen ksilanazların optimum pH aralıkları 5.0-7.0 arasında değişmektedir (Chi et al., 2013; Bajaj ve Singh, 2010; Ninawe et al., 2008; Georis et al., 2000).

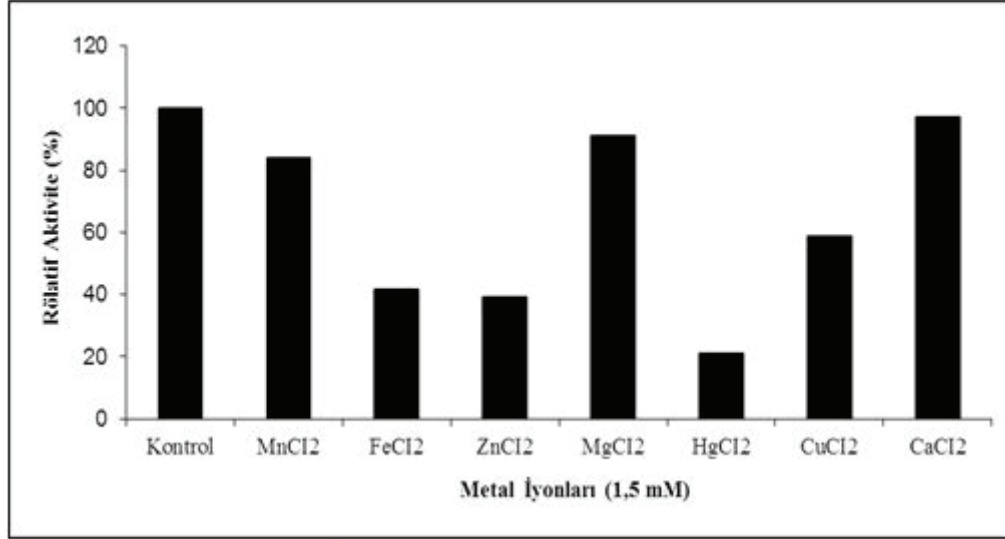
Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjan ve Metallerin Etkisi

Uygun şartlarda üretilen mikroorganizma'dan elde edilen ksilanaz aktivitesi üzerine deterjan etkisi incelendiğinde deterjanlardan kontrole göre kalan enzim miktarları; SDS %22, Tween-40 % 98, Tween-80 % 96 ve TritonX-100 %103 olarak belirlenmiştir. Triton X-100 aktiviteyi artırırken SDS ise güçlü şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Enzim Aktivitesi Üzerine Deterjanların Etkisi

Metal etkisi araştırıldığında ise Zn^{2+} (% 61) , Hg^{2+} (% 79)ve Fe^{2+} (% 58) güçlü bir şekilde enzim aktivitesini inhibe ettiği, Ca^{2+} ise kontrole yakın bir değer gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 7).



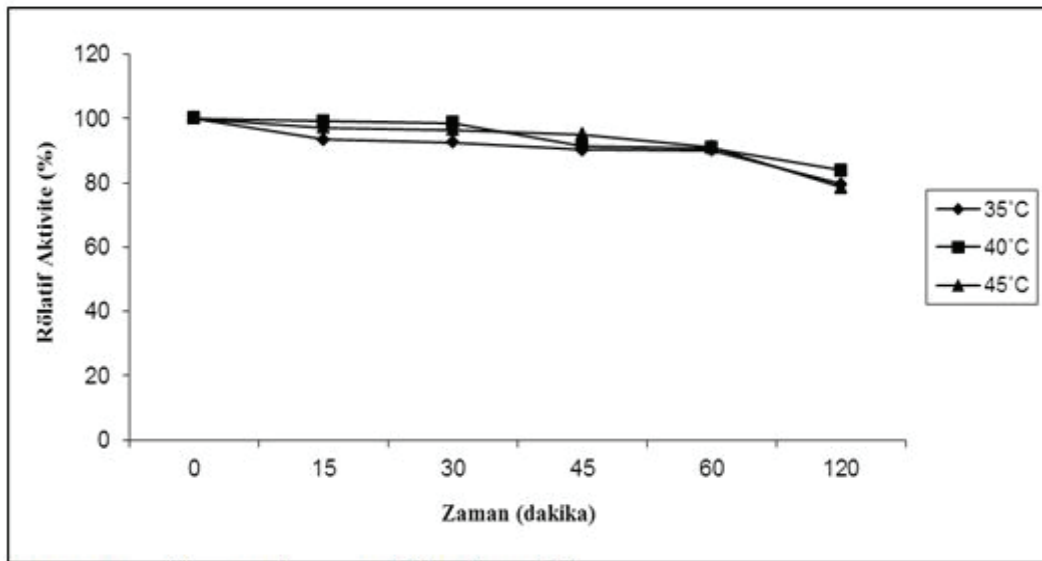
Şekil 7. Enzim Aktivitesi Üzerine Metallerin Etkisi

Adigüzel ve Tunçer, (2016) yaptıkları çalışmada SDS, Mg^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} ksilanaz aktivitesini inhibe ettiğini; Boonchuay et al., (2016) ksilanaz aktivite üzerine denedikleri metal iyonları ve kimyasal reaktiflerden özellikle SDS ve Hg^{2+} 'in enzim aktivitesini tamamen inhibe ettiğini, Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} 'un ise orta düzeyde enzim inhibisyonuna neden olduğunu belirlemişlerdir. Paradeep et al., (2013) Fe^{3+} , Zn^{2+} ,

Cu^{2+} ve SDS'nin ksilanaz aktivitesi üzerine inhibe etkisi gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Sıcaklık ve pH'nın Ksilanaz Stabilitesine etkisi

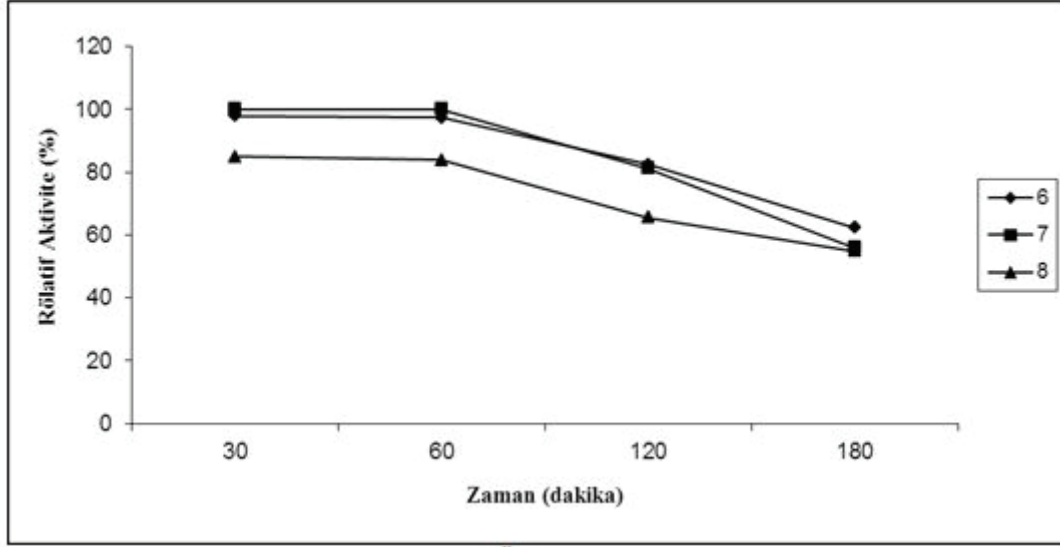
Enzimin sıcaklık stabilitesi incelendiğinde ksilanaz enzimi 35°C, 40 °C ve 45°C sıcaklıklarında 1 saat boyunca stabil kaldığı ancak giderek stabilitesini kaybettiği görülmüştür (Şekil 8).



Şekil 8. Sıcaklığın Ksilanaz Stabilitesine Etkisi

Yapılan araştırmada enzimin pH stabilitesi incelenmiştir. pH 6.0 ile 7.0 değerlerinde 1 saat boyunca

enzim aktivitesinin %100 korunduğu tespit edilmiştir (Şekil 9).



Şekil. 9. pH'nın Ksilanaz Stabilitesine Üzerine Etkisi

Chi et al., (2013) *Streptomyces thermocarboxydus*' tan üretilen ksilanazın 45°C ve 55°C de stabilitesinin koruduğunu, pH stabilitesinin ise pH 5.0 ve 6.0 olduğunu belirlemişlerdir. Nascimento et al., (2002) *Streptomyces* sp. strain AMT-'ten üretilen enzimin 55°C ve 65°C sıcaklıklarında stabil kaldığını buna ek olarak ksilanazın pH stabilitesinin ise pH 6.0 da stabil kaldığını bulmuşlardır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar diğer araştırmacıların bulgularıyla uyum içindedir.

SONUÇ

Streptomyces sp.'den ksilanaz üretimi SmF (Submerged Fermentation=Derin Kültür Tekniği) işlemi ile gerçekleştirilmiştir. pH, sıcaklık ve inkübasyon

süresi gibi farklı parametreler ile üretim koşulları optimize edilmiştir. Optimal üretim koşulları sırasıyla; 72 saat, pH:7.0 ve 35 °C olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda topraktan izole edilen bakterilerden üretilen ksilanazın daha önceki çalışmalarda sonuçlara göre genel olarak sıcaklık ve pH'nın uygunluk gösterdiği, inkübasyon süresinin ise daha kısa sürede olmasından dolayı ekonomik yönden büyük avantaj sağladığı görülmüştür. Belirli metal ve deterjanların ksilanaz aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde; enzim aktivitesinin Mn^{+2} ve Mg^{+2} ile orta şekilde; Hg^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+3} ve Zn^{+2} güçlü bir şekilde inhibe edildiği tespit edilmiştir. Kullanılan deterjanlardan ise SDS'nin ksilanaz aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

Adigüzel AO, Tunçer M, 2016. Production, Characterization and Application of a Xylanase from *Streptomyces* sp. AOA40 in Fruit Juice and Bakery Industries. Food Biotechnology, 30 (3): 189–218.

Bajaj BK, Singh NP, 2010. Production of xylanase from an alkali tolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. Applied Biochemistry and Biotechnology, 162:1804–18.

Boonchuay Pinpanit, Takenaka S, Kuntiyac A, Techapunc C, Leksawasdic N, Seesuriyachanc P, Chaiyasoc T, 2016. Purification, characterization, and molecular cloning of the xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and its application to xylooligosaccharide production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 129, 61–68.

Chi WJ, Lim JH, Park DY, Park JS, Hong SK, 2013. Production and characterization of a thermostable endo-type β -xylanase produced by a newly-isolated *Streptomyces thermocarboxydus* subspecies MW8 strain from Jeju Island. Process Biochemistry, 48: 1736–1743.

- Collins T, Gerday C, Feller G, 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1): 3–23.
- Duran M, 2011. Lakkaz Üreticisi *Streptomyces* Türlerinin Katı Kültür Performanslarının Karşılaştırılması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans.
- Godfrey, T, West S, 1996. Introduction to Industrial Enzymology. (T.Godfrey and S. West editör) *Industrial Enzymology*, 2nd Edition, Stockton Pres, New York.
- Georis J, Giannotta F, Buyl ED, Granier B, Frere JM, 2000. Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enzyme and Microbial Technology*, 26:178–86.
- Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B, 2003. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 1-18.
- Lowry OH, Roserbrough NJ, Farr AL, Randall R, 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lv Z, Yang J, Yuan H, 2008. Production, purification and characterization of an alkaliphilic endo- β -1,4-xylanase from a microbial community EMSD5. *Enzyme and Microbial Technology*, 43: 343–348.
- Maheswari MU, Chandra TS, 2000. Production and potential applications of a xylanase from a new strain of *Streptomyces cuspidosporus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 257–263.
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars, *Analytical Chemistry*, 31: 426–428
- Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Gírio FM, Bonc EPS, Amaral-Collaço MT, 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*, 31: 549–555.
- Ninawe S, Kapoor M, Kuhad RC, 2008. Purification and characterization of extra-cellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresource Technology*, 99:1252–8.
- Pradeep GC, Choi YH, Choia YS, Seong CN, Choc SS, Leed HJ, Yoo JC, 2013. A novel thermostable cellulase free xylanase stable in broad range of pH from *Streptomyces* sp. CS428. *Process Biochemistry*, 48: 1188–1196.
- Rao MB, Tanksale AM, Gathe MS, Deshpande W, 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 597–635.
- Sanjivkumar M, Silambarasan T, Palavesam A, Immanuel G, 2017. Biosynthesis, purification and characterization of β -1,4-xylanase from a novel mangrove associated actinobacterium *Streptomyces olivaceus* (MSU3) and its applications. *Protein Expression and Purification*, 130: 1–12.
- Woodley JM, 2000. Advances in Enzyme Technology-UK Contributions. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, 70: 93–108