

**OPTIMALISASI PERTUMBUHAN BAKTERI XILANOLITIK
DARI KETAM (*Eriocheir sinensis*)**Chusnul Hanim¹**INTISARI**

Enzim xilanase merupakan enzim kompleks yang tersusun dari endo- β -D-1,4-xilanase (EC 3.2.1.8) dan β -D-xilosidase (EC 3.2.1.37), menghidrolisis xilan menjadi xilo-oligosakarida dan xilosa. Enzim xilan tersebut dapat dihasilkan oleh mikrobia aerob dan anaerob baik yang mesofilik maupun termofilik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi optimum bagi pertumbuhan bakteri xilanolitik yang diisolasi (dari ketam *E. sinensis*). Isolat xilanolitik diisolasi dari ketam menggunakan metode Hungate dalam medium pertumbuhan anaerob dengan xilan sebagai substrat. Salah satu isolat bakteri yang mempunyai aktivitas tertinggi dilakukan optimalisasi pertumbuhannya. Optimalisasi pertumbuhan isolat bakteri xilanolitik dilakukan pada pH (6 - 11,5), suhu inkubasi (30 - 60°C) dan macam substrat (xilan, xilosa, glukosa dan selulosa). Kultur hasil pertumbuhan tersebut disentrifugasi dan supernatan yang diperoleh diuji aktivitas enzim endo- β -D-1,4-xilanase untuk mengetahui kondisi optimum bagi pertumbuhan bakteri xilanolitik yang menghasilkan aktivitas enzim tertinggi. Dari hasil pengamatan diketahui bahwa hasil isolasi bakteri xilanolitik dari ketam diperoleh isolat yang mempunyai aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-xilanase. Isolat bakteri tersebut bersifat anaerobik, Gram-positif dan berbentuk bulat. Hasil optimalisasi pertumbuhan bakteri tersebut diketahui mempunyai aktivitas xilanolitik tertinggi pada pH 11, suhu 35°C dan pada substrat xilosa.

(Kata kunci : Optimalisasi pertumbuhan, Xilanolitik, Ketam).

Buletin Peternakan 27 (4) : 168 - 176, 2003

¹ Fakultas Peternakan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

GROWTH OPTIMALIZATION OF XYLANOLYTIC BACTERIAL FROM CRAB (*Eriocheir sinensis*)

ABSTRACT

Xylanases, including endo- β -D-1,4-xylanase (EC 3.2.1.8) and β -D-xylosidase (EC 3.2.1.37), are complex enzyme that hydrolyse xylan to xylo-oligosaccharide and xylose. The xylan degrading enzyme can be produced by aerobic or anaerobic mesophilic or thermophilic microbes. The objectives of this study were to evaluate optimum growth conditions of xylanolytic bacterial. Xylanolytic isolates were isolated from crabs by using Hungate method, grown in a medium using oat spelt xylan as substrate under anaerobic condition, and screened for the highest enzymatic activity. Growth optimalization was conducted at different pH of 6 to 11.5 different temperature of 30 to 60 °C and type of substrates (xylan, xylose, glucose and cellulose). The culture supernatant was separated by centrifugation and analysed on endo- β -D-1,4-xylanase activity. The results showed that xylanolytic bacterial from crabs had specific activity of endo- β -D-1,4-xylanase. This isolate was anaerobic Gram positive and rod shape. It was also found that xylanolytic bacterial having optimum growth condition at pH 11, temperature 35°C and xylose as substrat.

(Key words : Growth optimalization, Xylanolytic bacterial, Crab).

Pendahuluan

Xilanase banyak terdapat di alam dan dapat diketemukan pada beberapa jenis mikrobia, hal ini karena telah diketahui mampu menghasilkan enzim pemecah xilan (Horikoshi, 1996; Gessesse, 1998) yaitu bakteri dari laut maupun darat, bakteri rumen, jamur, ganggang laut, protozoa, serangga dan biji-bijian (Sunna and Antranikian, 1997; Kulkarni *et al.*, 1999). Seperti dikatakan oleh La Granga *et al.* (1996) beberapa spesies bakteri dan jamur dapat menggunakan xilan sebagai sumber karbon karena mampu menghasilkan xilanase. Adanya aktivitas enzim xilanase penting untuk menjaga alur karbon dalam siklus karbon dan pertumbuhan biomassa mikrobia di alam (Wong *et al.*, 1988). Menurut Kulkarni *et al.* (1999) sebagian besar bakteri dan jamur mensekresikan xilanase ekstraselular yang akan memecah hemiselulosa menjadi xilosa sehingga organisme tersebut dapat menggunakan xilan untuk pertumbuhannya. Dilaporkan oleh Barnes (1980) bahwa di dalam lambung ketam terdapat selulase dan khitinase untuk mencerna makanan berserat. Ketam adalah dekapoda air tawar dan

termasuk herbivora yang memakan ganggang dan tanaman, namun kadang-kadang juga makan bangkai.

Xilanase mikrobia umumnya mempunyai pH optimum asam atau netral, tetapi ada juga yang bersifat alkali (Gupta *et al.*, 2000). Enzim pemecah xilan dihasilkan oleh jamur dan bakteri yang bersifat aerobik dan anaerobik baik mesofilik maupun termofilik (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995; Bhat and Hazlewood, 2001). Menurut Kulkarni *et al.* (1999) enzim ini diekspresikan secara optimal pada akhir fase eksponensial. Faktor yang mempengaruhi produksi enzim xilanolitik adalah substrat dan komposisi medium. Parameter bioproses lain yang dapat mempengaruhi aktivitas dan produktivitas xilanase selama proses fermentasi adalah pH, temperatur dan agitasi. Mekanisme yang mengatur pembentukan enzim ekstraselular dengan sumber karbon yang terdapat dalam medium dipengaruhi oleh kemampuan prekursor untuk sintesis protein. Xilanase diproduksi oleh beberapa jenis bakteri dan jamur melalui sistem induksi yang merupakan fenomena kompleks dan aras tanggapan untuk masing-masing induser bervariasi pada setiap organisme. Turunan substrat dan hasil akhir

proses enzimatik sering mempunyai peran positif dalam induksi xilanase, tetapi kadang juga dapat menjadi inhibitor pada konsentrasi tinggi. Untuk memperbaiki produktivitas xilanase maka perlu dilakukan optimalisasi pertumbuhan dan parameter induksi dalam proses fermentasi *fed-batch* (Walsh and Bergquist, 1997).

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kondisi pertumbuhan optimum bagi mikrobia xilanolitik berdasarkan aktivitas xilanase yang dihasilkan selama pertumbuhannya, sehingga akan diketahui kondisi optimum pertumbuhan yang menghasilkan aktivitas xilanase tertinggi.

Materi dan Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri xilanolitik yang diisolasi dari ketam yang diperoleh dari daerah Seyegan Sleman. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biokimia Nutrisi Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan UGM. Bahan-bahan yang diperlukan meliputi: bahan-bahan untuk pembuatan medium, uji aktivitas endo- β -1,4-xilanase dan uji protein. Peralatan yang diperlukan untuk isolasi mikrobia xilanolitik yaitu tabung Hungate, inkubator, otoklaf, *laminar air flow* dan pH meter. Pada uji aktivitas endo- β -1,4-xilanase digunakan *water bath* untuk proses inkubasi kemudian hasil uji aktivitas enzim dan protein dibaca menggunakan spektrofotometer UV-VIS.

Pembuatan medium

Komposisi medium pengkayaan menurut Omelianski (1902) *cit.* Skinner (1971) yaitu 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g K_2HPO_4 ; 2 g CaCO_3 ; 10 ml NaCl 1%; 10 g xilan *oat spelt*; 0,1% resazurin; 0,5% cystein HCl dan 1.000 ml dH_2O . Komposisi medium pertumbuhan terdiri atas: 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2 g NaCl; 7 g K_2HPO_4 ; 0,1% resazurin; 2 % xilan *oat spelt*; 1 g ekstrak khamir; 0,5% cystein HCl dan 1.000 ml

dH_2O . Medium yang telah tersedia ditempatkan pada pH 7 dan dibuat kondisi anaerob dengan mengalirkan gas CO_2 ke dalamnya. Selanjutnya medium tersebut disterilkan dengan autoclave pada suhu 121°C dan tekanan 15 atm selama 15 menit. Untuk pembuatan medium padat ditambahkan 1,8% agar ke dalam medium.

Penyiapan sumber mikrobia

Ketam segar digerus dan diambil ekstraknya dengan disentrifugasi pada 3.200 g selama 20 menit untuk digunakan sebagai sumber mikrobia xilanolitik. Ekstrak tersebut ditambahkan ke dalam medium pengkayaan sebanyak 10 %, kemudian diinkubasikan pada suhu 30°C selama 7 hari dalam keadaan anaerob.

Seleksi isolat xilanolitik

Mikrobia hasil pengkayaan ditumbuhkan ke dalam medium pertumbuhan xilan agar, teknik yang dilakukan adalah *role tube*. Setiap tabung Hungate yang berisi 4,5 ml medium xilan agar ditambah dengan 0,5 ml kultur hasil pengkayaan. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 7 hari dalam keadaan anaerob. Koloni mikrobia yang tumbuh pada medium tersebut diambil dan masing-masing ditumbuhkan dalam medium pertumbuhan cair dengan volume 10 ml setiap tabung Hungate. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 7 hari secara anaerob, kemudian diambil ekstraknya untuk diuji aktivitas endo- β -D-1,4-xilanase.

Isolat-isolat yang telah tumbuh di dalam medium pertumbuhan cair, selanjutnya diseleksi secara enzimatik dengan uji aktivitas endo- β -D-1,4-xilanase. Satu isolat yang mempunyai aktivitas enzim xilanolitik tertinggi digunakan sebagai isolat unggul untuk memproduksi xilanase. Isolat tersebut diamati morfologinya dan dilakukan pengecatan Gram, serta diuji daerah terang sekitar koloni (membuktikan aktivitas xilanolitik) dengan menambahkan Congo merah pada mediumnya (Gupta *et al.*, 2000).

Optimalisasi pertumbuhan isolat xilanolitik

Optimalisasi pertumbuhan isolat bakteri dilakukan pada pH medium 6 sampai 11,5; suhu inkubasi kultur dari 30 sampai 60°C, dan substrat yang digunakan meliputi xilan, xilosa, glukosa dan selulosa.

Pada optimalisasi pH medium digunakan 2% xilan *oat spelt* sebagai substrat, inkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari secara anaerob. Pada optimalisasi suhu inkubasi juga digunakan 2% xilan *oat spelt* sebagai substrat, inkubasi dilakukan selama 7 hari dalam keadaan anaerob. Masing-masing substrat (selulosa, glukosa dan xilosa) yang digunakan untuk optimalisasi pertumbuhan ditambahkan sebanyak 2%, inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 7 hari dalam keadaan anaerob. Setiap perlakuan dibuat tiga ulangan dan setiap tabung Hungate diisi dengan 9,5 ml medium pertumbuhan dan ditambah 0,5 ml kultur stok. Kultur hasil pertumbuhan pada setiap kondisi pertumbuhan diuji aktivitas xilanase yang dihasilkan untuk mengetahui kondisi yang menghasilkan aktivitas xilanase tertinggi.

Uji kadar protein

Kadar protein dianalisis menggunakan metode Lowry, *bovine serum albumin* (BSA) digunakan sebagai standar untuk menghitung kadar protein sampel. Dalam uji kadar protein ini digunakan sampel yang sama dengan yang digunakan untuk uji aktivitas enzim. Kadar protein digunakan untuk menghitung aktivitas enzim per mg protein menggunakan metode Lowry (Plummer, 1971).

Uji aktivitas endo-β-D-1,4-xilanase

Aktivitas enzim endo-β-D-1,4-xilanase diuji dengan menghitung kadar xilosa yang dibebaskan setelah xilan *oat spelt* terlarut diinkubasi dengan xilanase. Reaksi hidrolisis dilakukan dengan menggunakan campuran 0,2 ml enzim; 0,4 ml buffer Na-asetat 50 mM pH 6 dan 0,2 ml xilan *oat spelt* terlarut 4%. Selain itu juga dibuat kontrol substrat, enzim dan blanko. Semua tabung yang telah berisi

campuran tersebut diinkubasikan pada suhu 50°C selama 120 menit (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995). Selanjutnya ke dalam masing-masing tabung ditambahkan 0,6 ml BaOH dan 0,6 ml ZnSO₄ untuk menghentikan aktivitas enzim dan dihomogenkan dengan vorteks. Setelah itu disentrifugasi pada 3.200 g selama 20 menit untuk mengendapkan protein. Supernatan yang terjadi diuji kadar gula mereduksinya menggunakan metode Nelson Somogyi (Plummer, 1971). Satuan aktivitas enzim spesifik dinyatakan dengan satuan U/mg. Satu unit (U) aktivitas endo-β-D-1,4-xilanase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat membebaskan 1 μmol produk (xilosa) per menit (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi dan seleksi mikrobia xilanolitik

Berdasarkan hasil isolasi dan seleksi mikrobia diperoleh 18 isolat yang mempunyai aktivitas spesifik endo-β-D-1,4-xilanase antara 0,0043-0,0273 U/mg (Tabel 1). Salah satu isolat diketahui mempunyai aktivitas spesifik endo-β-D-1,4-xilanase tertinggi (isolat no. 11), bersifat anaerobik, Gram-positif dan berbentuk bulat. Isolat bakteri yang mampu menghasilkan xilanase dengan aktivitas tertinggi tersebut selanjutnya dilakukan optimalisasi pertumbuhannya.

Hasil pengecatan medium pertumbuhan isolat bakteri menggunakan Congo merah menunjukkan daerah terang sekitar koloni bakteri yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut menghasilkan xilanase. Menurut Bhat dan Hazlewood (2001) Congo merah dapat membentuk kompleks dengan xilan tetapi tidak dengan hasil hidrolisatnya (oligosakarida kecil). Hal ini dapat digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas xilanase yang dihasilkan oleh mikrobia. Xilan tidak larut yang dicat dengan Congo merah merupakan substrat yang ideal untuk menyeleksi mikrobia penghasil xilan pada medium agar (Kluepfel, 1988 *cit.* Bhat and Hazlewood, 2001).

Tabel 1. Aktivitas xilanase beberapa isolat hasil isolasi dari ketam
(*Microbial xylanase activity from crab*)

Nomor isolat (No. Isolat)	Kadar protein (mg/ml) (Protein, mg/ml)	Aktivitas endo- β -D-1,4- xilanase (U/ml) (<i>Endo-β-D-1,4- xylanase activity, U/ml</i>)	Aktivitas spesifik endo- β -D-1,4- xilanase (U/mg) (<i>Endo-β-D-1,4- xylanase specific activity, U/mg</i>)
1	3,61	0,0343	0,0095
2	4,22	0,0430	0,0102
3	3,63	0,0156	0,0043
4	2,65	0,0511	0,0193
5	3,13	0,0504	0,0161
6	3,40	0,0374	0,0110
7	5,48	0,0323	0,0059
8	2,64	0,0546	0,0207
9	2,92	0,0385	0,0132
10	2,95	0,0433	0,0147
11	2,40	0,0655	0,0273
12	2,45	0,0556	0,0227
13	2,57	0,0473	0,0184
14	3,03	0,0455	0,0150
15	3,06	0,0404	0,0132
16	3,27	0,0765	0,0234
17	3,88	0,0656	0,0169
18	2,52	0,0471	0,0187

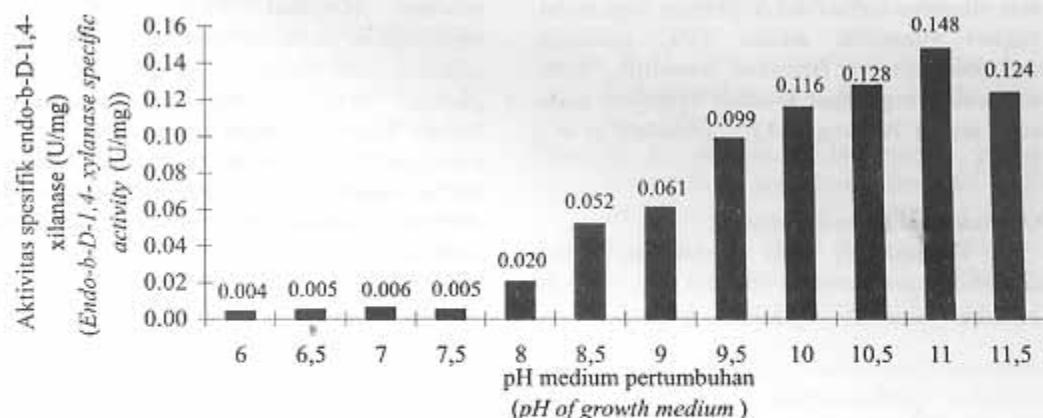
Dilaporkan oleh La Granga *et al.* (1996) bahwa beberapa spesies bakteri dan jamur dapat menggunakan xilan sebagai sumber karbon karena mampu menghasilkan xilanase.

Optimalisasi pH medium pertumbuhan

Faktor yang mempengaruhi produksi enzim xilanolitik adalah substrat dan komposisi medium. Parameter lain yang dapat mempengaruhi aktivitas dan produktivitas xilanase selama proses fermentasi adalah pH, temperatur dan agitasi (Kulkarni *et al.*, 1999). Optimalisasi pertumbuhan ini perlu dilakukan untuk mengetahui pola produktivitas xilanase, sehingga diketahui kondisi optimum untuk menghasilkan xilanase.

Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa salah satu isolat bakteri xilanolitik

mampu menghasilkan aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-xilanase tertinggi (0,148 U/mg) pada pH 11 (Gambar 1). Tingginya aktivitas enzim tersebut pada pH 11 berkaitan dengan pertumbuhan optimum isolat bakteri xilanolitik. Jika pH medium lebih rendah (10,5) atau lebih tinggi (11,5) maka aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-xilanase akan turun sebesar 13,5%. Isolat bakteri tersebut termasuk alkalofil karena mempunyai pH optimum 11, seperti dinyatakan oleh Horikoshi (1996) dan Prescott *et al.* (1999) bahwa organisme yang mempunyai pH optimum lebih dari 9 untuk pertumbuhannya disebut dengan alkalofil atau alkalofil.



Gambar 1. Optimalisasi pH medium pertumbuhan terhadap aktivitas spesifik endo-β-D-1,4-xilanase (Optimization of pH of growth medium on endo-β-D-1,4-xylanase specific activity).

Menurut Horikoshi (1996) permukaan sel mikrobia alkalofil mampu mempertahankan pH di dalam sel tetap netral pada lingkungan alkali dengan pH 10 sampai 13. Salah satu enzim yang dihasilkan oleh mikrobia alkalofil yaitu xilanase yang bersifat alkali. Enzim tersebut dapat menghidrolisis xilan dengan mudah karena xilan mempunyai sifat mudah larut dalam larutan alkali.

Menurut Hammond *et al.* (1984) analisis tentang dinding sel *Bacillus* alkalofil yang ditumbuhkan pada pH 8 dan 10 menunjukkan bahwa pH mempengaruhi komponen permukaan sel. Jika pH dinaikkan lagi maka terjadi perubahan komposisi protein khususnya yang mempunyai berat molekul besar, hal ini menunjukkan bahwa komponen protein mungkin merupakan pembatas yang tahan terhadap alkali. Dinding sel *Bacillus* alkalofil yang ditumbuhkan dalam medium alkali (pH 10) mengandung asam aspartat, asam glutamat dan asam uronat lebih banyak dari pada jika ditumbuhkan dalam medium netral. Organisme alkalofil mempunyai komponen-komponen tersebut dalam jumlah cukup banyak yang membuat permukaan sel bermuatan negatif sehingga melindungi isi sel

dari pH tinggi di luar sel yang dapat mematikan.

Optimalisasi suhu pertumbuhan

Aktivitas spesifik endo-β-D-1,4-xilanase isolat bakteri xilanolitik yang ditumbuhkan pada beberapa suhu pertumbuhan ditampilkan pada Gambar 2. Dari hasil optimalisasi suhu pertumbuhan isolat bakteri xilanolitik diketahui bahwa suhu pertumbuhan 35°C memberikan aktivitas spesifik endo-β-D-1,4-xilanase tertinggi (0,007 U/mg). Jika suhu pertumbuhan diturunkan menjadi 30°C, maka aktivitasnya turun sebesar 14,29% menjadi 0,006 U/mg. Inkubasi isolat bakteri xilanolitik pada suhu 60°C menurunkan aktivitas spesifik endo-β-D-1,4-xilanase sampai 42,86% sehingga aktivitasnya menjadi 0,004 U/mg. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa suhu juga sangat mempengaruhi produktivitas isolat bakteri xilanolitik.

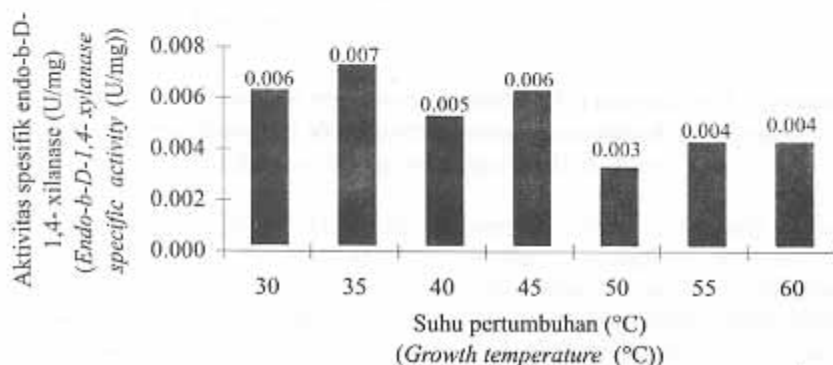
Enzim pemecah xilan dihasilkan oleh jamur dan bakteri yang bersifat aerobik dan anaerobik baik mesofilik maupun termofilik (Ruiz-Arribas *et al.*, 1995; Bhat and Hazlewood, 2001). Berdasarkan hasil analisis aktivitas endo-β-D-1,4-xilanase tersebut di

atas diketahui bahwa suhu optimum bagi isolat bakteri xilanolitik adalah 35°C sehingga mikrobia tersebut termasuk mesofilik, yaitu mikrobia yang dapat tumbuh optimum pada suhu antara 20 sampai 45°C (Prescott *et al.*, 1999).

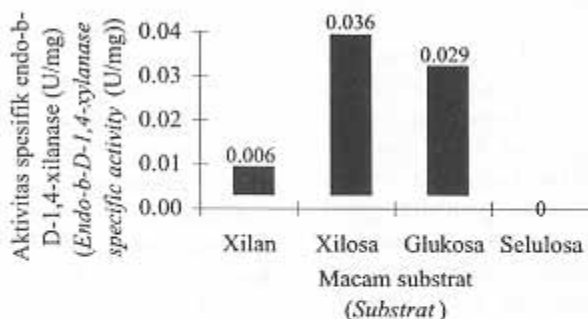
Optimalisasi macam substrat

Berdasarkan hasil pengamatan dapat diketahui bahwa macam substrat berpengaruh terhadap aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-

xilanase (Gambar 3). Substrat xilosa memberikan aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-xilanase lebih tinggi (0,036 U/mg) dibanding glukosa (0,029 U/mg) dan xilan (0,006 U/mg). Medium dengan substrat selulosa tidak menghasilkan xilanase, sementara itu 2% xilosa dalam medium mampu menginduksi aktivitas xilanase lebih tinggi dari substrat lainnya.



Gambar 2. Optimalisasi suhu pertumbuhan terhadap aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-xilanase (Optimization of growth temperature on endo- β -D-1,4-xylanase specific activity).



Gambar 3. Optimalisasi macam substrat terhadap aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-xilanase (Optimization of substrat on endo- β -D-1,4-xylanase specific activity).

Menurut Kulkarni *et al.* (1999) mekanisme yang mengatur pembentukan enzim ekstraselular dengan sumber karbon yang terdapat dalam medium dipengaruhi oleh kemampuan prekursor untuk sintesis protein. Xilanase diproduksi oleh beberapa jenis bakteri dan jamur melalui sistem induksi yang merupakan fenomena kompleks dan aras tanggapan terhadap masing-masing inducer bervariasi pada setiap organisme. Turunan substrat dan hasil akhir proses enzimatik sering mempunyai peran positif dalam induksi xilanase, tetapi juga dapat menjadi inhibitor pada konsentrasi tinggi.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Ruiz-Arribas *et al.* (1995) menunjukkan bahwa *Streptomyces* spp. yang ditumbuhkan dalam medium dengan substrat xilan *oat spelt* mudah larut mempunyai aktivitas xilanase 100%, sedangkan dengan xilan *oat spelt* tidak mudah larut mempunyai aktivitas 33,28%, dan dalam *lichenan* serta Carboxy Methyl Cellulose menunjukkan aktivitas xilanase 0%. Hasil penelitian Schyns *et al.* (1990) pada sel yang telah ditumbuhkan dalam substrat glukosa menunjukkan adanya induksi xilanase dan β -xilosidase ketika ditambahkan xilosa. Induksi tersebut semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi xilosa sampai akhirnya mencapai maksimum. Hal ini menunjukkan produksi enzim xilanolitik diinduksi oleh xilosa tetapi ditekan oleh senyawa antara hasil pemecahan xilosa.

Kesimpulan

Hasil isolasi bakteri xilanolitik dari ketam diperoleh isolat yang mempunyai aktivitas spesifik endo- β -D-1,4-xilanase. Isolat bakteri tersebut bersifat anaerobik, Gram-positif dan berbentuk bulat. Hasil optimalisasi pertumbuhan bakteri tersebut diketahui mempunyai aktivitas xilanolitik tertinggi pada pH 11, suhu 35°C dan pada substrat xilosa, sehingga bakteri tersebut termasuk mikrobia alkalofil.

Daftar Pustaka

- Barnes, R. D. 1980. Invertebrate Zoology. 4th. Holt-Saunders Int. Eds. Japan. Pp : 662-799.
- Bhat, M. M. and G. . Hazlewood. 2001. Enzymology and Other Characteristics of Cellulases and Xylanases. In : Enzymes in Farm Animal Nutrition. M.R. Bedford and G.G. Partridge (Eds.). CABI Publishing. UK. pp : 11 - 60.
- Gessesse, A. 1998. Purification and Properties of Two Thermostable Alkaline Xylanases from an Alkaliphilic *Bacillus* sp. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 64 (9) : 3533-3535.
- Gupta, N., V. S. Reddy, S. Maiti and A. Ghosh. 2000. Cloning, Expression, and Sequence Analysis of the Gene Encoding the Alkali-Stable, Thermostable Endoxy-Lanase From Alkaliphilic, Mesophilic *Bacillus* sp. Strain NG-27. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 66 (6) : 2631-2635.
- Hammond, S. M., P. A. Lambert and A. N. Rycroft. 1984. The Bacterial Cell Surface. Croom Helm, London and Sydney.
- Horikoshi, K. 1996. Alkaliphilic-from an Industrial Point of View. FEMS Microbiol. Rev. 18 : 259-270.
- Kulkarni, N., A. Shendye and M. Rao. 1999. Molecular and Biotechnological Aspects of Xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 23 : 411-456.
- La Granga, D. C., I. S. Pretorius and W. H. Van Zyl. 1996. Expression of a *Trichoderma reesei* - xilanase Gene (XYN 2) in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 62 (3) : 1036 - 1044.
- Plummer, D. T. 1971. An Introduction to Practical Biochemistry. Tata Mc Graw Hill Publ. Co. Ltd. Bombay New Delhi. Pg : 156 - 157.

- Prescott, L. M., J. P. Harley and D. A. Klein. 1999. Microbiology. 4th Ed. WCB McGraw-Hill, USA.
- Ratanakhanokchai, K., K. L. Kyu and M. Tanticharoen. 1999. Purification and Properties of a Xylan-Binding Endo-Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain K-1. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 65 (2) : 694-697.
- Ruiz - Arribas, A. J. M. Fernandez - Abalos, P. Sanchez, A. L. Garda and R. I. Santamaria. 1995. Overproduction, Purification, and Biochemical Character-ization of A Xylanase (Xys 1) from *Streptomyces halstedii* JM 8. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 61 (6) : 2414 - 2419.
- Schyns, P. J.Y. M. J., S. Biesterveld and A.J.M. Stams. 1990. Regulation of Hemicellulose Degradation and Product Formation by Anaerobic Bacteria. In: Agricultural Biotechnology in Focus in The Netherlands. J. J. Dekkers, H.C. van der Plas and D. H. Vuijk (Eds.). Pudoc Wageningen. pp : 192 - 197.
- Skinner, F. A. 1971. Isolation of Soil Clostridia. In Isolation of naerobes. The Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 5. Academic Press, London, New York.
- Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacteria. Graham G Stewart and Inge Russell (Eds.). Crit. Rev. Biotech. Vol. 17 (1) : 39 - 67.
- Walsh, D. J. and P. L. Bergquist. 1997. Expression and Secretion of a Thermostable Bacterial Xylanase in *Kluyveromyces lactis*. Appl. and Environ. Microbiol. Vol. 63 (8) : 3297 - 3300.
- Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in Microorganisms : Function and application. Microbiol. Rev. Vol. 52 (3) : 305-317.