

# 양송이 수확 후 배지로부터 분리한 *Bacillus subtilis* AB-55가 생산하는 xylanase의 특성

최원호<sup>1</sup> · 최용수<sup>1</sup> · 장갑열<sup>2</sup> · 윤민호<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 농업생명과학대학 생물환경 화학과, <sup>2</sup>국립원예특작과학원 버섯과

## Xylanase properties of *Bacillus subtilis* AB-55 isolated from waste mushroom bed of *Agaricus bisporus*

Won-Ho Choi<sup>1</sup>, Yong-Su Choi<sup>1</sup>, Kab-Yeul Jang<sup>2</sup>, Min-Ho Yoon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea

<sup>2</sup>Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Suwon, 441-706, Korea

Received on 18 May 2012, revised on 15 June 2012, accepted on 18 June 2012

**Abstract** : A bacterium AB-55, isolated from waste mushroom bed of *Agaricus bisporus* in Sukseong-myeon, Buyeo-gun, Chungcheongnam-do, Korea, was screened onto xylan agar congo-red plate by the xylanolysis method and was used to produce an xylanase in shaker baffle flask cultures containing oat spelt xylans. The phylogenetic analysis using 16S rRNA gene sequence data showed that the strain AB-55 had the highest homology (99.0%) with *Bacillus subtilis* and it was named as *Bacillus subtilis* AB-55. A xylanase was purified by ammonium sulfate precipitation (50~80%), gel filtration on sephacryl S-300, and ion exchange chromatography on DEAE sepharose FF. The molecular weight of the xylanase was estimated as 44 kDa by SDS-PAGE. Optimal pH and temperature for the xylanase activity was pH 7 and 50°C, respectively. N-terminal amino acid sequence of the enzyme was identified as Ser-Ala-Val-Lys-His-Gly-Ala-Ile-Val-Phe. The substrate specificity of the enzyme exhibited that it hydrolyzed efficiently oat spelt xylan as well as beechwood xylan, but showed no activity against Avicel and carboxymethyl cellulose (CMC). The enzyme activity was enhanced by Fe<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> whereas was entirely inhibited by Hg<sup>+</sup>.

**Key words** : Xylanase, Purification, *Bacillus subtilis* AB-55, Zymogram

## I. 서론

Xylan은 자연계에 풍부하게 존재하는 식물섬유의 주요 성분 물질로서 농산 폐기물 또는 목재 성분의 30%를 차지하고 있다. 식물체의 주요 구성성분은 cellulose, hemicellulose, lignin 으로 그 중 hemicellulose는 cellulose 다음으로 풍부한 탄수화물로 연간 약 450억 톤이 생산되고 있지만 아직 산업적 활용은 거의 없다. 섬유소처럼 hemicellulose 역시 선택적인 분해, 또는 대사과정을 거쳐 새로운 고 기능성 식품소재, 정밀 화학 소재 및 에너지원 등의 응용가치가

높은 유용물질로 변화시킬 수 있는 천연자원이지만 거의 재활용되지 못하고 방치되고 있는 실정이다. 그러므로 이를 산업적으로 이용하기 위해서는 이를 분해 할 수 있는 고효율 효소를 생산하는 새로운 미생물의 탐색과 관련 효소를 이용한 응용기술이 절실히 요구되고 있다(Bailey et al., 1992; Jung et al., 2003; Shrinivas et al., 2010).

최근 xylan과 cellulose를 함유하는 식물성 폐기물로부터 cellulase 및 xylanase 효소를 이용한 각종 당류, 알콜, 유기산과 그 외 여러 고부가가치 생산물을 생산하기 위한 여러 연구가 진행되어 왔으며, 특히 xylanase를 이용한 가수분해 산물인 xylooligo 당은 다른 oligo 당보다 열이나 산에 대해 더욱 안정하고 가수분해 활성저하 효과를 가지

\*Corresponding author: Tel: +82-42-821-6733

E-mail address: mhyoon@cnu.ac.kr

고 있어서 식품의 부패방지 및 보존제로 여러 가지 식품의 가공에 널리 이용되고 있다. 또한 xylooligo 당은 *Bifidus* 균 증식 촉진인자로써 알려진 기능성 올리고당 중에서 모든 면에서 가장 우수한 것으로 알려져 일본에서 다른 oligo 당 보다 고가로 판매 되고 있다(Katarina et al., 2005).

최근 들어 펄프 제지 산업의 표백 과정에서 환경오염을 유발시키는 여러 화학 표백제의 사용을 절감시키고 펄프의 재질을 향상시키기 위하여 알칼리 내성 xylanase 효소를 이용한 효소적 방법으로 펄프 내 xylan과 lignin을 제거하기 위한 연구가 수행되고 있다(Viikari, 1990; Sandrima et al., 2005). Xylanase 효소를 생산하는 미생물로는 *Aspergillus* 속(Anthony et al., 2005; Chidi et al., 2008) *Penicillium* 속(Ryan et al., 2003), *Trichoderma* 속 등(Beldman et al., 1985)의 진균과 *Bacillus* 속(Lama et al., 2004; John et al., 2006; Tachaapaikoon et al., 2006), *Streptomyces* 속(Ninawe et al., 2008; Li et al., 2009) 등의 세균이 잘 알려져 있으며, 이들 미생물이 생산하는 각각의 xylanase는 기질 분해 양상이 다양하며 생성 물질은 물론 효소적 특성도 많은 차이가 있다.

본 실험에서는 양송이 수확 후 배지로부터 섬유소의 분해 능력 외에도 xylan 분해활성이 높은 xylanase 생성균 *Bacillus subtilis* AB-55를 분리, 동정하고 분리균이 생성하는 xylanase를 정제하여 그 효소학적 특성을 검토한 실험 결과를 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주

본 연구에 사용할 xylanase 생성균의 분리는 충청남도 부여군 석성면 석성리 소재의 양송이 재배농가에서 양송이 수확 후 배지를 시료로 이용하여 미생물 순수분리 방법인 희석평판법으로 균주를 선발하였고, 선발 균주를 대상으로 Tryptic soy broth (TSA)배지와 xylan agar plate에 균을 접종한 후 1% Congo red(Saha, 2002; Canakci et al., 2007) 용액으로 염색을 하여 xylanase 효소를 생산하는 균주를 최종 선발하여 실험에 사용하였다.

### 2. 배지 조성 및 배양 조건

선발 균주의 생육과 xylanase의 생성을 위한 배지로

Tryptic soy broth 희석배지 (70% TSA)에 기질인 0.1% xylan을 첨가하여 배양하였으며, 진탕 배양기를 이용하여 150 rpm에 30°C에서 배양하였다.

### 3. 16S rRNA 염기서열 분석

순수 분리된 단일 colony를 선별 하여 대전시 유성구 화암동에 위치한 Solgent사에 의뢰하여 16S rRNA sequence를 수행하였다. 염기서열 비교 분석은 NCBI, Genbank (Chun et al., 2007)를 이용하여 다른 균주와의 유사성과 상동성을 비교하였고, 염기서열의 alignment는 Clustel X program (version 1.8)(Kimura, 1983)를 이용하여 염기서열을 정렬하였고, DNA star 5.0, Bio Edit, MEGA version 4.0 (Saitou et al., 1987)를 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

### 4. 생육 및 xylanase 활성

배양기간에 따른 생균수와 xylanase 생성 여부를 확인하기 위하여 선발 균주를 0.1% xylan이 함유된 70% TSB 액체 배지에서 배양하여 6시간 마다 분광광도계를 사용하여 660nm에서 배양액의 탁도를 측정함으로써 생육 정도를 확인하였다.

### 5. Xylanase 활성측정 및 단백질 정량

Xylanase 활성 측정은 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.0에 0.1% oat spelt xylan을 첨가한 현탁액을 기질용액으로 이용하여 효소분해에 의해 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson법(Somogyi, 1952)으로 분석하여 520 nm에서 분광광도계를 이용하여 환원당 함량을 정량하였다. 표준곡선의 작성은 표준당으로 xylose를 사용하였으며, xylanase 효소의 활성도 1 unit는 1분당 1  $\mu$ mol의 xylose를 생산해 내는 효소의 양으로 정의하였다. 또한 단백질의 정량은 Lowry 법에 따라 측정 하였으며(Lowry et al., 1951), 표준단백질로는 bovine serum albumin (BSA: 25~300  $\mu$ g/ml)을 사용하여 표준곡선을 작성하여 단백질의 정량을 하였다. 또한 정제 단계의 크로마토그래피 각 분획에 대한 단백질 농도는 흡광도 280 nm에서 측정하였다.

## 6. Xylanase 효소의 정제

효소의 정제는 Gradi-Frac™ System(Pharmacia Biotech, Sweden)을 이용하여 황산암모늄 침전 및 투석, Sephacryl S-300을 이용한 겔 여과법, DEAE-Sephacryl fast flow 음이온 교환수지법을 이용하여 효소를 정제하여 실험하였다.

## 7. 분자량 측정

정제과정 중의 효소 정제도 및 정제된 단백질의 분자량을 확인하기 위하여 전기영동장치(Atto AE-6450, Japan)를 이용하여 SDS-PAGE법으로(Laemmli et al., 1970; Park et al., 2010) 분자량을 확인하였다. 분리용 겔 12%, 농축용 겔 5%를 각각 사용하였고, 분자량을 확인 하기 위하여 표준 단백질(Fermentas, PageRuler™ Prestained Protein Ladder size 170 kDa~10 kDa)를 사용하였다.

## 8. N-말단 아미노산 서열 결정

정제효소의 N-말단염기 서열을 확인하기 위하여 정제 단백질을 SDS-PAGE 한 후 TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL(Bio-Rad Co.)과 PVDF(Polyvinylidene fluoride) membrane 을 이용하여 Western blot를 수행하였다. PVDF membrane에 transfer한 단백질 밴드를 한국 기초과학지원연구소에 의뢰하여 N-Terminal Sequencer(Procise Protein Sequencer-492CLC, Applied Bio Systems)를 이용하여 N-말단 아미노산서열 분석하였다. 아미노산 염기서열의 비교 분석은 NCBI, Protein Data Bank, Genbank, Swiss-Prot protein의 서버를 이용하여 기존의 xylanase 유전자 또는 아미노산서열을 확인하였다.

## 9. 효소의 기질 특이성

효소의 기질특이성 조사를 위하여 20 mM sodium phosphate buffer의 용액에 0.2% xylan, cellobiose, starch, carboxy methyl cellulose (CMC) 및 Avicel을 기질용액으로 만들어 잘 용해한 후 각각의 기질에 대한 효소 활성도를 측정하였다.

## 10. 효소의 금속이온 및 영향

금속이온의 영향을 알아보기 위하여 일가 금속이온 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Hg<sup>1+</sup>와 이가 금속이온 Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>의 최종 농도가 1 mM이 되도록 제조하여, 각각의 용액에 효소액을 첨가하여 40°C에 30분간 방치 한 후, 잔존효소 활성분석을 통하여 금속 이온들이 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

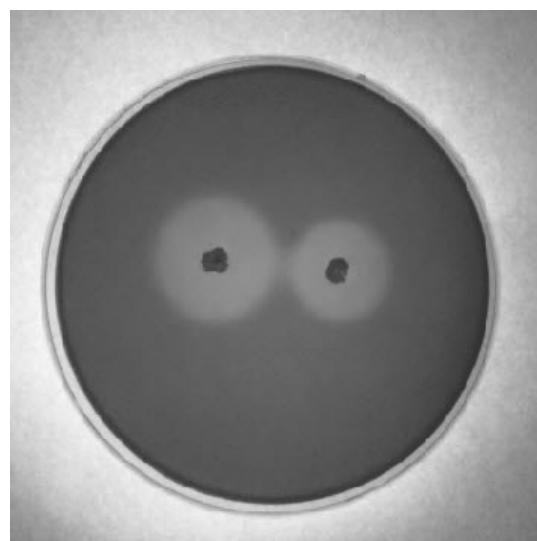
## III. 결과 및 고찰

### 1. 사용 균주 선발

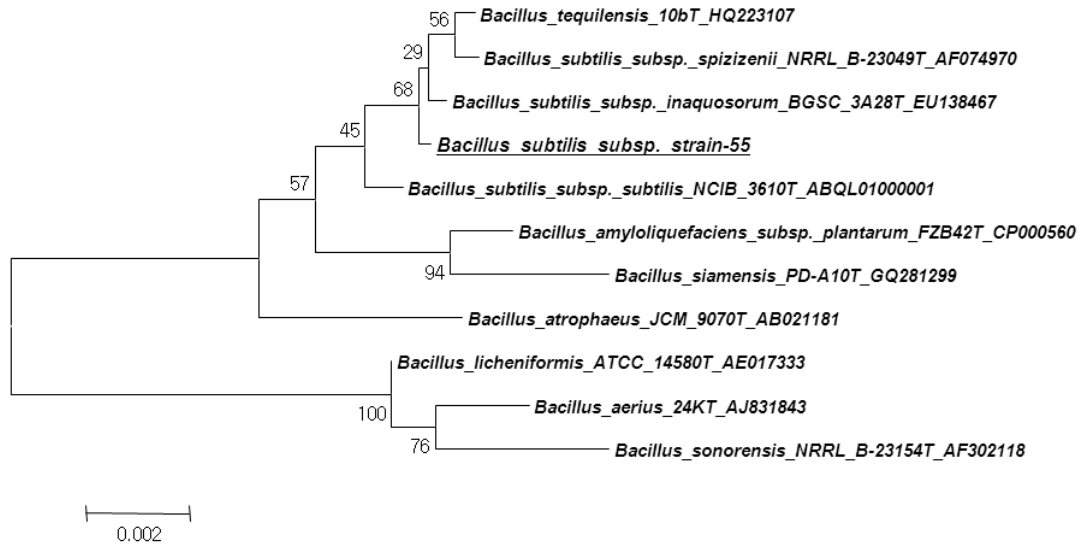
희석평판법에 의해 양송이 수확 후 배지로부터 xylanase 생성능이 우수한 균주를 1차 선발하였고, 선발 균주를 대상으로 0.1% oat spelt xylan이 함유된 Tryptic soy broth agar plate에 균을 접종한 후 0.1% Congo red 용액으로 염색하여 투명환을 생산하는 xylanase 효소활성이 높은 *Bacillus* sp. AB-55를 최종선발하여 실험에 사용하였다(Fig. 1).

### 2. Xylanase 생성균주 분류 및 동정

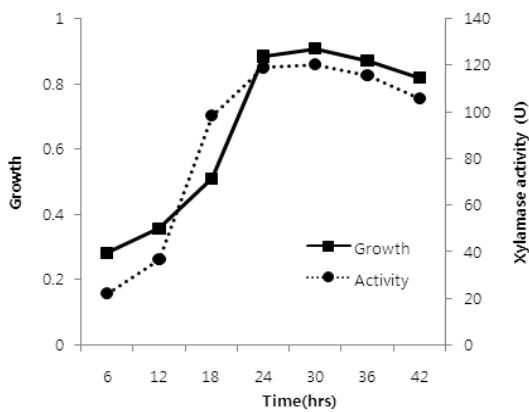
Xylan 분해균주 *Bacillus* sp. AB-55의 16S rRNA유전자의 염기서열을 분석하여 해당 Type strain들과 상동성을



**Fig. 1.** Production of clear halos on xylan agar plates by the selected strain AB-55. The photographs were taken after Congo red 0.1% staining and repetitive washing with 1M NaCl.



**Fig. 2.** Phylogenetic tree showing the relationship of the strains *Bacillus subtilis* AB-55. The tree is based on 16s rRNA sequence data and constructed by using the neighbor-joining method.



**Fig. 3.** Growth curve and xylanase activity of *Bacillus subtilis* AB-55.

비교하고, 계통분류학적 방법으로 분류하여 Phylogenetic tree를 작성한 결과, 분리균 AB-55는 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*\_BGSC\_3A28T\_EU138467와 99% 이상의 상동성을 보임으로써 *Bacillus subtilis* AB-55로 동정되었다(Fig. 2).

### 3. Xylanase 생성 균주의 생육 및 활성

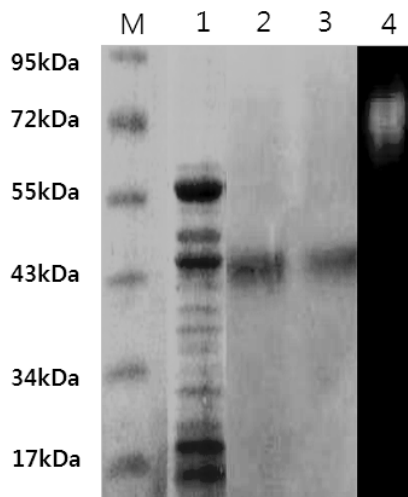
*Bacillus subtilis* AB-55 균주를 0.1% oat spelt xylan이 첨가된 70% TSB 희석배지에 접종하여 진탕 배양하면서 시간에 따른 균의 생육도, xylanase 생성능 및 단백질 함량을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 균의 생육도를 탁도 분석법과 생균수 확인 법으로 측정한 결과 배양 48시간에 최대이었으며, xylanase 생성은 정지기 초기인 배양 24시간에 효소활성도 125.8 U로 최대치를 나타내었고, 단백질 함량 또한 24시간에 최대농도인 324  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 수준으로 생산되었다.

### 4. Xylanase 효소의 정제

효소의 정제를 위해 분리균 AB-55를 상기 기본배지에 접종하여 24시간 배양한 후 4°C, 10,000 rpm에서 원심분리(Hanil Supra 22K, Korea) 하여 배양여액을 회수 하였

**Table 1.** Summary of purification steps of the xylanase from *Bacillus subtilis* AB-55.

Purification Step	Volume (ml)	Total activity(U)	Total protein(mg)	Specific activity(U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Crude enzyme	5.0	1,216	10.5	115.8	1.0	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Precipitation	5.0	1,180	3.4	347.1	2.99	97.03
Sephacryl-S300	1.0	708	1.2	590	5.09	58.22
DEAE-Sepharose	1.0	499.9	0.57	877	7.57	41.03



**Fig. 4.** SDS-PAGE and zymogram of xylanase purified from *B. subtilis* AB-55.

Lane M: protein marker, Lane 1: Ammonium sulfate precipitation, Lane 2: Sephacryl S-300, Lane 3: DEAE Sepharose fast flow, Lane 4: Native page zymogram.

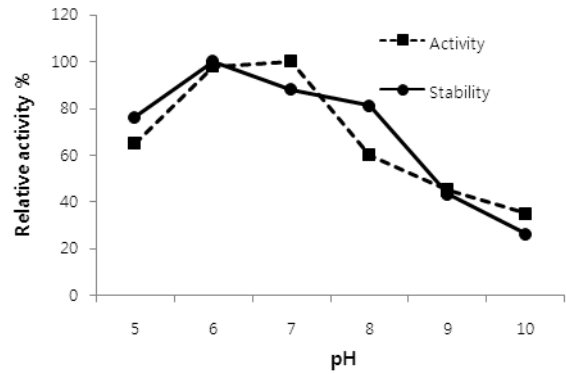
다. 배양여액으로부터 황산암모늄 침전, 겔 여과법, 음이온 교환수지법을 단계적으로 수행하여 정제도 7.5배, 회수율 43%의 xylanase를 정제하였다(Table 1).

**5. 효소의 분자량 확인 및 Zymogram.**

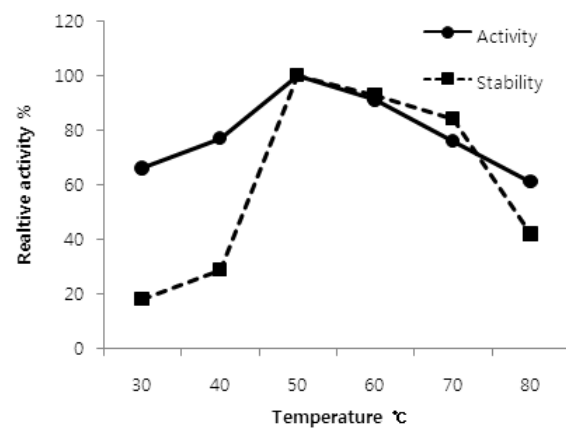
정제효소의 분자량을 확인하기 위하여 얻어진 활성분획을 농축하여 SDS-PAGE 방법으로 확인한 결과, 분자량은 44 kDa의 단백질로 확인 되었으며, 또한 비변성 조건에서 native PAGE gel을 이용한 zymogram 실험을 통해 xylanase 활성 단백질을 확인한 결과에서도 xylanase 활성 단백질밴드를 확인하였다(Fig. 4).

**6. N-말단 아미노산 서열 결정**

정제된 xylanase 효소 단백질을 SDS-PAGE방법에 의하여 전기영동 한 후, 단백질 N-말단 분석용 PVDF membrane를 이용하여 Western blotting을 실시하였다. PVDF membrane에 transfer된 정제 단백질의 band를 methanol이 첨가되지 않은 염색용액 coomassie brilliant blue G-250 이용하여 염색한 후 Edman method 방법으로 N-말단 아미노산 서열을 확인하였다. 정제한 xylanase의 N-말단 10개의 아미노산을 확인한 결과, 염기서열은 SAVKHGAIVF (Ser-Ala-Val-Lys-His-Gly-Ala-Ile-Val-Phe)로 확인 되었다.



**Fig. 5.** Effect of pH on activity and stability of xylanase purified from *B. subtilis* AB-55.



**Fig. 6.** Effect of temperature on activity and stability of xylanase purified from *B. subtilis* AB-55.

Genbank에 보고된 xylanase의 아미노산서열을 이용하여 비교한 결과, 정제효소는 Genbank ab.695294.1의 *Bacillus subtilis* WRL 101 (John 등, 2006) 및 NP-389697 (Prakash 등, 2008)의 xylanase와 100% 아미노산서열이 일치하였고, *Bacillus subtilis* BAL-45490 (Katarina 등, 2005) 균주와 ADM-15109 (Shrinivas 등, 2010)와는 60% 정도의 상동성을 보였다.

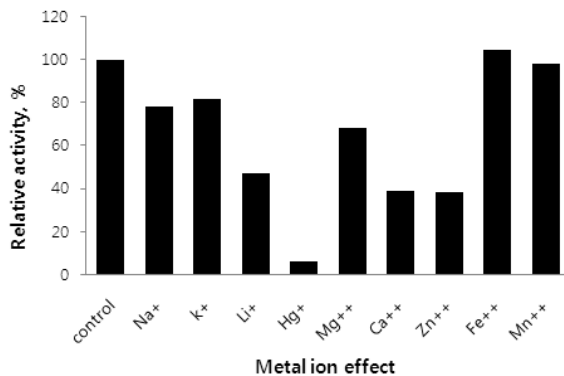
**7. 효소의 최적 pH, 최적 온도 및 안정성**

정제 효소는 pH 7.0의 부근에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH 6.0~8.0까지는 비교적 효소활성이 안정하였으나 pH 8.0 이상의 알칼리 조건에서는 활성이 급격하게 감소하였다(Fig. 5). 효소의 최적 온도는 50°C이였으며, 중온보다는 효소활성이 비교적 고온인 50°C~70°C에서 안정하므로써 호열성효소의 특징을 보였다(Fig. 6).

**Table 2.** Substrate specificity of xylanase purified from *B. subtilis* AB-55.

Substrates	Xylanase activity(U/mg protein)
Oat spelt xylan	243.2 ± 0.28
Beechwood xylan	232.8 ± 0.67
Cellobiose	0.0 ± 0.0
Starch	0.91 ± 0.082
Carboxy methyl cellulose(CMC)	0.011 ± 0.008
Avicel	0.0 ± 0.0

Each value represents the mean ± standard error values.

**Fig. 7.** Effect of the metal ions on the xylanase activity.

### 8. 효소의 기질 특이성

정제 효소의 기질특이성을 확인하기 위하여 oat spelt xylan, beechwood xylan, cellobiose, starch, carboxy methyl cellulose (CMC) 및 avicel 등의 기질에 대한 효소활성을 측정하였다. 정제효소는 oat spelt xylan과 beechwood xylan에 대한 분해능이 우수하였으나, starch에 다소의 활성을 보인 것 외에 Avicel과 CMC 등 다른 탄소원은 분해하지 못하였다(Table 2).

### 9. 효소의 금속이온 및 영향

금속이온은 효소활성의 저해제 또는 촉매제로작용 할 수 있다. 각종 금속 이온의 영향을 조사한 결과, Fe<sup>2+</sup>과 Mn<sup>2+</sup>의 2가 양이온에서는 무 첨가구에 비해 효소활성이 증가하였다. 그러나 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>는 20% 이상, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 이온은 50%이상 저해하였고, 특히 Hg<sup>1+</sup>에서는 대부분의 활성이 저해하는 것으로 나타났다(Fig. 7).

## IV. 결론

양송이 수확 후 배지에서 xylanase 효소를 생산하는 세균을 분리하여 생화학적 특성과 16S rDNA유전자의 염기서열 이용한 계통학적인 분석을 통해 *Bacillus subtilis* AB-55로 동정하였다. 분리균 AB-55가 생산하는 xylanase를 정제하기 위하여 황산 암모늄 침전, 겔 여과법 및 음이온 교환수지법 등의 정제과정을 거치면서 xylanase 활성이 높은 단백질을 순수정제 하였다. 정제효소의 효소학적 특성을 조사한 결과 효소의 분자량은 44 kDa이었고, zymogram 실험을 통해 xylanase 단백질 밴드가 확인되었다. 정제한 xylanase의 N-말단 10개의 아미노산을 확인한 결과, 염기서열은 Ser-Ala-Val-Lys-His-Gly-Ala-Ile-Val-Phe로 확인 되었다. 효소의 최적 pH와 최적온도는 pH 7.0과 50°C이었고, 고온인 50°C~70°C에서 비교적 안정한 효소 활성을 보여 호열성 효소의 특징을 보였다. 금속이온의 영향에 있어서는 Fe<sup>2+</sup>과 Mn<sup>2+</sup> 이온에서는 무첨가구에 비해 활성이 각각 13%와 8%가 증가하였으나, 다른 1가 또는 2가 양이온에서는 효소활성이 저하되었고, 특히 Hg<sup>1+</sup>에서는 효소 활성의 대부분 억제되었다. 기질특이성 실험에서 oat spelt xylan과 beechwood xylan에서 분해능이 높았으나, 약간의 활성을 나타낸 starch를 제외하고 Avicel과 CMC 등 다른 탄소원의 기질은 분해하지 못하였다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 Agenda 원예·특용작물 경쟁력 제고 기술개발사업 (2012년)의 연구지원으로 수행한 것 임.

## 참고 문헌

- Anthony L, Marcel A, Eric R. 2005. Overproduction and characterization of xylanase B from *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.* 51: 177-183.
- Bailey MJ, Biely P, Poutanen K. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23: 257-270.
- Beldman G, Searle van LM, Rombouts FM, Voragen FG. 1985. The cellulase of *Trichoderma viride*: Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanase, exoglucanase and  $\beta$ -glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 146: 301-308.
- Chidi SB, Godana B, Ncube I, van Rensburg EL, Cronshaw A,

- Abotsi EK. 2008. Production, purification and characterization of cellulase free xylanase from *Aspergillus terreus* UL 4209. Afr. J. Biotechnol. 7: 3939-3948.
- Chun JJ, Lee H, Jung YY, Kim MJ, Kim SI, Kim BK, Lim YW. 2007. Ex Taxonia web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequence. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2259-2261.
- Canakci S, Inan K, Kacagan M, Belduz AO. 2007. Evaluation of arabinofuranosidase and xylanase activities of *Geobacillus* sp. isolated from some hot springs in Turkey. J. Microbiol. Biotechnol. 17: 1262-1270.
- Jung WH, Yang SY, Yang MD, Song JK, Kim CW. 2003. Isolation of *Bacillus* sp. producing xylanase and cellulase and optimization of medium conditions of its production. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31: 383-388.
- Katarina K, Maria V, Peter B. 2005. Purification and characterization of two minor endo-1,4-xylanase of *Schizophyllum commune*. Enzyme Microb. Tech. 36: 903-910.
- Kimura M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Khandeparkar R, Bhosle N. 2006. Purification and characterization of thermoalkalophilic xylanase isolated from the *Enterobacter* sp. MTCC 5112. Research in Microbiology. 157: 315-325.
- Khasin A, Alchnati I, Shoam Y. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1725-730.
- Li N, Shi P, Yang P, Wangm Y, Luo H, Bai Y, Zhou Z, Yao B. 2009. A xylanase with high pH stability from *Streptomyces* sp. S27 and its carbohydrate-binding module with/without linker-regiontruncated versions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 83: 99-107.
- Lama L, Calandrelli V, Gambacorta A, Nicolaus B. 2004. Purification and characterization of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. Res. Microbiol. 3: 125-131.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Ninawe S, Kapoor M, Kuhad RC. 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. Bioresource Technol. 99: 1252-1258.
- Park IK, Cho JS. 2010. Partial characterization of extracellular xylanolytic activity derived from *Paenibacillus* sp. KIJ1. Afr. J. Microbiol. Res. 4(12): 1257-1264.
- Prakash S, Veeranagouda Y, Kyoung L, Sreeramulu K. 2008. Xylanase production using inexpensive agricultural wastes and its partial characterization from a halophilic *Chromohalobacter* sp. TPSV 101. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25: 197-204.
- Ryan SE, Nolan K, Thompson R, Gubitz GM, Savage AV, Tuohy MG. 2003. Purification and characterization of a new low molecular weight endoxylanase from *Penicillium capsulatu*. Enzyme Microb. Technol. 33: 775-785.
- Saha BC. 2002. Production, purification and properties of xylanase from a newly isolated *Fusarium proliferatum*. Process Biochem. 37: 1279-1284.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.
- Sandrima VC, Rizzatti AS, Terenzim HF, Jorgeb JA, Milagres AM, Polizeli MLTM. 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential for kraft pulp bleaching. Process Biochem. 40: 1823-1828.
- Shrinivas D, Savitha G, Raviranjana K, Naik GR. 2010. A highly thermostable alkaline cellulase-free xylanase from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB 99 suitable for paper and pulp industry: purification and characterization. Appl. Biochem. Biotechnol. 162: 2049-2057.
- Somogyi M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- John ST, Rice FJ, Preston JF. 2006. Characterization of XynC from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 and analysis of its role in depolymerization of glucuronoxylan. J. Bacterial. 188: 8617-8626.
- Tachaapaikoon C, Kyu KL, Ratanakhanokchai K. 2006. Purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. K-8 by using corn husk column. Process Biochem. 41: 2441-2445.
- Viikari L, Kantelinen A, Ratto M, Sundquist J. 1990. In. ACS Symp. ser. 460 :Leatham, G. E. and Himmel, E. M.(eds.), American Chemical Society, Washington DC.