

토양으로부터 분리한 *Bacillus agaradhaerens* DK-2386 균주가 생산하는 Xylanase의 특성

최지휘¹, 박영서², 이형재¹, 배동훈^{1*}

¹단국대학교 식품공학과

²가천대학교 식품생물공학과

Received: November 4, 2015 / Revised: November 15, 2015 / Accepted: November 15, 2015

Characterization of Xylanase from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386 Isolated from Korean Soil

Ji-Hwi Choi¹, Young-Seo Park², Hyungjae Lee¹, and Dong-Hoon Bai^{1*}

¹Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea

The optimum conditions for the production of xylanase from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386 have been previously investigated. In this study xylanase was purified by ammonium sulfate precipitation and CM-sepharose ion exchange chromatography. The molecular mass of the xylanase as determined by SDS-PAGE was 23 kDa in a form of monomeric enzyme. The optimum pH and temperature for xylanase activity was 6.0 and 60°C, respectively. Xylanase activity was increased by the addition of EDTA and then stabilized at 40°C for 24 h. The maximum xylanase activity was obtained when Birchwood xylan was used as a substrate and the V_{max} and K_m were 49,724 $\mu\text{mol}/\text{min}$ and 6.08 mg/ml, respectively.

Keywords: *Bacillus*, xylanase, purification, activity

서론

Xylanase는 xylan의 1,4- β -D-xylopyranosyl 결합을 절단하는 효소로서 절단 위치에 따라 endo-xylanase와 exo-xylanase로 나눌 수 있다. Xylanase를 생산하는 미생물 중 세균의 경우에는 주로 endo-type으로 작용하고 곰팡이 유래의 xylanase는 exo 또는 endo-type으로 작용하는 것으로 보고되고 있다[6, 16]. 이러한 xylanase를 생산하는 미생물로는 *Bacillus licheniformis*[10], *B. circulans*[10], *Thermomyces lanuginosus*[19], *Neurospora crassa*[7], *Aspergillus fumigatus*[23], *A. niger*[13], *A. ficuum*[14] 등을 들 수 있다.

1980년대 이전에는 D-xylose를 ethanol 발효에 이용하지 못하였으나 그 이후 D-xylose로부터 ethanol을 생산할 수 있는 미생물인 *Pachysolen tannophilus*, *Candida tropicalis* 등이 발견됨으로써 D-xylose의 이용 가능성이 높아지게 되었다[24]. 현재 식품첨가물 증 감미료로서 각광받고 있는

xylytol는 D-xylose의 당알코올로서 다른 당류에 비해 인체 내 흡수가 적고 설탕의 50% 정도의 칼로리를 가지며 혈당치는 상승시키지 않으면서 설탕과 유사한 당도를 지니고 있어 인슐린 비의존성 당뇨병환자를 위한 중요한 당 대체 원료 및 치아 건강을 위한 건강기능식품소재로의 이용성이 알려져 있어 xylan을 xylanase로 효소분해 후 분해 산물인 D-xylose를 *Candida* 속 등의 효모를 이용하여 xylose로부터 xylytol을 생산하는 연구가 많이 진행되고 있다[15, 17, 22]. 이러한 D-xylose의 효율적인 생산을 위하여 유용한 xylanase 효소를 생산하는 균주를 검토하였으며 이전 연구를 통해 세균성 xylanase 생산 균주인 *B. agaradhaerens* DK-2386의 xylanase 최적 생산조건을 확인하였다[5]. 본 연구에서는 생산된 xylanase의 효소를 분리정제하고 정제효소의 효소특성에 관하여 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

Xylanase의 분리 및 정제

Xylanase의 분리 및 정제는 다음의 방법으로 하였다. 효소 생산을 위한 배양 최적조건에서 균주를 1 L 액체 배양하고 이를 12,000 $\times g$ 에서 20분간 원심분리(Supra 22K, Hanil

*Corresponding author

Tel: +82-41-550-3562, Fax: +82-41-559-7868

E-mail: baidh@dankook.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Co., Seoul, Korea)하여 균체를 제거하였다. 배양 상등액에 ammonium sulfate를 농도가 40% 되도록 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 교반하고 1차 침전된 단백질을 12,000 × g에서 10분간 원심분리하여 제거한 후 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 ammonium sulfate를 농도가 70% 되도록 첨가하여 4°C에서 2시간 동안 교반 후 침전된 단백질을 12,000 × g에서 20분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 효소 단백질은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 용해하고 용해된 효소단백질을 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)를 이용하여 2시간 간격으로 4회 투석하였다.

이온교환수지는 CM-sepharose(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 column에 충전하여 0.5 N NaOH로 분산시키고 중성이 될 때까지 수세 후 0.5 N HCl로 분산하여 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)으로 평형화하여 사용하였다. 평형화된 column에 효소액을 흡착한 후 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)으로 비흡착 단백질을 용출되지 않을 때까지 세척하였다. 세척 후 fraction collector(ISCO, Lincoln, NE, USA)를 사용하여 0.3 M NaCl 농도까지 linear gradient를 실행하여 용출하였다. 용출된 단백질 중 효소활성이 높은 fraction을 모아 ultrafiltration cell(AMICON Cell 8010, Millipore Co., Bedford, MA, USA)을 사용하여 PM-10 membrane(molecular weight cut-off: 10 kDa)으로 농축하였다.

단백질 정량과 전기영동

단백질의 농도는 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 Bradford 법[3]에 준하여 측정하였다. 정제 과정 중의 효소에 대한 순도 검정은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 Laemmli[11]의 방법에 준하여 행하였다. 전기영동을 위한 resolving gel은 15% 농도를 사용하였으며 220 V, 20 mA에서 1시간 전기영동 후, 0.05% coomassie brilliant blue R-250(Sigma Co.)으로 20분간 염색하고 30분간 3회 탈색하여 단백질 띠를 확인하였다.

정제효소의 특성

정제된 효소의 특성을 파악하기 위하여 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)을 이용하여 효소를 투석 후 pH, 온도, 무기염류의 영향과 기질특이성 및 효소반응속도에 대하여 확인하였다.

결과 및 고찰

Xylanase의 정제

B. agaradhaerens DK-2386의 배양 상등액으로부터 효소

단백질을 정제하기 위하여 ammonium sulfate로 단백질을 침전한 결과 70% ammonium sulfate 농도로 침전 시 최대의 효소역가 및 단백질 농도를 확인할 수 있었다. 따라서 배양액을 원심분리하여 상등액을 회수하고 40% ammonium sulfate로 비효소 단백질을 침전시켜 제거한 다음 원심분리하여 얻은 상등액에 ammonium sulfate 농도가 70%가 되도록 첨가하여 효소 단백질을 침전시켰다. 침전된 효소 단백질은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 용해하였으며, 이때의 효소 침전 회수율은 63.9%였다.

용해된 효소단백질을 10 mM sodium phosphate 완충용

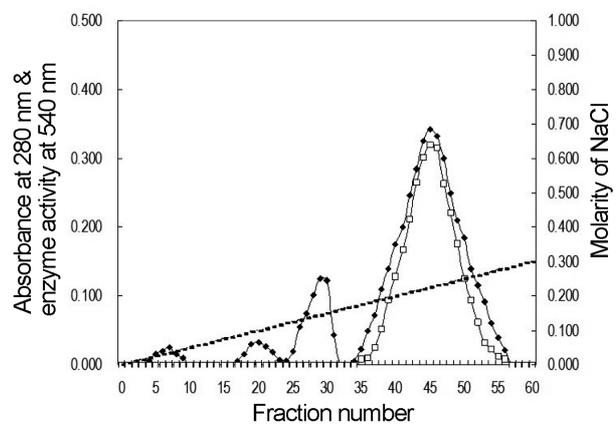


Fig. 1. Elution profile of xylanase from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386 on a CM-sepharose column. □, Enzyme activity; ◆, Absorbance at 280 nm; -, Molarity of NaCl.

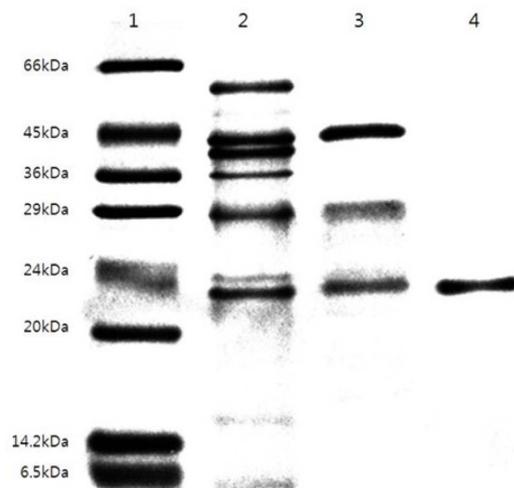


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of xylanase during purification steps. Lane 1, molecular weight markers; 2, supernatant; 3, ammonium sulfate precipitation; 4, CM-sepharose ion-exchange chromatography.

Table 1. Purification table of xylanase from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386.

	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Fold
Supernatant	1,862	1,094,156	587.6	100	1.00
Ammonium sulfate precipitation	1,159.6	699,333	603.0	63.9	1.02
CM-Sepharose chromatography	50.2	192,540	3,835.4	17.5	6.53
Ultrafiltration	47.2	185,933	3,939.0	16.9	6.70

액(pH 6.0)으로 투석한 후 CM-sepharose 이온교환수지를 이용하여 정제한 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 0.16–0.25 M NaCl 농도에서 효소가 column으로부터 용출됨을 확인할 수 있었다. 높은 효소활성을 나타내는 분획을 수집하여 한외여과장치(Millipore Co.)에 PM-10 한외여과막(Millipore Co.)을 사용하여 여과 및 농축하였다.

정제효소의 순도를 확인하기 위하여 각 정제 단계의 시료를 SDS-PAGE로 분석한 결과 CM-sepharose 이온교환수지를 이용하여 정제한 시료의 경우 분자량 23,000 dalton의 위치에서 단일 band를 확인할 수 있었는데(Fig. 2), 이는 Poon 등[18]이 보고한 *B. agaradhaerens*가 생산하는 xylanase 효소의 특성에 관한 연구 중 분자량에 대한 결과와 동일함을 확인할 수 있었다. 각 정제 단계에 따른 효소의 정제도와 회수율을 계산한 결과 Table 1과 같이 CM-sepharose 이온교환수지를 이용한 정제 후에는 배양상등액과 비교하여 6.53배의 정제도를 얻을 수 있었으며 회수율은 17.5%로 계산되었다.

효소활성과 안정성에 미치는 pH의 영향

Sodium citrate 완충용액(pH 3–4), sodium acetate 완충용액(pH 4–6), MOPS 완충용액(pH 6–7), sodium phosphate 완충용액(pH 5–8), Tris-HCl 완충용액(pH 8–9), sodium carbonate 완충용액(pH 9–11)을 이용하여 정제 효소의 활성을 측정된 결과 본 효소는 pH 6.0–7.0의 범위에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 특히 sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에서 최적 활성을 나타내었다(Fig. 3A). 한편 Poon 등[18]의 연구에서는 *B. agaradhaerens*가 생산하는 xylanase가 pH 5–6 부근에서 안정하며 최적 pH가 5.6으로 보고되었으나, 본 효소의 경우 pH 6.0 미만, pH 9 이상에서는 효소의 활성이 급격히 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 또한 sodium acetate 완충용액의 경우 MOPS 완충용액이나 sodium phosphate 완충용액과는 달리 pH 6.0에서도 효소활성이 감소하는 경향이 나타나므로 sodium acetate 완충용액에서 효소반응이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 각각의 완충용액에 따른 효소 활성 결과로 미루어 phosphate계 완충용액에서 효소활성이 보다 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이후 실험은 기질인 xylan을 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 용해하여 사용하였다.

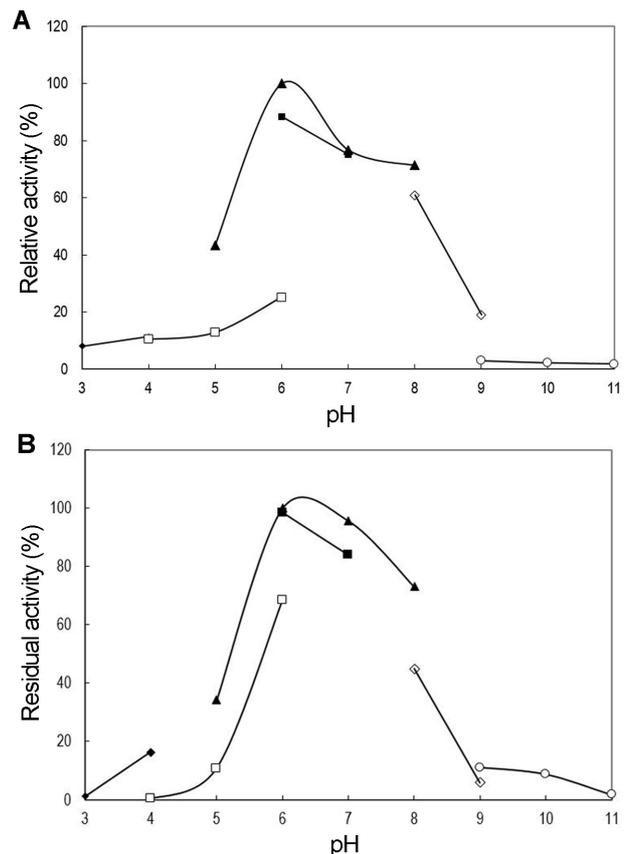


Fig. 3. Effect of pH on xylanase activity (A) and stability (B) from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386. ◆, 50 mM sodium citrate buffer; □, 50 mM sodium acetate buffer; ▲, 50 mM sodium phosphate buffer; ■, 50 mM MOPS buffer; ◇, 50 mM Tris-HCl buffer; ○, 50 mM sodium carbonate buffer.

정제 효소를 pH가 다른 각각의 완충용액에 희석하고 4°C에서 24시간 방치 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 3B에서 나타난 바와 같이 pH 6–7의 중성 부근에서는 안정한 효소활성을 나타내었으나 pH 5 이하, pH 8 이상의 산 또는 알칼리 조건에서는 상대적으로 불안정한 것을 확인할 수 있었다. Poon 등[18]의 연구에 따르면 *B. agaradhaerens*가 생산하는 xylanase의 열안정성이 pH에 의존적이라는 보고가 있었으며, 본 연구결과에서도 각 pH에 따라 효소의 안정성이 크게 달라지는 결과를 나타내고

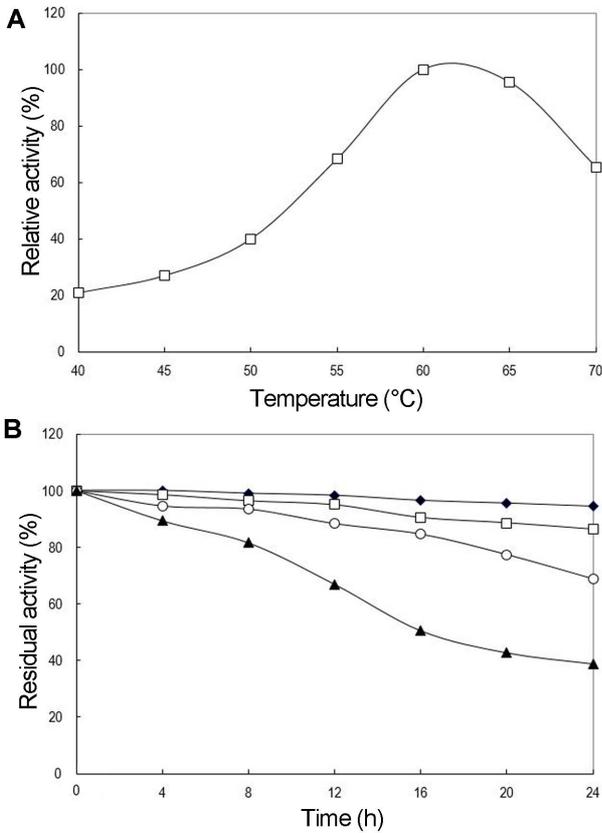


Fig. 4. Effect of temperature on xylanase activity (A) and stability (B) from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386. ◆, 4°C; □, 25°C; ○, 40°C; ▲, 60°C.

있었으며, pH가 효소안정성에 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

효소활성에 미치는 온도의 영향과 열 안정성

정제된 효소의 반응에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 40–70°C까지 5°C 단위로 온도범위를 달리하여 각 온도에서 20분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 효소활성을 검토한 결과 60°C에서 반응 시 최적 활성을 나타내었으며, 65°C 이상의 온도에서는 효소활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). Poon 등[18]의 연구에서는 *B. agaradhaerens*가 생산하는 xylanase의 효소활성이 40°C에서 최대의 활성을 갖는 것으로 보고되었으므로 본 효소와는 작용 최적온도에서 다른 결과를 나타내었다.

한편 각 온도에서 효소의 잔존활성을 비교검토한 결과 4°C에서는 효소활성이 안정하게 유지되었고 40°C에서는 효소활성의 70%가 유지되었으나 60°C에서는 효소 활성이 40%만 나타내어 60°C 이상의 고온에서는 불안정한 효소임을 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

Table 2. Effect of inorganic salts on xylanase activity and thermostability from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386.

Inorganic salts	Relative activity (%)	Residual activity (%)
None	100.0	66.66
CaCl ₂	100.0	87.50
Hg(NO ₃) ₂	3.9	ND
MgCl ₂	100.0	86.10
Cd(NO ₃) ₂	100.0	86.10
AlCl ₃	97.9	-
CuSO ₄	92.3	-
FeSO ₄	96.6	-
ZnSO ₄	98.3	8.00
NiSO ₄	91.2	81.80
BaSO ₄	98.7	82.60
AgNO ₃	4.9	ND
EDTA	113.0	96.29

ND, not determined

-, not detected

Table 3. Effect of inorganic salts on xylanase thermostability from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386.

Inorganic salts	0 h (OD _{540nm})	24 h (OD _{540nm})	Residual activity (%)
None	0.24	0.16	66.66
CaCl ₂	0.24	0.21	87.50
MgCl ₂	0.23	0.20	86.10
Cd(NO ₃) ₂	0.24	0.20	86.10
AlCl ₃	0.23	0.00	0.00
CuSO ₄	0.24	0.00	0.00
FeSO ₄	0.23	0.00	0.00
ZnSO ₄	0.23	0.02	8.00
NiSO ₄	0.22	0.18	81.80
BaSO ₄	0.23	0.19	82.60
EDTA	0.27	0.26	96.29

효소활성과 열안정성 미치는 무기염류의 영향

정제된 효소에 대한 무기염류의 영향을 확인하였다. 투석 후 효소액에 각 무기염류의 농도를 효소액의 10 mM 농도가 되도록 각각 첨가하여 4°C에서 1시간 방치 후 효소활성을 측정하여 비교 검토하였다(Table 2). 대조군으로서 EDTA를 효소액의 10 mM 농도로 첨가하여 비교하였다. 검토결과 EDTA의 첨가 시 효소활성이 다소 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 그 외 대부분의 무기염류에 대하여 효소활성에 큰

영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Hg^{2+} , Ag^+ 의 경우 첨가 시 효소활성을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

한편 투석된 효소 액의 농도에 10 mM 농도가 되도록 각 무기염류를 첨가하여 40°C에서 24시간 방치 후 잔존활성을 비교하였다(Table 3). 검토 결과 EDTA의 첨가 시 효소가 불안정한 온도인 40°C에서도 24시간까지 안정하였으며 다른 금속이온의 경우 열 안정성에 별다른 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Al^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 이온의 경우 이들 금속이온은 효소활성에는 영향을 미치지 않았으나 이들이 존재하는 경우 효소의 열 안정성이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 효소에 EDTA를 첨가 시 EDTA가 금속이온을 chelating 함으로써 효소활성이 증가하고 열에 대한 안정성이 유지됨에 따라 효소활성에 금속보조인자를 필요로 하지 않고 단백질로만 이루어졌을 것으로 판단되었다.

효소의 기질특이성

다당류에 대한 효소의 기질특이성을 확인하기 위하여 각 다당류를 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.0)에 1% 농도로 현탁하여 기질을 제조한 후 검토한 결과 birchwood xylan, oat-spelt xylan, beechwood xylan을 기질로 사용 시에만 효소활성이 측정되었으며, sodium carboxy methyl cellulose(CMC), cellulose, laminarin, pectin, starch 등의 다당류에 대한 효소활성은 없는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 또한 상대적 활성에 있어 birchwood xylan을 기질로 이용 시 효소활성이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 이는 Heck[8], Battan[1], Blanco[2] 등이 보고한 호알칼리성 *Bacillus*속 균주가 생산하는 xylanase의 기질에 대한 특성과 유사함을 확인할 수 있었다.

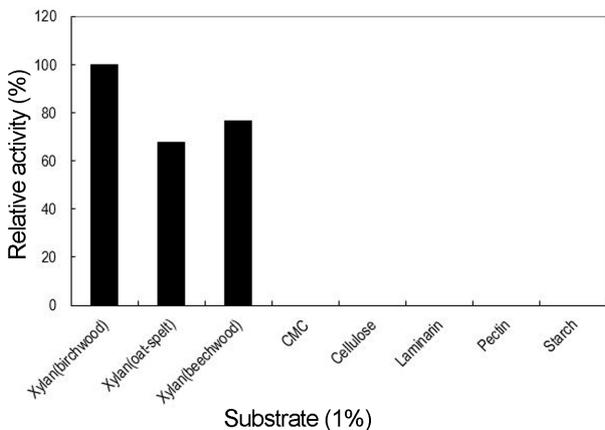


Fig. 5. Enzyme specificity and relative activity of xylanase from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386.

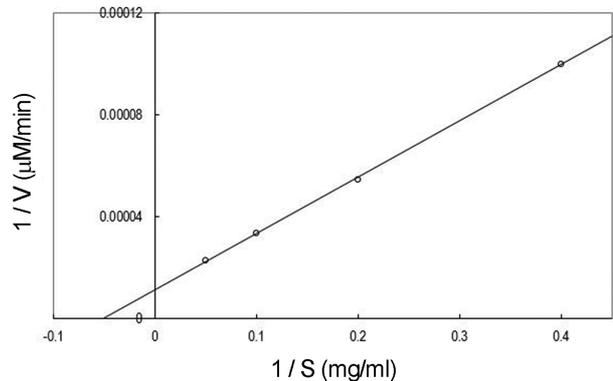


Fig. 6. Lineweaver-Burk (insert) plots for the hydrolysis of Birchwood xylan.

효소반응속도

Birchwood xylan을 기질(50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0)로 하여 기질농도에 따른 효소반응속도를 측정하였다. 효소반응을 반응초기부터 2분 단위로 측정하고 효소활성으로부터 초기 효소반응 속도를 계산하여 Michaelis-Menten과 Lineweaver-Burke plot을 작성하였다(Fig. 6). 그 결과 효소의 K_m 은 6.08 mg/ml, V_{max} 는 49,724 $\mu M/min$ 로 측정되었다.

Takahashi 등[21]은 *A. niger* E-1 유래의 xylanase VII의 K_m 값과 V_{max} 값을 측정한 결과 각각 2.8 mg/ml와 127 $\mu M/min \cdot mg^{-1}$ 으로 측정되었다고 보고하였는데, 이는 *Penicillium pinophilum* C1이 생산하는 GH family 10 xylanase의 K_m 값과 V_{max} 값인 4.3 mg/ml, 195.4 $\mu M/min \cdot mg^{-1}$ 과 유사하였다[4]. 또한 Hmida-Sayari 등[9]도 *A. niger* US368이 생산하는 GH family 11 xylanase의 K_m 값과 V_{max} 값은 각각 1.03 mg/ml와 811 $\mu M/min \cdot mg^{-1}$ 으로 계산되었다고 보고하였다. 본 연구에서 계산한 *B. agaradhaerens* DK-2386의 K_m 값과 V_{max} 값은 상기 균주들이 생산하는 xylanase와는 상이한 값을 지니고 있었는데, 상기 균주들보다는 높은 값을 지니고 있어 효소 동역학적인 면에서 상기 균주들이 생산하는 효소들보다 우수하지는 못하나 기질인 xylan을 효과적으로 분해하는 데에는 충분한 동역학적 특성을 지니고 있고 배양 상등액에 높은 효소활성을 나타내고 있기에 향후 본 균주를 이용한 xylan 분해 공정에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 판단되었다.

요 약

Bacillus agaradhaerens 균주의 효소를 정제하여 그 특성을 확인하였다. 균주가 생산하는 xylanase를 70% ammonium sulfate로 침전하고 CM-sepharose ion exchange chromato-

graphy와 ultrafiltration(PM-10)을 행하여 16.7%의 수율과 6.7배의 정제도를 지니는 효소를 얻을 수 있었으며 SDS-PAGE를 통하여 23 kDa의 분자량을 갖는 효소임을 확인하였다. 효소의 최적 pH는 6.0으로서 sodium phosphate buffer에서 24시간까지 안정하였으며, 최적반응온도는 60°C, EDTA의 첨가 시 효소활성이 증가되었고 40°C에서 24시간까지 안정하였다. 효소는 xylan만을 기질로 이용할 수 있었으며 Birchwood xylan에 대하여 최대 활성을 나타내었고 V_{max} 는 49,724 $\mu\text{M}/\text{min}$, K_m 은 6.08 mg/ml로 확인되었다.

References

- Battan B, Sharma J, Dhiman SS, Kuhad RC. 2007. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enz. Microb. Technol.* **41**: 733–739.
- Blanco A, Vidal Teresa, COLOM JF, Pastor FI. 1995. Purification and properties of xylanase A from alkali-tolerant *Bacillus* sp. strain BP-23. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 4468–4470.
- Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Cai HY, Shi PJ, Bai YG, Huang HQ, Yuan TZ, Yang PL, et al. 2011. A novel thermoacidophilic family 10 xylanase from *Penicillium pinophilum* C1. *Process Biochem.* **46**: 2341–2346.
- Choi JH, Park YS, Bai DH. 2015. Production of xylanase from *Bacillus agaradhaerens* DK-2386 isolated from Korean soil. *Food Eng. Prog.* **19**: 148–153.
- Dekker RFH. 1986. Kinetic, inhibition, and stability properties of a commercial beta-D-glucosidase preparation from *Aspergillus niger* and its suitability in the hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1438–1442.
- Dogaris I, Vakontios G, Kalogeris E, Mamma D. 2008. Induction of cellulases and hemicellulases from *Neurospora crassa* under solid-state cultivation for bioconversion of sorghum bagasse into ethanol. *Ind. Crops Prod.* **29**: 404–411.
- Heck JX, Lúis Henrique BS, Hertz PF. 2006. Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *J. Biochem. Eng.* **32**: 179–184.
- Hmida-Sayari A, Taktek S, Elgharbi F, Bejar S. 2012. Biochemical characterization, cloning and molecular modeling of a detergent and organic solvent-stable family 11 xylanase from the newly isolated *Aspergillus niger* US368 strain. *Process Biochem.* **47**: 1839–1847.
- Kim MJ, Lim SJ, Kang DK. 2008. Isolation of *Bacillus licheniformis* DK42 producing cellulase and xylanase, and properties of the enzymes. *Korean J. Anim. Sci. Technol.* **50**: 429–436.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680–685.
- Lee SY, Papoutsakis ET. 1999. *Metabolic Engineering*. Marcel Dekker, INC. New York, NY, USA. pp. 287.
- Liu X, Lu X, Liu L, Jia X. 2008. Effect of culture temperature alteration of *Aspergillus niger* A-25 on its production of xylanase. *J. Biotechnol.* **136S**: S290–S344.
- Lu F, Lu M, Bie X, Zhao H, Wang Y. 2008. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus ficuum* AF-98. *Bioresour. Technol.* **99**: 5938–5941.
- Mayerhoff ZDVL, Roberto IC, Silva SS. 1997. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *J. Biotechnol.* **19**: 407–409.
- Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S. 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enz. Microb. Technol.* **31**: 549–555.
- Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM. 1998. Biotechnological production of xylitol. part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysate. *Bioresour. Technol.* **66**: 25–40.
- Poon DK, Webster P, Stephen G. 2003. Characterizing the pH-dependent stability and catalytic mechanism of the family 11 xylanase from the alkalophilic *Bacillus agaradhaerens*. *Carbohydr. Res.* **338**: 415–421.
- Puchart V. 2008. Simultaneous production of endo- β -1,4-xylanase and branched xylooligosaccharides by *Thermomyces lanuginosus*. *Biotechnol.* **137**: 34–43.
- Sebastián S. 2008. Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 709–716.
- Takahashi Y, Kawabata H, Murakami S. 2013. Analysis of functional xylanases in xylan degradation by *Aspergillus niger* E-1 and characterization of the GH family 10 xylanase XynVII. *SpringerPlus* **2**: 447.
- Tran LH, Yogo M, Ojima H, Idota O, Kawai K, Suzuki T, et al. 2004. The production of xylitol by enzymatic hydrolysis of agricultural wastes. *J. Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**: 223–228.
- Wase DAJ, Raymahasay S, Wang CW. 1985. Production of β -D-glucosidase, endo-1,4- β -D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. *Enz. Microbiol. Technol.* **7**: 225–229.
- Watson NE, Prior BA, Lategan PM. 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from d-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enz. Microbiol. Technol.* **6**: 451–456.