

Microbacterium sp. 분리균의 Hemicellulases 생산성과 효소특성

윤기홍

우송대학교 식품생물과학과

Production and Properties of Hemicellulases by an Isolate of *Microbacterium* sp.

Ki-Hong Yoon

Department of Food Science & Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, Republic of Korea

(Received September 14, 2011 / Accepted September 20, 2011)

A bacterium producing the extracellular mannanase and xylanase was isolated from Korean farm soil by successive subcultures in a minimal medium supplemented with palm kernel meal (PKM) and rice bran. The isolate YB-1106 showed 98% similarity with *Microbacterium arabinogalactanolyticum* on the basis of 16S rRNA gene sequences. The additional carbohydrates including locust bean gum (LBG) and PKM increased the mannanase productivity of the YB-1106, while the xylanase productivity of the isolate was increased by wheat bran, oat spelt xylan, rice bran and xylose. Particularly, maximum mannanase and xylanase activities were obtained in the culture filtrate of tryptic soy broth supplemented with 1% LBG or 2% wheat bran, respectively. Both enzyme activities were produced at stationary growth phase. The mannanase of culture supernatant was the most active at 50°C and pH 6.0, while xylanase of culture supernatant was the most active at 55°C and pH 6.5. The predominant products resulting from the mannanase or xylanase hydrolysis were oligosaccharides for LBG or xylan, respectively.

Keywords: *Microbacterium* sp., mannanase, productivity, property, xylanase

Hemicellulose는 고등 육상식물의 세포벽을 구성하는 다당류로 리그닌과 cellulose 사이에 결합하여 배열해 있으며 xylan과 mannan이 주요 구성물질이다. 식물성 바이오매스 자원인 hemicellulose는 목재에서 cellulose 다음으로 풍부한 성분일 뿐 아니라 곡물에도 다량 함유된 비전분성 다당류로 이를 효소적으로 분해하여 발효 가능한 당으로 전환하거나(1), 사료영양 효율을 개선시키는 연구가 활발히 진행되고 있다(6).

Xylan의 기본골격인 β -D-1,4-xylopyranosyl 결합을 무작위로 가수분해하는 β -1,4-xylanase (xylanase)와 mannan 다당류의 기본 구성당인 mannose간의 β -1,4-mannosyl 결합을 무작위적으로 분해하는 β -1,4-mannanase (mannanase)는 hemicellulose 분해에 가장 중요한 역할을 하는 효소로 알려져 있으며(2) 그 유용성이 높아지고 있다. 세균과 곰팡이에서 다수의 xylanases와 mannanases 효소와 그 유전자에 대한 특성이 규명되었는데, mannanase는 대부분이 glycosyl hydrolase (GH) family 5와

26에 속하며 GH26에는 주로 세균성 효소가 대부분을 차지하고, GH5의 효소로는 곰팡이 유래 또는 세균 유래 효소가 포함되어 있으며, xylanase는 대부분의 효소가 GH 10과 11에 속해 있다. *Microbacterium*속의 미생물로 xylan 분해균(10), chitosanase 생산균(15), α -glucosidase 생산균(14), cellulase 생산균(12) 등이 분리된 바 있지만 mannan 분해균에 대한 보고는 없으며, 또한 xylanase와 mannanase에 대한 연구도 거의 이루어진 바 없다. 따라서 본 연구에서는 농후배양을 통해 분리한 hemicelluloses에 대한 분해능을 갖는 *Microbacterium*속 분리균의 xylanase와 mannanase 생산성과 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Hemicellulases 생산균의 탐색

국내 밭 토양시료를 채취하여 0.25%의 밀기울과 palm kernel meal (PKM)이 첨가된 SMM 배지[0.2% (NH₄)₂SO₄, 1.4%

* For correspondence. E-mail: ykh@wsu.ac.kr; Tel.: +82-42-630-9742; Fax: +82-42-636-2676

K₂HPO₄, 0.6% KH₂PO₄, 0.1% trisodium citrate·H₂O, 0.02% MgSO₄·7H₂O에 접종하여 30°C에서 약 4일간 진탕 배양하고 동일한 배지에 3-4일 간격으로 3회 계대 배양을 실시하였다. 계대배양액을 0.25% oat spelt xylan과 0.25% locust bean gum (LBG)가 탄소원으로 첨가된 SMM 평판배지에 도말하여 30°C에서 콜로니가 형성될 때까지 배양하였다.

분리균의 16S rRNA 유전자 염기서열분석

분리균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 총 염색체 DNA를 주형으로 하고, 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 8-27), 5'-GG TTACCTTGTACGACTT-3' (*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열 1492-1510)을 프라이머로 사용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 실시하였다. PCR 반응액의 조성은 주형 DNA (20 ng), 10 mM Tris (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 50 pmol primers와 2.5 U *Pfu* polymerase로 구성하여 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 50초간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 정제하여 ABI PRISM BigDye terminator cycle sequencing kit와 373A automatic DNA sequencer (Perkin Elmer Co., USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

효소 활성 측정

Mannanase 활성은 LBG를, xylanase 활성은 oat spelt xylan을 기질로 하여 각각 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법(7)으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1% (w/v) LBG 용액 또는 xylan 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate (pH 6.5/6.0) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 적정 온도에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 용액 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Mannose 또는 xylose를 표준시료로 사용하여 동일조건에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건에서 1분 동안 LBG 또는 xylan으로 부터 1 μmol의 mannose 또는 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

활성염색

조효소액을 SDS-PAGE한 후 polyacrylamide gel에서 SDS를 제거하기 위해 25% isopropanol를 포함한 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)로 세척한 후 동일완충액에 15-30분간 방치하였다. Polyacrylamide gel을 꺼내어 동일한 완충용액에 0.2% xylan 또는 0.2% konjac과 1.5% agar를 녹여 제조한 gel을 증충하여 비닐로 봉입한 후 40°C에서 일정시간 반응시킨 후 증충한 gel을 congo red로 염색하여 분해된 부분을 관찰하였다.

반응산물 분석

농산부산물물을 기질로 하여 과량의 효소를 첨가하고 40°C에서 반응액의 pH는 최적으로 조절하여 4시간 반응을 수행하였다. 반응 후에 반응액을 3분 동안 95°C에서 열처리한 후 원심 분리하여 단백질 침전물을 제거하고 상등액을 적정량 취해 chloroform, acetic acid와 증류수[4.3:5:0.7, (v/v)] 혼합용액을 전계용액으로 하여 silica gel-precoated thin layer plate (Merck Kiesegel, No. 5748)에서 박층 크로마토그래피를 수행하였다. 전개된 물질을 발색시키기 위해서는 9 ml ethanol, 0.5 ml *p*-anisaldehyde, 0.5 ml sulfuric acid와 glacial acetate 몇 방울을 혼합한 발색제 용액을 뿌린 후, 120°C에서 10분간 방치하였다.

결과 및 고찰

농후배양을 통한 hemicellulases 생산균의 탐색

작물재배 토양의 토착미생물 중에서 xylanase나 mannanase를 생산함으로써 hemicellulose를 분해하는 미생물을 탐색하기 위해서 xylan 성분을 포함하고 있는 밀기울과 mannan 성분을 포함하고 있는 PKM을 최소배지인 SMM에 유일 탄소원으로 첨가하여 작물재배 토양을 첨가한 후 30°C에서 진탕 배양하고 일정기간 마다 동일배지에 계대 배양함으로써 hemicellulose의 분해능을 갖는 미생물을 농후배양하였다. 농후배양액을 xylan과 LBG를 유일탄소원으로 첨가한 평판배지에 도말하여 성장한 콜로니를 선발한 후 고분자 물질을 분해할 수 있는지 분석하기 위해 0.5% oat spelt xylan, 1% skim milk, 0.2% potato starch, 1% tributyrin과 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC)를 각각 첨가한 LB 평판배지에서 48시간 배양하여 분해환을 조사한 결과, hemicelluloses 성분인 xylan과 LBG에 대한 분해능이 있는 분리균 YB-1106은 전분의 분해능은 높았으나, CMC, 단백질 및 tributyrin은 분해하지 못하는 것으로 확인되었다.

그람양성 무포자 단간균으로 확인된 분리균 YB-1106으로부터 1,399 bp 크기의 16S rRNA 유전자 서열을 결정하여 (GenBank accession No. JN664949) 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과, *Microbacterium arabinogalactanolyticum* DSM 8611과 98% 상동성을 보였으며 (GenBank accession No. NR_044932), *M. paraoxydans* CF36 (NR_025548), *M. foliorum* (NR_025368)과 *M. esteraromaticum* DSM 8609 (NR_026468)와 97% 수준의 상동성을 보였다. 따라서 분리균 YB-1106은 *Microbacterium* 속에 속하는 균으로 판단되었다.

부가탄소원에 따른 효소 생산성

Xylanase와 mannanase는 hemicellulose를 분해하는 주요 효소이므로 분리균 YB-1106이 생산하는 xylanase와 mannanase의 활성을 조사하였다. 미생물 유래의 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄수화물 성분에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으며, *Microbacterium* 속 균주에서도 colloidal chitosan

Table 1. Effects of additional carbon sources on the mannanase and xylanase production of *Microbacterium* sp. YB-1106

Additional carbon sources	Cell growth (OD ₆₀₀)	Mannanase productivity (U/ml)	Xylanase productivity (U/ml)
None	5.9	0.12	0.17
Glucose	6.8	0.15	0.34
Glycerol	7.1	0.12	0.18
Lactose	8.5	0.14	0.18
Maltose	4.0	0.12	0.43
Sucrose	5.4	0.13	0.19
Xylose	5.4	0.12	0.99
α-Cellulose	ND	0.12	0.46
Locust bean gum	ND	1.32	0.30
Oat spelt xylan	ND	0.12	1.36
Palm kernel meal	ND	0.45	0.27
Rice bran	ND	0.14	1.16
Rice straw	ND	0.14	0.39
Wheat bran	ND	0.18	1.51

ND, not determined.

이 chitosanase 생산성을 증가시키거나(15) CMC가 cellulase의 생산성을 증가시킨다는 사실이 보고되었다(12). 따라서 분리균 YB-1106의 hemicellulases 생산성에 탄수화물이 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 액체배지를 기본배지로 하여 부가 탄소원을 0.5% (w/v)가 되도록 각각 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 후 배양상등액에 존재하는 xylanase와 mannanase 활성을 조사한 결과, Table 1에 보인 바와 같이 xylanase 뿐만 아니라 농산부산물인 밀기울과 미강이 첨가된 배지에서 xylanase의 생산성이 크게 증가하였으며 대부분의 단당류나 이당류는 효소 생산에 크게 영향을 미치지 않았으나, xylose가 첨가된 배지에서도 xylanase 생산성이 크게 증가하였다.

한편 mannanase의 생산성은 LBG를 첨가한 배지에서 크게 증가하였으며 PKM이 첨가된 배지에서도 효소 생산량이 약간 증가하였다. LBG를 첨가한 배지에서 mannanase의 생산성이 증가된 경우는 *Bacillus* 균주 등에서 다수 보고된 바 있으며 (4), PKM에 의한 mannanase 생산성이 증가되는 현상은 *Streptomyces galbus*에서 보고되었다(3). 또한 xylan이나 밀기울에 의해 *Bacillus pumilus*에서 xylanase의 생산성이 증가되었고(8) xylose에 의해서 *B. subtilis* AMX-4의 xylanase 생산성이 크게 증가하는 것으로 밝혀졌다(19). 또한 배지에 유일 탄소원으로 lactose를 첨가하였을 때 *Microbacterium* sp.의 cellulase 생산성도 크게 증가한다고 보고되었다(12).

LBG가 PKM보다 분리균 YB-1106의 mannanase 생산성을 더 크게 증가시키므로 LBG의 첨가량을 달리한 LB 배지에서 분리균을 배양한 후 배양상등액에 존재하는 mannanase의 활성을 조사한 결과 1.0% 첨가할 때 까지는 첨가량에 따라 효소 생산량이 서서히 증가하였으나, 1.5% 이상 첨가된 배지에서는 효소 생산성이 급감하여 배양상등액에서 거의 효소활성

Table 2. Effects of various amounts of LBG or wheat bran on mannanase or xylanase production of *Microbacterium* sp. YB-1106

Additional amount (%) of LBG	Mannanase productivity (U/ml)	Additional amount (%) of wheat bran	Xylanase productivity (U/ml)
None	0.12	None	0.17
0.1	1.01	0.1	0.87
0.3	1.05	0.3	1.30
0.5	1.11	0.5	1.49
0.7	1.22	0.7	2.84
1.0	1.75	1.0	3.34
1.5	ND	1.5	3.97
2.0	ND	2.0	5.76

ND, not determined.

이 관찰되지 않았다. 또한 xylanase의 생산성을 가장 많이 증가시킨 밀기울의 첨가량을 달리하여 배양한 후 효소 생산성을 분석한 결과 2% 첨가할 때까지 지속적으로 증가하는 현상을 보였다(Table 2). 한편 LB, tryptic soy broth, nutrient broth에 밀기울(2%) 또는 LBG (1%)을 각각 첨가하여 분리균의 효소 생산성을 조사한 결과 다른 배지에서 보다 TSB 배지에서 두 효소의 생산성이 모두 높았다(결과 미제시).

그러므로 LBG (1%)를 첨가한 TSB 배지에서 배양시간에 따른 mannanase 생산성을 조사한 결과 LBG를 첨가하지 않았을 때는 균의 성장이 정지기 후반에 이르기 까지 효소 생산이 거의 되지 않았으나, LBG를 첨가한 배지에서는 정지기 중반에 효소 생산이 급격하게 증가하는 것이 확인되었는데 이는 배양 중 초기에 YB-1106에 의해 낮은 양으로 생산된 mannanase가 배양액의 LBG를 분해함으로써 그 분해산물이 배양 후기에 mannanase의 생산 유도하는데 작용한 것으로 추정된다(Fig. 1A). 밀기울 (2%)을 첨가한 TSB 배지에서는 xylanase 생산성이 정지기 후반에 급격하게 증가하였는데 이는 mannanase 생산성이 증가한 배양시간 보다는 4-6시간 더 늦은 시간이다(Fig. 1B). 이와 같이 정지기에 이르렀을 때 hemicellulases의 생산성이 급격하게 증가하는 현상은 균의 성장과 연계하여 효소 생산성이 증가하는 *Bacillus*속 균주와는 다른 양상인데(4), 배양시간이 10일이 되었을 때 cellulase 생산성이 최대에 이르는 *Microbacterium* sp.에 비해서는 분리균의 hemicellulases 생산성이 빠른 편이라 판단된다(12).

한편 각각의 배지에서 분리균의 배양상등액을 농축한 후 활성염색을 실시한 결과 밀기울을 첨가한 배지에서는 약 38 kDa에 해당하는 xylan 분해 활성단백질이 관찰되었고, LBG를 첨가한 배지에서는 50 kDa 이상 크기의 konjac 분해활성 단백질이 3개 확인되었다(Fig. 2). 분리균의 xylan 분해활성 단백질의 분자량은 *B. subtilis* AMX-4의 xylanase (23 kDa) (17) 보다는 크지만 *Cellulosimicrobium* sp. HY-12의 xylanase (39 kDa) (9)와 비슷한 수준이다. Konjac은 mannanase와 cellulase에 의해 모두 분해되므로 활성염색에서 konjac 분해 단백질로 밝혀진 3개 활성단백질이 모두 mannanase라고 할

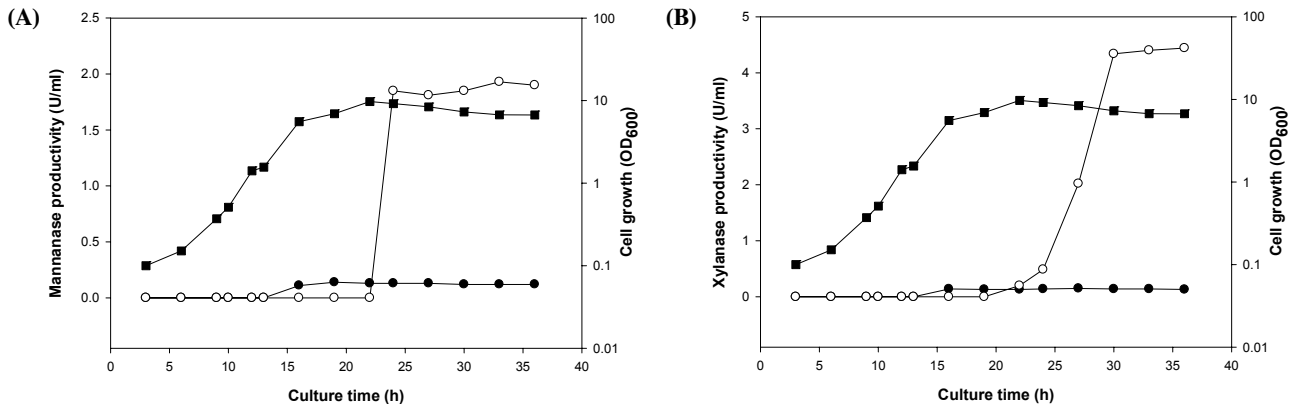


Fig. 1. Production of mannanase (A) or xylanase (B) by *Microbacterium* sp. YB-1106 and its growths. The isolate was grown respectively in TSB broth supplemented with or without LBG (1%) for mannanase production and with or without wheat bran (2%) for xylanase production. Cell growths (squares) were observed in the media without additional carbon sources (closed symbols), culture media containing additional carbon sources including LBG and wheat bran were used for enzyme production (open symbols). Enzyme activities (circles) in the culture filtrates were determined in the optimal reaction conditions. Each curve represents the average of three independent experiments

수는 없으나, 분리균 YB-1106은 CMC 분해활성이 없는 것으로 확인되었으므로 활성염색에서 나타난 konjac 분해는 mannanase 활성에 의한 것으로 추정된다. 따라서 분리균이 생산하는 mannanases는 다수의 세균이 생산하는 35-40 kDa 크기의 mannanases와는 달리 *Rhodothermus marimus*가 생산하는 mannanases와 같이 크기가 큰 효소로 추정된다(11).

효소 반응특성

배양상등액을 ammonium sulfate로 처리한 후 투석하여 제조한 조효소액을 사용하여 반응 pH와 온도가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 xylanase의 최적반응 온도는 55°C, pH는 6.5로 확인되었으며, sodium phosphate 완충용액보다는 Tris 완충용액에서 활성이 높았고 mannanase는 50°C와 pH 6.0에서 최대 활성을 보였다. 조효소액을 여러 온도에서 각각 1시간 방치한 후에 잔존활성을 측정한 결과 xylanase와 mannanase는 40°C에서는 90% 이상의 활성을 유지하였으나 50°C 이상에서는 급격하게 실활되어 10% 미만의 활성만 보였다(결과 미제시). 한편 *Microbacterium* sp. OU01이 생산하는 2 종류의 chitosanases는 pH 6.2와 50°C, pH 6.6과 60°C에서 각각 최대활성을 보이며(16), *M. laevaniformans*의 levanbiohydrolase는 pH 6.0과 30°C에서 최대활성을 갖는 것으로 보고되었는데(13) 이해보아 *Microbacterium*속 균주가 분비 생산하는 고분자물질 분해효소의 반응은 주로 pH 6.0-6.5 범위에서 활성이 높은 것으로 추정된다.

분리균의 효소에 의한 농산부산물의 분해산물을 조사하기 위해 조효소액을 사용하여 미강, 밀기울, PKM 및 xylan과 LBG을 분해한 후 생성된 분해산물을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4에 보인 바와 같이 mannanase 조효소액에 의한 LBG의 주요 분해산물로 mannotriose와 mannobiose 사이의 이동도를 보이는 물질이 생성되었으며, PKM, 미강과 밀기울도 mannanase

에 분해되어 mannotriose 보다 이동도가 큰 분해산물이 관찰되었다. Xylanase 조효소액에 의한 xylan 분해산물 중에서는 xylobiose와 xylose 사이의 이동도를 보이는 물질이 주요 반응산물로 확인되었으며, 미강과 밀기울 분해물질에서는 xylotriose와 이동도가 유사한 물질이 주요산물로 생성되었다. 그러나 PKM은 xylanase에 의해서 관찰 가능한 수준으로 분해산물이 생성되지 않았다. 그리고 분리균이 생산하는 mannanase 또는 xylanase에 의한 LBG 또는 xylan의 분해산물 중 mannose 혹

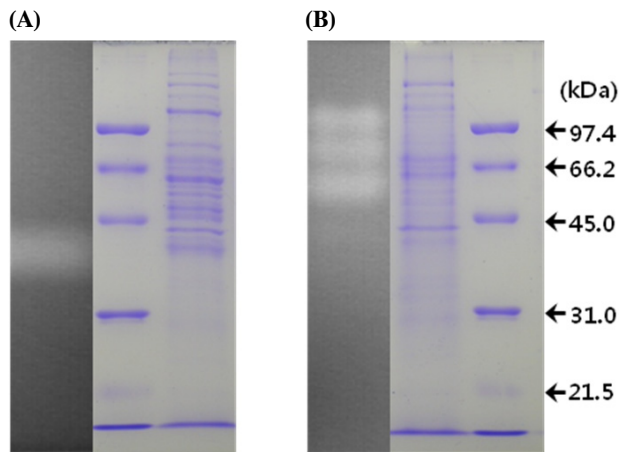


Fig. 2. Zymograms of the mannanase and xylanase produced by *Microbacterium* sp. YB-1106. After SDS-PAGE of the concentrated filtrates of *Microbacterium* sp. cultures grown in TSB broth containing wheat bran for xylanase production (A) or PKM for mannanase production (B), respectively, proteins exhibiting mannanase or xylanase activity were analyzed by activity staining with oat spelt xylan or konjac as substrates. Molecular size is shown in kilodaltons to the right side of the gel.

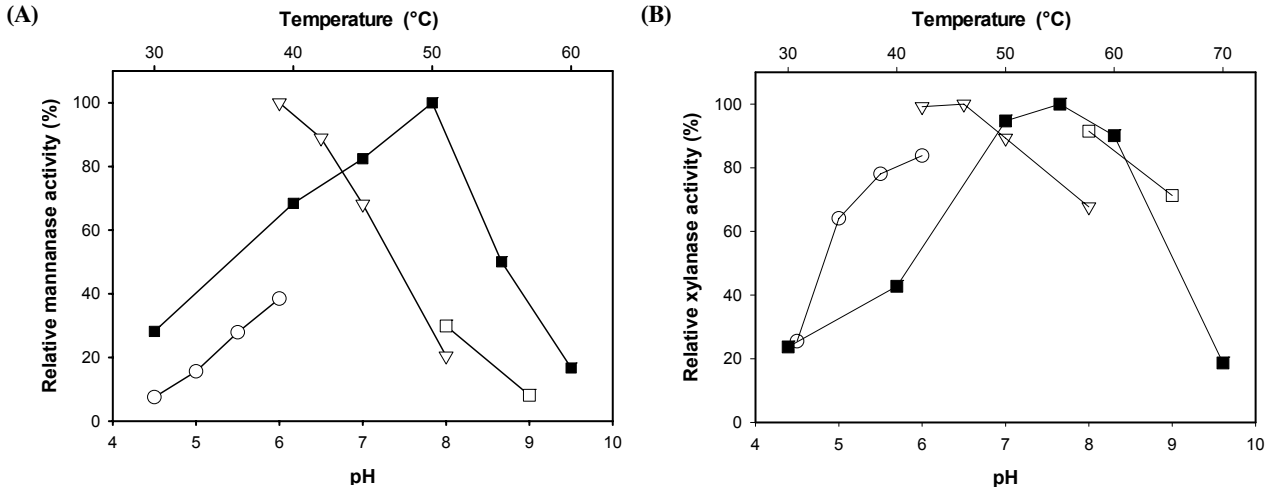


Fig. 3. Effects of reaction temperature and pH on the enzyme activities. Temperature profiles (close symbols) were obtained by measuring the mannanase activity with a fixed pH 6.0 and xylanase activity with a fixed pH 6.5 at different temperatures. The pH profiles (open symbols) were obtained by measuring the enzyme activities at various pH's and at a constant temperature of 50°C. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (pH 3-6; -○-), sodium phosphate (pH 6-8; -▽-), and Tris (pH 8-9; -□-). Each curve represents the average of three independent experiments.

은 xylose는 탐지되지 않았는데, 이는 xylan으로부터 분해산물로 xylose를 비롯한 자일로올리고당을 생성하는 *Bacillus licheniformis*의 xylanase (5), LBG로부터 mannose를 비롯한 만노올리고당을 분해산물로 생성하는 *B. subtilis* WL-3의 mannanase (18)와는 다른 특성으로 보인다.

적요

유일 탄소원으로 palm kernel meal (PKM)과 밀기울을 함

유한 최소화배지에서 농후배양하여 작물 재배 토양으로부터 xylan과 locust bean gum (LBG)에 대한 분해활성이 있는 균을 분리하였다. 분리균 YB-1106의 16S rRNA 유전자 염기서열을 조사한 결과 *Microbacterium arabinogalactanolyticum*와 98% 유사도를 보였다. 분리균의 xylanase는 밀기울, oat spelt xylan, 미강 및 xylose와 같은 부가탄소원에 의해 생산성이 증가된 반면에 mannanase는 LBG와 PKM에 의해 생산성이 증가되었다. 특히 Xylanase는 밀기울 2%를 첨가한 배지, mannanase는 1% LBG를 첨가한 배지에서 각각 생산성이 가

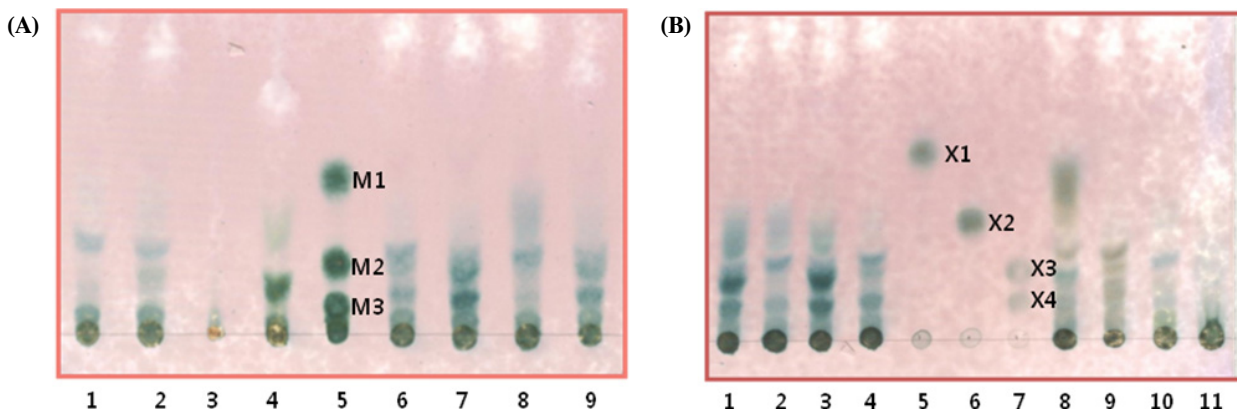


Fig. 4. Thin-layer chromatograms of hydrolysis products of various substances with the concentrated culture filtrates showing mannanase activity (A) and xylanase activity (B). The reaction mixtures containing the culture filtrates and substrates in 40 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were incubated for 4 h at 40°C. (A) Lanes: 1 and 2, PKM hydrolysates before and after reaction; 3 and 4, LBG hydrolysates before and after reaction; 6 and 7, wheat bran hydrolysates before and after reaction; 8 and 9, rice bran hydrolysates before and after reaction; 5, authentic standards including mannose (M1), mannobiose (M2) and mannotriose (M3). (B) Lanes: 1 and 2, rice bran hydrolysates after and before reaction; 3 and 4, wheat bran hydrolysates after and before reaction; 8 and 9, oat spelt xylan hydrolysates after and before reaction; 10 and 11, PKM hydrolysates after and before reaction. Authentic standards: lanes 5, xylose (X1); 6, xylobiose (X2); 7, xylotriose (X3) and xylo-tetraose (X4).

장 높았으며 모두 정지기에서 생산이 되었다. 분리균의 배양 상등액은 50°C와 pH 6.0에서 mannanase의 최대활성을 보였으며, 55°C와 pH 6.5에서 xylanase의 최적반응 활성을 나타냈다. Mannanase에 의해 분해된 LBG와 xylanase에 의해 분해된 xylan으로부터 각각 분해산물로 올리고당이 관찰되었다.

참고문헌

- Berlin, A., V. Maximenko, N. Gilkes, and J. Saddler. 2007. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 97, 287-296.
- Franco, P.F., H.M. Ferreira, and E.X. Filho. 2004. Production and characterization of hemicellulase activities from *Trichoderma harzianum* strain T4. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40, 255-259.
- Kansoh, A.L. and Z.A. Nagieb. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 103-114.
- Kweun, M.A., H.S. Kim, M.S. Lee, J.H. Choi, and K.H. Yoon. 2003. Mannanase production by a soybean isolate, *Bacillus subtilis* WL-7. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 277-283.
- Liu, M.Q. and G.F. Liu. 2008. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expr. Purif.* 57, 101-107.
- Meng, X., B.A. Slominski, C.M. Nyachoti, L.D. Campbell, and W. Guenter. 2005. Degradation of cell wall polysaccharides by combinations of carbohydrase enzymes and their effect on nutrient utilization and broiler chicken performance. *Poult. Sci.* 84, 37-47.
- Miller, M.L., R. Blum, W.E. Glennon, and A.L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* 2, 127-132.
- Nagar, S., V.K. Gupta, D. Kumar, L. Kumar, and R.C. Kuhad. 2010. Production and optimization of cellulase-free, alkali-stable xylanase by *Bacillus pumilus* SV-85S in submerged fermentation. *J. Ind. Microbiol.* 37, 71-83.
- Oh, H.W., S.Y. Heo, D.Y. Kim, D.S. Park, K.S. Bae, and H.Y. Park. 2008. Biochemical characterization and sequence analysis of a xylanase produced by an exo-symbiotic bacterium of *Gryllotalpa orientalis*, *Cellulosimicrobium* sp. HY-12. *Antonie van Leeuwenhoek* 93, 437-442.
- Okeke, B.C. and J. Lu. 2011. Characterization of a defined cellulolytic and xylanolytic bacterial consortium for bioprocessing of cellulose and hemicelluloses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163, 869-881.
- Politz, O., M. Krah, K.K. Thomsen, and R. Borriss. 2000. A highly thermostable endo-(1,4)- β -mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 715-721.
- Sadhu, S., P. Saha, S. Mayilraj, and T.K. Maiti. 2011. Lactose-enhanced cellulase production by *Microbacterium* sp. isolated from fecal matter of zebra (*Equus zebra*). *Curr. Microbiol.* 62, 1050-1055.
- Song, E.K., H. Kim, H.K. Sung, and J. Cha. 2002. Cloning and characterization of a levanbiohydrolase from *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953. *Gene* 291, 45-55.
- Srinivasan, S., M.K. Kim, G. Sathiyaraj, Y.J. Kim, S.K. Jung, J.G. In, and D.C. Yang. 2009. *Microbacterium* soli sp. nov., an α -glucosidase-producing bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60, 478-483.
- Sun, Y., B. Han, W. Liu, J. Zhang, and X. Gao. 2007. Substrate induction and statistical optimization for the production of chitosanase from *Microbacterium* sp. OU01. *Bioresour. Technol.* 98, 1548-1553.
- Sun, Y., W. Liu, B. Han, J. Zhang, and B. Liu. 2006. Purification and characterization of two types of chitosanase from a *Microbacterium* sp. *Biotechnol. Lett.* 28, 1393-1399.
- Yoon, K.H. 2009. Cloning of a *Bacillus subtilis* AMX-4 xylanase gene and characterization of the gene product. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1514-1519.
- Yoon, K.H., S. Chung, and B.L. Lim. 2008. Characterization of the *Bacillus subtilis* WL-3 mannanase from a recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* 46, 344-349.
- Yoon, K.H., S.J. Seol, H.C. Cho, M.S. Lee, J.H. Choi, and K.H. Cho. 2002. Isolation and enzyme production of a xylanase-producing strain, *Bacillus* sp. AMX-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 123-128.