

*Deinococcus geothermalis*의 Xylan 최적 분해조건 및 분해산물 분석

임성훈^{1,2} · 조민호¹ · 정선욱^{1,3} · 임상용¹ · 송현파¹ · 김동호^{1*}

¹한국원자력연구원 방사선생명공학연구부, ²전남대학교 바이오에너지 및 바이오소재 협동과정,

³충남대학교 생명과학과 분자세포생물학 및 발생유전학

Characteristics of Xylan Degradation and HPLC Analysis of Hydrolyzed Xylans by *Deinococcus geothermalis*

Seong-Hun Im^{1,2}, Min-Ho Joe¹, Sun-Wook Jung^{1,3}, Sang-Yong Lim¹, Hyun-Pa Song¹, and Dong-Ho Kim^{1*}

¹Radiation Research Division for Biotechnology, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongseup 580-185, Republic of Korea

²Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy and Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

³College of Biological Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea.

(Received August 4, 2010/Accepted September 28, 2010)

Deinococcus geothermalis is a moderate thermophilic radiation resistant bacterium producing greater abundance of sugar metabolism enzymes than other *Deinococcus* species. In this study, optimal condition for xylanolytic activity of *D. geothermalis* was determined and xylooligosaccharides from oat spelt, beechwood, and birchwood xylan hydrolysates by this organism were analyzed through HPLC. Reducing sugar yield was increased in the order of beechwood, birchwood, and oat spelt xylan. *D. geothermalis* displayed maximal xylanolytic activity at 40°C and pH 8.0. Magnesium ion increased xylanolytic activity upto 7.5 fold. Six kinds of xylooligosaccharides (xylose, xylobios, xylotriose, xyloetraose, xylopentaose, and xylohexalose) were detected from beechwood and birchwood xylan reaction products. Among them, xylose was the major product. However, only three kinds of xylooligosaccharides (xylose, xylopentaose, and xylohexalose) were clearly detected from oat spelt xylan. Gamma-ray (50 kGy) treatment of beechwood xylan, birchwood xylan and oat spelt xylan increased xylanolytic activity of *D. geothermalis*. The results indicate that *D. geothermalis* and pretreatment of radiation is useful for xylooligosaccharides production.

Keywords: *D. geothermalis*, gamma radiation, xylan, xylooligosaccharides

화석연료의 과도한 소비에 따른 지구 온난화와 유가상승이 지속됨에 따라 석유를 대체할 수 있는 바이오에너지에 대한 관심이 크게 높아지고 있다(10, 25). 자연계에 풍부하게 존재하는 식물성 유기자원은 cellulose, hemicellulose 및 lignin으로 구성되어 있으며, 이러한 식물성 유기자원으로부터 유용한 화학물질, 식량 및 에너지로 이용하기 위한 연구가 전 세계적으로 활발하게 진행되고 있다(3, 24). Cellulose 다음으로 자연계에 많이 존재하는 hemicellulose의 주성분인 xylan은 최근 대체에너지원인 에탄올 생산 기질뿐만 아니라 xylitol과 같은 감미료의

생산원료로서도 이용이 기대되고 있는 중요한 식물성 유기자원이다. 자연계에 존재하는 xylan은 매우 복잡한 구조를 가지고 있다. β -1,4 polyxylose의 주결합구조에 acetyl, arabinosyl 및 glucuronyl 등의 잔기가 결합된 다양한 결합구조 가지고 있을 뿐만 아니라, xylan 분자 상호간 또는 xylan 분자와 lignin 분자가 서로 교차결합 되어있다. 이와 같은 복잡한 구조의 xylan을 효율적으로 가수분해하려면 결합된 분자를 효과적으로 절단하는 ferulic acid esterase와 acetyl xylan esterase, α -arabinofuranosidase, glucuronidase 등의 효소와 β -1,4 주결합구조 절단에 필수 분해 효소인 xylanase와 β -xylosidase 등과 같은 효소의 협동작용이 필요한 것으로 보고되고 있다(13, 24).

* For correspondence. E-mail: fungikim@kaeri.re.kr; Tel: +82-63-570-3200; Fax: +82-63-570-3149

Xylan의 기본골격을 분해하여 xylooligosaccharides로 전환시키는 효소로서 xylan의 가수분해 과정에서 가장 중요한 역할을 하는 xylanase는 곰팡이나 세균과 같은 미생물뿐만 아니라 식물체, 곤충 그리고 원생동물 등 자연계에 광범위하게 존재한다고 보고되고 있다(14, 18, 20, 22). Xylan의 분해산물의 일종인 xylooligosaccharides는 2-6개의 xylose가 결합된 다당류로서 온화감미를 갖는 시럽 또는 분말상 물질이며 *Bifidus*, *Lactobacillus* 등과 같은 장내 유용미생물을 선택적으로 증식시킴으로서 장기능을 개선시키는 기능성 식품소재로도 이용되고 있다(1, 2, 8).

효소가수분해의 효율을 높이기 위해 식물성 유기자원의 복잡한 결합구조를 약하게 하여 효율적인 가수분해를 위해 전처리 방법에 대한 연구가 오래 전부터 활발하게 진행되고 있다(14). 전처리 방법의 종류에는 기계적 분쇄를 통해 효소가 반응할 수 있는 표면적을 넓히는 물리적 방법(21, 22)과 산과 알칼리를 이용하는 화학적인 방법(5, 9, 19)이 많이 이용되고 있다. 하지만 처리비용이 비싸고 전처리 후 발생하는 부산물이 발효공정의 효율을 억제시키는 단점으로 인해 전처리 방법으로 적합하지 않다는 주장이 제기 되었다(7, 17). 그러나 방사선 조사를 이용한 방법은 전처리 후 부산물이 생성되지 않고 짧은 시간 내에 생물자원의 복잡한 결합구조를 약하게 함으로써 효소의 침투를 원활하게 할 수 있는 전처리 방법으로 알려져 있다(4, 15, 26).

제지공장에서부터 분리된 중호열성 방사선저항성 미생물인 *D. geothermalis*는 최근 유전체의 전체 염기서열이 밝혀졌고, 염기서열 분석결과 다른 *Deinococcus* 속과 비교해 당대사 작용에 관여하는 유전자가 풍부하게 존재한다고 보고되고 있다(11). 하지만 이 미생물을 이용한 xylan의 가수분해 및 분해산물을 분석한 연구는 아직까지 연구된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 *D. geothermalis*에 의한 xylan의 효율적인 가수분해를 위해 최적 분해조건을 확인하였고, 최종 분해산물을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 또한 방사선 조사 후 환원당 분석을 통해 방사선 조사가 효소당화에 미치는 영향에 대하여 확인하였다.

Xylan 분해활성 및 최적 가수분해 조건

D. geothermalis (DSM 11300)는 한국농업미생물 자원센터로부터 분양 받았다. 배양시 TGY 배지(tryptone 5.0 g, yeast extract 3.0 g, glucose 1.0 g/L)를 이용하였으며, 필요에 따라 한천(15 g/L)을 첨가하여 50°C에서 배양하였다. *D. geothermalis*의 xylan 분해활성을 측정하기 전 xylan 분해능을 한천배지에서 Gram's Iodine 방법을 이용하여 확인하였다(12). 1%의 xylan (beechwood xylan, birchwood xylan, oat spelt xylan)이 포함되어 있는 Degryse medium 162 minimal (yeast extract 2.5 g, tryptone 2.5 g, nitrilotriacetic acid 1.0 g, CaSO₄·2H₂O 0.4 g, MgSO₄·7H₂O 2.0 g/L, 0.2 M Na₂HPO₄·12H₂O 15 ml, 0.2 M KH₂PO₄ 10 ml, 0.01 M Fe(III) citrate·5H₂O 0.5 ml, pH 7.0 trace element solution 5 ml) 한천배지 위에 *D. geothermalis* 배양액 10 µl를 한천배지 중앙에 접종한 후 50°C

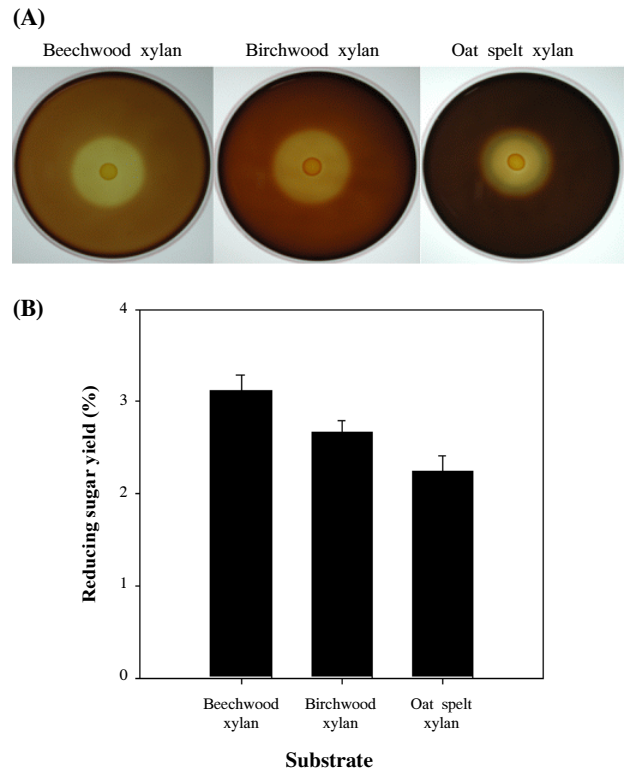


Fig. 1. Detection of saccharolytic activity of *D. geothermalis* on agar plate using Gram's iodine (A). Release of reducing sugars from various xylans by *D. geothermalis*. Samples were incubated at 50°C and pH 7.0 (10 mM sodium phosphate buffer) for 120 h (B). Data are presented as the mean of three individual experiments.

에서 36시간 동안 배양하였고 Gram's Iodine (KI 6 g, iodine 3 g/L)으로 5분간 반응 시킨 후 형성된 환을 확인하였다. *D. geothermalis*는 실험에 이용된 3종류의 xylan (beechwood xylan, birchwood xylan, oat spelt xylan)을 모두 분해할 수 있는 활성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1A). 형성된 환의 크기는 beechwood xylan과 birchwood xylan은 유사하였지만, oat spelt xylan의 환의 크기는 비교적 작게 나타났다.

*D. geothermalis*를 배양한 상등액을 이용하여 xylan의 최적 가수분해 조건을 확인하기 위하여 xylan의 종류(beechwood xylan, birchwood xylan, oat spelt xylan), 온도(30, 40, 50, 60°C) 조건, pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0) 조건, 금속보조인자의 종류 1 mM (MgCl₂, FeCl₂, CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂)에 따라 생성된 환원당을 측정하였다. pH 조절을 위해서 각각 10 mM의 acetic acid buffer (pH 5.0), sodium phosphate buffer (pH 6.0-8.0), Tris-HCl buffer (pH 9.0)를 이용하였다. 환원당은 Miller의 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여 측정하였다. 표준 검량선은 xylose를 이용하여 정량화하여 작성하였다. 실험 결과에 표현된 당화율은 다음과 같이 계산하였다. [DNS 방법으로 측정된 환원당 (g/L)/실험에 이용된 xylan의 농도 (5 g/L)]×100 (%). *D. geothermalis*의 최적 생장온도인 50°C에서 상등액과 xylan을 120시간 동안 반응하여 생성된 당화율을 분석한 결과 각각 beechwood xylan (3.1%), birchwood

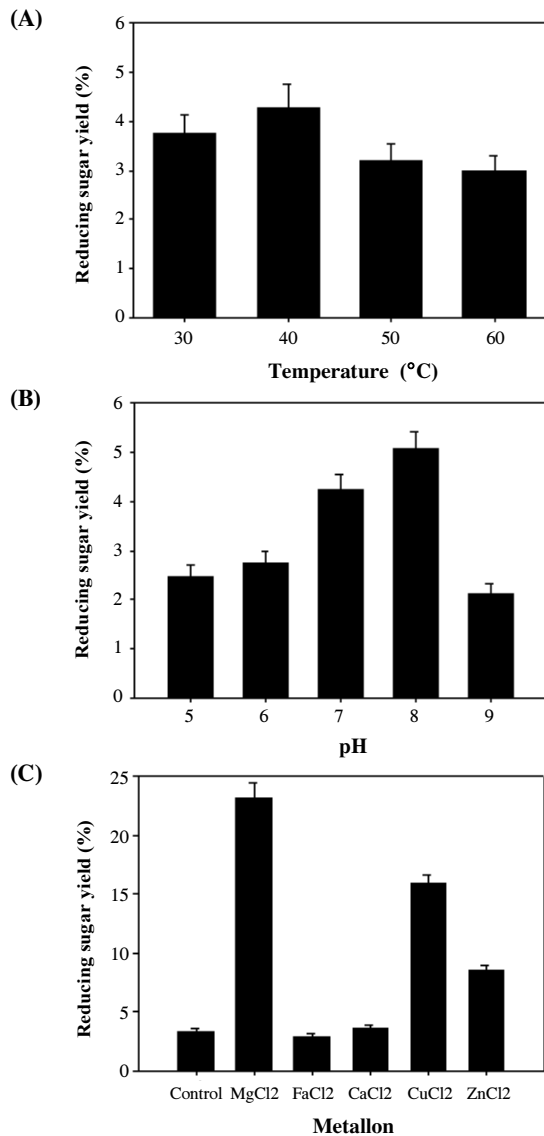


Fig. 2. Release of reducing sugars from beechwood xylan by *D. geothermalis* optimal conditions. Effects of various temperature conditions. Samples were incubated with at pH 7.0 (10 mM sodium phosphate buffer) for 120 h (A). Effects of various pH conditions. Samples were incubated with at 40°C for 120 h. pH control by 10 mM acetic acid buffer (pH 5.0), sodium phosphate buffer (pH 6.0-8.0), Tris-HCl buffer (pH 9.0) (B). Effects of various metal ion conditions. Samples were incubated with at 40°C and pH 8.0 (10 mM sodium phosphate buffer) for 120 h (C). Data are presented as the mean of three individual experiments.

xylan (2.7%) 그리고 oat spelt xylan (2.2%)의 순서로 당화율이 높게 나타났다(Fig. 1B). 따라서 당화율이 가장 높은 beechwood xylan을 기질로 이용하여, 온도에 따른 당화율을 비교한 결과 40°C에서 당화율이 가장 높게 나타났다(Fig. 2A). 당화율은 *D. geothermalis*의 최적성장 온도인 50°C에 비해 40°C에서 약 33% 증가하였다. 이 실험결과를 통해 *D. geothermalis*의 성장온도와 beechwood xylan 가수분해 반응의 최적 온도조건이 차이가 있음을 알 수 있었다. pH 조건에 따라서도 당화율의

차이를 보였다(Fig. 2B). pH 8.0에서 당화율이 약 5.08%로 가장 높게 나타났다. pH 8.0까지는 pH가 증가할수록 당화율이 증가하였지만 pH 9.0에서는 당화율이 감소하였다. 비교적 광범위한 pH 조건에서 환원당이 생성되었지만 산성과 알칼리성에서는 분해가 저해 되는 것을 알 수 있었다. Fig. 2C는 xylan의 가수분해 반응에서 금속보조인자가 미치는 영향에 대해 나타낸 결과이다. 금속이온의 종류를 달리하여 beechwood xylan을 40°C, pH 8.0 조건에서 반응한 후 당화율을 측정하였다. 금속보조인자의 첨가에 따른 당화율은 각각 MgCl₂ (23.4%), CuCl₂ (15.9%), ZnCl₂ (8.5%), CaCl₂ (3.6%) 그리고 FeCl₂ (2.9%) 순서로 증가하였다. 특히 MgCl₂을 첨가하였을 때 당화율이 7.5배 증가하였다. 또한 CuCl₂와 ZnCl₂를 첨가하였을 때에도 당화율이 각각 5.1배, 2.7배 증가하였다. 하지만 FeCl₂와 CaCl₂은 *D. geothermalis*에 의한 xylan의 분해 반응에 영향을 주지 못했다. 이 실험 결과로부터 MgCl₂과 CuCl₂ 그리고 ZnCl₂은 *D. geothermalis*의 xylan 가수분해 반응에서 보조인자로서 작용하는 것으로 나타났다.

Xylan 분해산물 분석

가수분해반응을 통해 분해된 물질은 HPLC (Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석에 이용된 xylan과 xylooligosaccharides 표준물질은 각각 Sigma-Aldrich, USA와 Megazyme, Ireland으로부터 구입하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87P column (Bio-Rad, USA)을 사용하였고, 분석시 column의 온도는 65°C 그리고 유속은 0.8 ml/min로 유지하였다. 이동상은 20 mM의 황산이 포함된 멸균된 증류수를 이용하였으며, RI detector를 이용하여 분석하였다. 최적 가수분해 조건인 40°C, pH 8.0 그리고 MgCl₂를 첨가한 조건에서 *D. geothermalis*와 반응하여 생성된 분해산물을 HPLC로 분석한 결과 beechwood xylan, birchwood xylan을 기질로 이용하였을 경우 xylose (X), xylobiose (X2), xylotriose (X3), xylotetraose (X4), xylopentaose (X5) 그리고 xylohexaose (X6) 모두 생성되었고 반응 생성물 중에서 xylose (X)의 생성량이 가장 높게 나타났다. 또한 oat spelt xylan을 기질로 이용하였을 때에는 xylose (X)와 xylopentaose (X5) 그리고 xylohexaose (X6)가 생성되었다. Oat spelt xylan 역시 반응 생성물 중에서 xylose (X)의 함량이 가장 높게 나타났다(Fig. 3). *D. geothermalis*로부터 모든 종류의 xylooligosaccharides가 생산되는 것을 확인하였다.

방사선 조사의 전처리 효과

Xylan의 복잡한 결합구조를 약하게 하여 효율적인 분해를 위해 전처리 방법으로서 방사선 조사를 하였다. 방사선 조사는 한국원자력연구원의 선원 300 kCi, Co-60 감마선 조사시설(AECL, IR-79, Nordion)을 이용하여 실시하였다. 감마선 조사는 4°C에서 분당 70 Gy 선량율로 각각 1, 5, 10, 30, 50 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였으며, 총 흡수선량의 오차는 ±5% 이내가 되도록 하였다. 이 때 흡수선량의 측정은 5 mm diameter alanine dosimeter (Bruker Instruments, Germany)로 측정하였다. 10 mM 인산완충용액에 용해된 0.5% xylan 용액

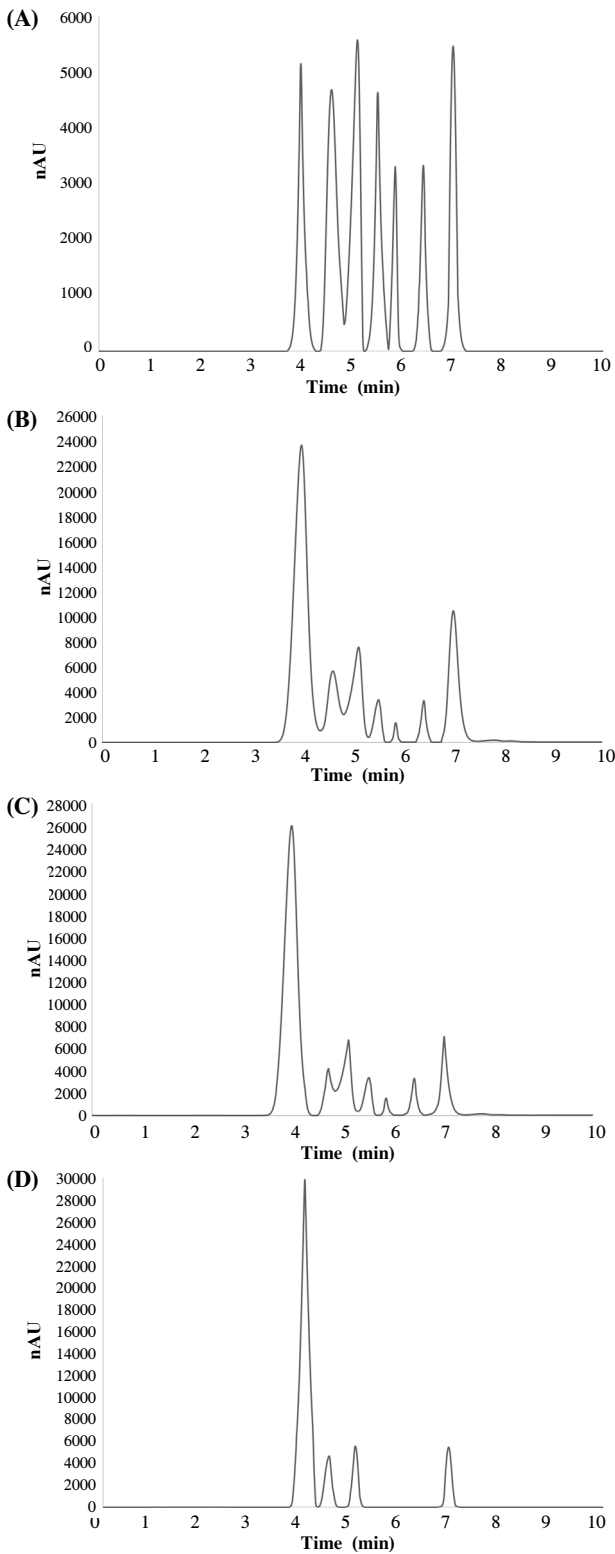


Fig. 3. HPLC analysis of xylooligosaccharides standard samples (A) and the end products of hydrolysis of beechwood xylan (B) using Aminex HPX-87P column. The column was eluted with 20 mM sulfuric acid at a flow rate of 0.8 ml/min at 65°C. (Retention time : xylan-4.2, xylohexalose-4.66, xylopentaose-5.16, xylotetraose-5.56, xylotriose-5.92, xylobiose-6.47 and xylose-7.06 min.)

에 방사선 조사를 이용하여 전처리 하였을 때 xylan으로부터 환원당이 생성되었다. 또한 선량이 증가함에 따라 생성된 환원당의 양이 증가하였다(결과 미제시). 50 kGy의 선량에서 beechwood xylan과 birchwood xylan의 당화율은 18%, oat spelt xylan은 14%로 나타났다(Fig. 4). 방사선 조사를 이용한 전처리 방법은 전처리 후 부산물이 발생하지 않고 짧은 시간 내에 식물성 유기자원의 복잡한 결합구조를 약하게 함으로서 효율적인 전처리 방법으로 이용될 수 있을 것이라고 사료된다. 최적 전처리 조건인 50 kGy의 선량으로 방사선 조사 후 xylan (beechwood xylan, birchwood xylan, oat spelt xylan)의 최적 가수분해 조건에서 반응을 유도한 결과 당화율은 각각 35.5%, 32.1%, 25.6%로 나타났다. 3종류의 xylan 모두 전처리 후 가수분해 반응을 하였을 때 전처리 전보다 환원당의 양이 증가되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 방사선을 이용한 전처리 방법은 *D. geothermalis*를 포함한 xylan 분해 미생물을 이용하여 xylan의 분해를 위해 효율적인 전처리 방법으로 이용될 것으로 사료된다.

적요

대표적인 증호열성 방사선저항성 미생물인 *Deinococcus geothermalis*에는 다른 *Deinococcus* 속과 비교해 당대사 작용에 관여하는 유전자가 풍부하게 존재하는 특징이 있다. 본 연구에서는 *D. geothermalis*를 이용하여 xylan의 최적 분해조건을 확인하였고, beechwood xylan, birchwood xylan 및 oat spelt xylan의 최종 분해산물을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 기질의 종류에 따른 당화율을 비교한 결과 beechwood xylan, birchwood xylan 그리고 oat spelt xylan 순서로 당화율이 높

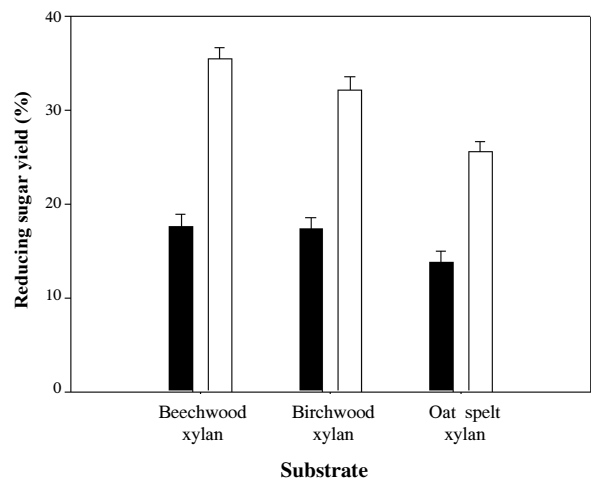


Fig. 4. Effects of the only gamma ray radiation pretreatment on reducing sugar yield of various xylans (Black bar). Release of reducing sugars from various xylans by *D. geothermalis* after the gamma ray radiation (50 kGy). Samples were incubated with at 40°C and 10 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0 in the presence of 0.4 g/L MgCl₂ (White bar). Data are presented as the mean of three individual experiments.

게 나타났다. *D. geothermalis*를 이용한 xylan의 최적 분해조건인 40°C, pH 8.0 그리고 마그네슘 이온을 첨가하였을 때 당화율이 7.5배 증가하였다. Beechwood xylan과 birchwood xylan의 최종 분해산물은 xylose, xylobios, xylotriase, xyloetraose, xylopentaose, 그리고 xylohexalose였으며, xylose의 함량이 가장 높았다. 또한 oat seplt xylan의 최종 분해산물은 xylose, xylopentaose 그리고 xylohexalose가 생성되었다. Xylan의 효율적인 당화를 위하여 전처리 방법으로서 방사선조사를 하였고, 방사선조사 후 *D. geothermalis*에 의한 beechwood xylan, birchwood xylan 그리고 oat spelt xylan의 당화율이 증가하였다. 본 연구를 통하여 *D. geothermalis* 및 방사선을 이용한 전처리 방법이 xylooligosaccharides를 생산하는데 유용함을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 교육과학기술부의 원자력연구개발사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Bajpai, P. 1997. Microbial xylanolytic enzyme system: properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* 43, 141-194.
- Beg, Q.K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G.S. Hoondal. 2001. Microbial xylanase and their industrial application: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 326-338.
- Bhat, M.K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15, 583-620.
- Chosdu, R., N. Hilmy, E.T.B. Erizal, and B. Abbas. 1993. Radiation and chemical pretreatment of cellulosic waste. *Radiation Physics Chemistry* 42, 695-698.
- Esteghlalian, A., A.G. Hashimoto, J.J. Fenske, and M.H. Penner. 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresour. Technol.* 21, 129-136.
- Gupta, S., R.C. Kuhad, B. Bhushan, and G.S. Hoondal. 2001. Improved xylanase production from a haloalkalophilic *Staphylococcus* sp. SG-13 using inexpensive agricultural residues. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 5-8.
- Hendriks, A.T.W.M. and G. Zeeman. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Rev. Bioresource Technol.* 100, 10-18.
- Kenealy, R.W. and T.W. Jevries. 2003. Enzyme processes for pulp and paper: a review of recent developments in wood deterioration and preservation. *American Chem. Soc. Chapter* 12, 210-239.
- Kim, S. and M.T. Holtzaple. 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96, 1994-2006.
- Na, J.B. and J.S. Kim. 2008. The optimum condition of SSF to ethanol production from starch biomass. *Kor. Chem. Eng. Res.* 46, 858-862.
- Makarova, K.S., M.V. Omelchenko, E.K. Gaidamakova, V.Y. Matrosova, A.V. Min Zhai, A.L. Alex Copel, E.K. Miriam Land, K.M. Samuel Pitluck, P.M. Richardson, C.D. Thomas Brettin, and et al. 2007. *Deinococcus geothermalis*: The Pool of extreme radiation resistance genes shrinks. *PLoS ONE* 2(9), e955.
- Kasana, R.C., R. Salwan, H. Dhar, S. Dutt, and A. Gulati. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's Iodine. *Curr. Microbiol.* 57, 503-507.
- Kim, J.Y. 2006. Nucleotide sequence of cellulolytic xylanase gene (bgIBC2) from *Bacillus circulans*. *Kor. J. Microbiol.* 42, 67-72.
- Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 411-456.
- Kumakura, M. and I. Kaetsu. 1983. Radiation and chemical pretreatment of chaff and its effect on enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 18, 14-16.
- McMillan, J.D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass in enzymatic conversion of biomass for fuels production. *American Chem. Soc. Chapter* 15, 292-324.
- Rubin, E.M. 2008. Genomics of cellulosic biofuels. *Rev. Nature* 454, 841-845.
- Siedenberg, D., S.R. Gerlach, K. Schugerl, M.L.F. Giuseppin, and J. Hunik. 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* in synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochem.* 33, 429-433.
- Silverstein, R.A., Y. Chen, R.R. Sharma-Shivappa, M.D. Boyette, and J. Osborne. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour. Technol.* 98, 3000-3011.
- Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 39-67.
- Tassinari, T.H., C.F. Macy, and L.A. Spano. 1982. Technology advances for continuous compression milling pretreatment of lignocellulosics for enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 1495-1505.
- Tenkanen, H., J. Plus, and K. Poutanen. 1992. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14, 566-574.
- Van Wyk, J.P.H., A.M. Mogale, and T.A. Seseng. 2001. Bioconversion of wastepaper to sugars by cellulase from *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride* and *Penicillium funiculosum*. *J. Solid Waste Technol. Manag.* 27, 82-86.
- Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan, and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms; function and applications. *Microbiol. Rev.* 52, 305-317.
- Yang, C., Z. Shen, G. Yu, and J. Wang. 2008. Effect and aftereffect of r radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresour. Technol.* 99, 6240-6245.
- Zhu, S., Y. Wu, Z. Yu, X. Zhang, H. Li, and M. Gao. 2006. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresour. Technol.* 97, 1964-1968.