

## 방선균 *Streptomyces chibaensis* J-59 Xylanase의 정제 및 자일로 올리고당(Xylooligo-Saccharides)의 생산

주길재 · 이인구

경북대학교 농화학과

Production of Xylooligo-Saccharides and Purification of  
Extracellular Xylanase from *Streptomyces chibaensis* J-59

Gil-Jae JOO · In-Koo RHEE

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

### Abstract

*S. chibaensis* J-59 produced an extracellular xylanase in a CSL medium composed of 1.5% corn steep liquor, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.012%  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ , and 0.15% glucose containing xylan, but it did not produce in the culture medium containing xylose. The production of enzyme reached to a maximum level (0.83 units/ml) when bacteria were cultured in 2.5 l jar fermentor for 48hrs at 30°C and pH 7.0. Furthermore, *S. chibaensis* J-59 produced an intracellular glucose isomerase in a medium containing xylan and/or xylose.

Xylanase was purified 29-fold over the culture supernatants of *S. chibaensis* J-59 by ammonium sulfate fractionation, chromatography on DEAE-Sephadex A-50, and gel filtration on Sephadex G-200. The purified enzyme is a monomeric enzyme with a native molecular mass of 25 kDa and a subunit molecular mass of 25 kDa. The purified enzyme requires  $Mg^{2+}$  for activity,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  is not an inhibitor but inhibit by  $Fe^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$ , sodium dodecyl sulfate, *N*-bromosuccinide. Pattern of hydrolysis demonstrated that the xylanase was an endo-splitting enzyme able to break down birchwood xylan at random giving xylobiose, xylotriose and xylotetrose as the main end products.

Key words: *Streptomyces chibaensis*, extracellular xylanase, xylooligo-saccharides

## I. 서 론

Xylan은 식물 세포벽의 구성성분 중의 하나인 hemicellulose의 주요성분이며  $\beta$ -1,4 결합을 한 D-xylose 잔기들로 구성되어 있다. 특히 birchwood에서는 건조중량의 35%가 xylan으로 구성되어 있다(Timell, 1967). 이러한 xylan은  $\beta$ -1,4-xylanase (1,4- $\beta$ -D-xylanohydrolase; E.C. 3. 2. 1. 8)와  $\beta$ -xylosidase (1,4- $\beta$ -xylohydrolase; E.C. 3. 2. 1. 37) 등의 xylan 가수분해 효소에 의하여 최종 xylose로 분해된다. 따라서 농산 폐자원의 주성분인 xylan은 xylooligo 당의 생산 뿐만아니라 alcohol 생산의 기질, butanol 등의 유기용매, xylitol 등의 생산원료로 사용되며 효소생산 유도물질로 이용가능한 중요한 biomass 이다(Song et al., 1987; Ganju et al., 1986).

Xylan 가수분해효소를 생산하는 미생물로는 *Aspergillus niger* (Fukumoto et al., 1970), *Bacillus* sp. (Okazaki et al., 1985), *Clostridium stercorarium* (Berenger et al., 1985), *Trichoderma reesei* (Dekker, 1985)와 *Streptomyces* spp. 등이 있다. 이들 중에서 *Streptomyces* 속으로 *Streptomyces* sp. (Kusakabe et al., 1977; Nakajimas et al., 1984; Marui et al., 1985; Keskar et al., 1989), *S. cyaneus*(Wang et al., 1993), *S. halstedii* (Ruiz-arribas et al., 1995), *S. roseiscleroticus*(Grabski et al., 1991), *S. exfoliatus* (Sreenath et al., 1982), *S. flavogriseus*(Johnson et al., 1984), *S. lividans*(Morosoli et al., 1986), *S. thermoviolaceus* OPC-520(Tsujibo et al., 1992), *S. xylophagus*(Iizuka et al., 1965) 등이 보고 되었다.

일반적으로 xylanase는 cellulase나 포도당 이성화효소(D-xylose isomerase

E.C. 5.3. 1.5, glucose isomerase) 등과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다 (Ishaque and Kluepfel, 1981; Kluepfel et al., 1986).

Xylanase 및 포도당 이성화효소를 동시에 생산하는 균주로는 *S. albus* (Takasaki, 1966), *S. bikiniensis*(Park et al., 1977), *S. pheochromogenes* (Park et al., 1974), *S. flavogriseus*(Han, 1983) 등이 보고 되었고, xylanase 및 cellulase를 동시에 생산하는 균주로는 *S. lividans*(Kluepfel et al., 1986) 등이 보고되었으나 효소들간의 상호작용에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

방선균의 포도당 이성화효소는 유도효소이며 유도물질(inducer)로 D-xylose를 필요로 하고 있다(Tsumura et al., 1965). 따라서 포도당 이성화효소를 생산하는 균주가 xylan 가수분해 효소를 동시에 생산할 수 있다면 유도물질로 사용되는 비싼 D-xylose를 값싼 xylan으로 대체할 수 있을 것이다. 이러한 관점에서 본 연구실에서는 이성화당(HFCS) 제조에 관여하는 포도당 이성화효소의 생산에 xylan을 이용하고자 포도당 이성화효소 및 xylanase를 동시에 생산하는 *Streptomyces chibaensis* J-59를 분리 동정하였고(주 등, 1997a), 포도당 이성화효소 생산최적조건(주 등, 1997b)을 검토한 바 있다.

따라서 본 연구에서는 xylan 가수분해효소 중 먼저 세포의 xylanase를 분리 정제하여 특성을 조사하고, 또한 xylan이 분해되어 생산되는 신 기능성 식품인 xylooligo 당의 생산 양상을 조사하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 주 등(1997)이

낙엽부식토양으로 부터 분리 동정한 *S. chibaensis* J-59 균주를 사용하였고, 균주배양을 위하여 CSL 배지(1% corn steep liquor, 0.15% glucose, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH 7.0)에 효소생산 유도물질로 1% birchwood xylan을 첨가하여 사용하였다.

## 2. 배양방법

*S. chibaensis* J-59는 xylose를 탄송원 및 에너지원으로 이용할 수 없는 xylose negative mutant(주 등, 1997)이므로 탄소원으로는 0.5% glucose를 첨가하였고 효소생산유도물질로는 1% birchwood xylan을 첨가 CSL 배지에 첨가하여 균을 접종하고 분당 120rpm 속도로 진탕하면서 30℃에서 40시간 이상 종배양하였다. 본배양은 상기 동일배지조건으로 jar fermentor(2.5 l, 한국발효기상사)에 종배양액을 10%(w/w)되게 접종하고 공기 주입량은 1 vvm, 교반 속도 400rpm으로 30℃, 48시간 배양하였다. 배양 중 발생하는 거품은 일정량(100ppm)의 소포제(럭키디씨 실리콘(주); DB-110A antifoam emulsion)를 첨가하면서 제거시키고 공기주입량 및 교반속도는 임의로 설정하여 배양하였다.

## 3. Xylanase 활성측정

Xylanase( $\beta$ -1,4-D-xylan-xylanohydrolase(E.C. 3. 2. 1. 21)) 활성 측정은 50mM potassium phosphate buffer(pH 6.5) 0.5ml에 효소액(배양 상정원액) 0.1ml와 기질로 1% birchwood xylan 현탁액 0.5ml를 잘 혼합하여 50℃에서 30분간 반응시킨 후 3,000rpm에서 2분간 원심분리하여 상정액 1ml에 DNS(dinitrosalicylic acid, Miller et al., 1959; Wilson, 1988)용액 1ml를 가하여 15분간 비등수조(boiling water bath)에서 반응시킨 후 급냉하고 재증류수 4ml를 첨가하여

546nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 1분간에 1 $\mu$ mol의 xylose를 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.

## 4. 단백질의 정량

단백질은 소의 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 표준 단백질로 하여 Bradford 법(1976)에 따라 595nm에서 비색 정량하였다.

균체량은 Schmidell의 방법(1976)에 따라 분석하여 단백질의 양으로 표시하였다. 즉, NaOH 용액을 최종농도가 1M되게 균체 현탁액에 첨가하여 100℃에서 30분간 가열하여 냉각원심한 후 상정액 ml 당 단백질량(mg)을 측정하여 균체량으로 나타내었다.

## 5. 당의 정량

Xylose의 정량은 DNS( Miller et al., 1959; Wilson, 1988)법으로 환원당 정량하였다.

Xylanase에 의한 xylan의 분해 양상은 TLC로 분석하였다. TLC plate는 Sigma 사(polyester silica gel) 또는 Merck 사(plastic sheets silica gel 60 F254) 등의 제품을 사용하여 전개용매는 choroform : acetic acid : water (6 : 7 : 1)로 상승법으로 전개하였으며 methanol :  $H_2SO_4$  (9 : 1)으로 발색하여 분리된 당을 검출하였다. 표준물질은 일본의 Suntory 사로 부터 분양받은 xylooligo 당 (Lot No. 91012551)을 이용하였다.

## 6. Xylanase의 정제

Xylanase 정제는 배양 상정액을 조효소액으로 하여 황산암모니아로 분획침전(40~70%)하고 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography한 후, YM10 membrane (Amicon사)으로 ultrafiltration하여 농축한 후 Sephadex G-200 gel filtration에 의해

순차적으로 정제하였다. 상기 모든 정제과정은 4℃에서 행하였다.

### 7. Polyacrylamide gel 전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli의 방법(1970)에 따라 10% acrylamide에서 전기영동하였다. 전기영동 용액은 SDS-tris-glycine buffer (0.025M tris (hydroxymethyl) aminomethane, 0.192M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)을 사용하였으며 bromophenol blue를 tracking dye로 하여 1cm 당 15mA의 전류로 2시간 전기영동하였으며 전기영동 후 coomassie brilliant blue R-250으로 12시간 이상 염색하였다. 탈색은 50% methanol과 10% acetic acid를 함유하는 1차 탈색용액으로 2~4 시간 탈색 후 7% acetic acid와 10% methanol을 함유하는 2차 탈색액으로 10 시간 이상 탈색하였다.

### 8. 분자량 측정

정제된 효소들의 분자량은 Laemmli 방법(1970)에 의한 SDS-PAGE와 Andrews 방법(1964)에 의한 Sephadex G-200으로 gel filtration하여 측정하였다. SDS-PAGE의 표준 단백질로서는 phosphorylase b (94,000Da), bovine serum albumin (67,000Da), ovalbumin (43,000Da), carbonic anhydrase (30,000Da) trypsin inhibitor (20,100Da),  $\alpha$ -lactalbumin (14,400Da)이 혼합되어 있는 Pharmacia사의 low molecular calibration kit(catalog no. 3040446011)을 사용하였다. Sephadex G-200 gel filtration에 사용된 표준 단백질로는  $\beta$ -amylase (200,000Da), alcohol dehydrogenase (150,000Da), bovine serum albumin (67,000Da), carbonic anhydrase (30,000Da),

cytochrome c (12,400Da)이 혼합되어 있는 Sigma 사의 gel filtration을 위한 molecular weight marker (MW-GF-200 kit)를 사용하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. Xylanase의 유도생산

대부분의 *Streptomyces*속이 생산하는 xylanase는 xylose 및 xylan에 의해 유도된다(Iizuka et al., 1965)고 알려져 있다. 따라서 *Streptomyces chibaensis* J-59 xylanase의 유도물질을 알기 위하여 CSL 배지에 xylan 및 xylose 등 각 종 유도물질(inducer)을 각각 첨가하여 배양한 후 배양 상정액에서의 xylanase 활성을 측정하였다. 그 결과 *S. chibaensis* J-59의 xylanase는 xylose에 의해 유도생산되지 않았고 xylan을 첨가한 배지에서만 xylanase가 유도생산(0.83units/ml)되었다(Table 1). 또한 포도당 이성화효소는 xylose 및 xylan 모두에서 생산되는 특성을 나타내었다(데이타 미제시). Park 등(1977)의 실험에서 *S. bikiniensis*가 xylan 함유배지에서 xylanase와 포도당 이성화효소를 동시에 생산하였으나, xylose 함유배지에서는 xylanase가 생산되지 않는 결과와 일치하였다. 그러나 Han (1983)등은 *S. flavogriseus*에서 xylanase와 포도당 이성화효소가 hemicellulose의 분해물인 xylose에 의해 유도 생산된다고 보고한 것과는 차이가 있었다.

Xylan을 첨가한 CSL 배지에서 배양 시간별 xylanase의 생산 양상을 조사한 결과, Fig. 1에서와 같이, 균의 생육은 36시간 배양 시 정지기에 도달하였고, 세포의 xylanase 활성은 48시간 배양시 가장 높게 생산하였다.



phosphate buffer(pH 6.5)로 평형화한 DEAE-sephadex A-50 column(2.0 x 16 cm)에 loading하여 각각 비흡착단백질 부분을 씻어낸 다음 흡착단백질 부분을 NaCl 0-0.5M 직선농도기울기로 시간 당 15ml의 속도로 용출시킨 결과, xylanase는 0.1M NaCl 농도에서 용출되었다. 효소 활성이 강한 부분(110ml)을 모아 4℃에서 12 시간 투석하여 다음 정제 과정에 사용하였다. 상기 과정에서 얻어진 110ml를 Ultrafiltration kit(YM10 membrane, Amicon 사)로 최종 3ml로 농축

하여 Sephadex G-200 column(1.3 x 80cm)에 시간 당 5ml의 유속으로 gel filtration한 결과, Fig. 2에서와 같이 분자량이 다른 3개의 peak 중 중간 peak가 효소 활성을 가지고 있었다. 활성 peak(15ml)를 수집하여 정제 xylanase의 효소학적 성질 조사에 사용하였다.

정제 과정을 요약하면 Table 2와 같으며 xylanase는 최종 수율 29%이었으며 비활성은 75.2 uints/mg으로 나타났다.

Table 2. Summary of the purification procedure of extracellular xylanase from *Streptomyces*

Purification step	Total vol. (ml)	Protein (mg)	Activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification (fold)	Yield
Crude enzyme	1000	218.1	830	3.8	1.00	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40~7	200	38.4	680	17.7	4.65	82
DEAE-sephadex A-50	110	14.6	399	27.3	7.18	48
Sephadex G-200	15	3.2	241	75.2	19.79	29

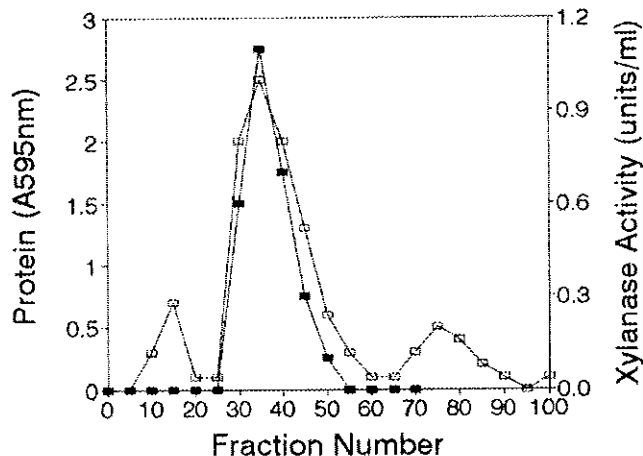


Fig. 2. Gel Filtration of Sephadex G-200 with xylanase. □-□, protein; ■-■, xylanase activity. Sephadex G-200 was equilibrated with 0.01M potassium phosphate buffer(pH6.5) as a flow rate of 5ml/h, 5ml/tube of fraction volum.

### 3. Xylanase의 특성

정제된 xylanase를 SDS-PAGE 분석한 결과, Fig. 3A와 같이 순수하게 단일 밴드를 형성하였고, Sephadex G-200 gel filtration(Fig. 3B)과 SDS-PAGE 방법으로 표준 단백질에 의한 분자량을 계산한 결과, 모두에서 약 25kDa으로 추정되었으며 subunit

가 하나로 구성되어있는 단량체 단백질인 것으로 나타났다.

일반적으로 *Bacillus spp.*에서는 기질특이성이 다른 2가지 type의 xylanase가 존재하는데 하나는 낮은 분자량(16-22kDa)의 basic xylanase와 다른 하나는 높은 분자량(43-50kDa)의 acidic xylanase로 구분되었다

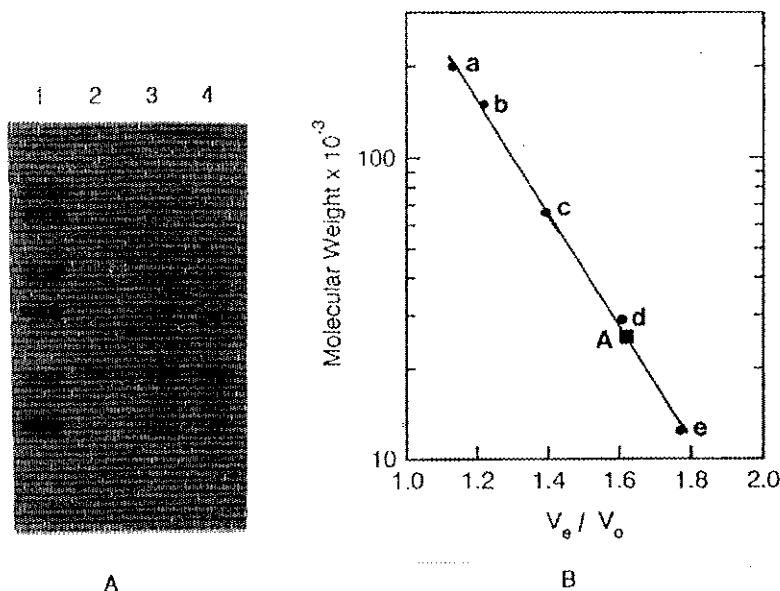


Fig. 3. Electrophoresis profile of purified xylanase by SDS-PAGE(A) and the estimation of molecular weight of purified xylanase by gel filtration on Sephadex G-200(B). A : Lane 1, low molecular weight marker protein (phosphorylase b (94,000Da); bovine serum albumin (67,000Da); ovalbumin (43,000Da); carbonic anhydrase (30,000Da); trypsin inhibitor (20,100Da);  $\alpha$ -lactalbumin (14,400Da)); lane 2, The pooled xylanase recovered after Sephadex G-200 gel filtration; lane 3, The pooled xylanase recovered after DEAE-sephadex A-50; lane 4, *S. chibaensis* J-59 crude enzyme after centrifugation; Proteins were resolved on a 10% polyacrylamide gel. These lane were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. B: Standard proteins used were the molecular weight markers from Sigma Co. (MW GT-200 kit). a,  $\beta$ -amylase (200,000Da); b, alcohol dehydrogenase (150,000Da); c, bovine serum albumin (67,000Da); d, carbonic anhydrase (30,000Da); e, cytochrome

(Wong et al., 1988). 그러나 대부분의 *Streptomyces* xylanase는 기질특이성이 동일한 하나의 xylanase system(Iizuka et al., 1965; Kusakabe et al., 1977; Nakajima et al., 1984)으로 구성되었으나, *S. ostreogriseus*는 3개의 xylanase system으로 되어 있으며(Park et al., 1982), *S. exfoliatus*, *S. flavogriseus* 등에서는 분자량이 24-26kDa과 40-50kDa으로 구분되며 2-3개의 xylanase system (Marui et al., 1985, Morosoli et al., 1986)으로 구분되어 있었다. 본 균주가 생산하는 xylanase는 분자량 25kDa으로 저분자량의 basic xylanase로 추정되며 하나의 xylanase system으로 구성된 것으로 사료된다.

효소 활성에 대한 최적 pH의 영향을 조사하기 위해 pH 3.0~6.0, 100mM sodium acetate buffer; pH 5.0~8.0, 100mM potassium phosphate buffer; pH 6.0~10.0, 100mM glycine-NaCl-NaOH buffer로 효소의 활성을 측정 한 결과, xylanase의 최적 pH는 5.5이었고, 효소 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, xylanase의 최적 반응 온도는 50℃로 나타났다(테이타 미제시). 대부분의 *Streptomyces* xylanase의 최적 pH 및 온도가 5-7.5, 50-65℃로 나타나(Marui et al., 1985, Morosoli et al., 1986) 본 균주와 비슷하였다.

Xylanase 활성에 미치는 금속 이온의 영향을 조사한 결과, Table 3에서와 같이  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , sodium dodecyl sulfate, *N*-bromosuccinimide 등에서는 아주 강한 저해를 받았고,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ 에서는 약간의 저해를 받았다. 반면에  $Mg^{2+}$ 는 효소활성을 증가시켰다.

Table 3. Effect of various compounds on the activity of purified xylanase

Reagents(5 x 10 <sup>-2</sup> M)	Xylanase(%)
None	100
FeCl <sub>3</sub>	24
HgCl <sub>2</sub>	50
CuCl <sub>2</sub>	79
BaCl <sub>2</sub>	92
CaCl <sub>2</sub>	102
MgCl <sub>2</sub>	112
MnCl <sub>2</sub>	92
ZnCl <sub>2</sub>	94
CoCl <sub>2</sub>	100
KCl	100
NaCl	100
EDTA	78
SDS	40
NBS	5
PCMB(1 x 10 <sup>-4</sup> M)	80

SDS, sodium dodecyl sulfate; NBS, *N*-bromosuccinimide; PCMB, *p*-chloromrrcuribenzoate.a

#### 4. Xylanase에 의해 생산된 xylooligo 당의 종류

정제한 xylanase에 의한 xylooligo당의 생산 양상을 조사하였다. 정제된 xylanase (4units)를 xylan(10mg)과 혼합하여 55℃에서 시간별 반응시킨 후 TLC로 생성된 xylooligo당을 확인하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 5분 반응 후 xylobiose, xylotriose 및 xylootetrose가 생성되었고, 단당인 xylose는 1시간 반응 후 조금 나타났다. Xylan의 주 가수분해 생성물은 xylobiose와 xylotriose인 것으로 분석됨으로서, 본 정제효소는 전형적인 endo-type xylanase로 추정할 수가 있다.



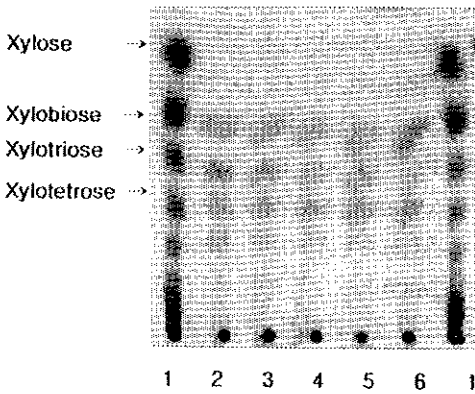


Fig. 4. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzate by purified xylanase. The developing solvent was composed of chloroform : acetic acid : water (6:7:1). Sugars spots on the plate was detected by methanol : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (9:1). 1, xylooligo saccharide marker(xylose, xylobiose, xylotriose, xylotetrose); 2, hydrolysates of birchwood xylan obtained after 5min incubation; 3, 10min; 4, 20min; 5, 30min; 6, 60min;

#### IV. 적 요

*Streptomyces chibaensis* J-59 xylanase는 CSL 배지(1% corn steep liquor, 0.15% glucose, 0.1% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 7.0)에서 1% xylan을 효소생산 유도물질로 첨가하였을 경우에 생산(0.83 unit/ml) 되었으나, xylose를 비롯한 각 종 탄소원을 포함하는 배지에서는 효소가 생산되지 않았다. *S. chibaensis*로 부터 생산된 세포의 xylanase를

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 분획침전, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, Sephadex G-200 gel filtration 과정으로 약 29%의 수율로 20배 정제하였다. 정제한 xylanase는 SDS-PAGE 및 Sephadex G-200 gel filtration에서 분자량이 모두 25,000 Da으로 나타나 monomeric enzyme으로 확인되었다. 금속이온에 대한 영향은 Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, sodium dodecyl sulfate, N-bromosuccinide 등에서는 아주 강한 저해를 받았고, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>에서는 약간의 저해를 받았다. 반면에 Mg<sup>2+</sup>는 효소활성을 증가시켰다. Xylanase에 의한 xylooligo 당의 생산양상을 TLC로 조사한 결과 xylobiose, xylotriose 및 xylotetrose가 주 생산물이었으며, 반응 1시간 이후부터 소량의 xylose가 생성되었다. 따라서 본 효소는 전형적인 endotype xylanase로 확인되었으며 새로운 기능성식품인 자일로 올리고당(xylooligo-saccharides)의 제조에 이용할 수 있을 것이다.

#### V. 감사의 글

본 논문은 1996년도 농림수산 특정 연구 과제 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과 의 일부이며 이에 감사드립니다.

#### VI. 참고문헌

1. Berenger, J. F., C. Frixon, J. Bigliardi, and N. Creuzet. 1985. Production, purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercoarium*. Can. J. Microbiol. 31: 635-643.

2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
3. Dekker, R. F. H. 1985. Biodegradation of the hemicelluloses. In *Biosynthesis and biodegradation of wood components*, T. Higuchi (ed.), Academic Press, Inc., Orlando, Fla. p. 505-533.
4. Fukumoto, J., Y. Tsujisaka, and S. Takenishi. 1970. Studies on the hemicellulases. Part I. Purification and some properties of hemicellulases from *Aspergillus niger* var *Tieghem* sp. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 44: 447-456.
5. Ganju, R. K., P. J. Vithayathil and S. K. Murthy. 1986. *J. Microbiol.* 35: 836.
6. Grabski, A. C., and T. W. Jeffries. 1991. Production, purification, and characterization of  $\beta$ -(1-4)-endoxylanase of *Streptomyces roseiscleroticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 987-992.
7. Han, Y. W. 1983. Utilization of plant hemicellulose for production of xylanase and glucose isomerase. *Developments in Industrial Microbiol.* 24: 337-345.
8. Iizuka, H., and T. Kawaminami. 1965. Studies on the xylanase from *Streptomyces*. Part I. Purification and some properties of xylanase from *Streptomyces xylophagus* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.* 29: 520-524.
9. Ishaque, M., and D. Kluepfel. 1981. *Biotechnol. Lett.* 3: 481-486.
10. Johnson, K. G., D. Brener, R. Vidoli, and D. W. Griffith. 1984. Purification and characterization of xylanase from *Streptomyces griseus*. *Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol.*, K152, p17258.
11. 주길재, 권기석, 이인구. 1997. 내열성 포도당 이성화 효소를 생산하는 *Streptomyces* sp. J-59의 분리 및 동정. *한국산업미생물학회지* 25(1): 인쇄중.
12. 주길재, 이인구. 1997. 방선균의 xylB 변이주에 의한 포도당 이성화 효소의 생산. *한국산업미생물학회지* 25(1): 인쇄중.
13. Keskar, S. S., M. C. Srinivasan, and V. V. Deshpande. 1989. Chemical modification of a xylanase from a thermotolerant *Streptomyces*. *Biochem. J.* 261: 49-55.
14. Kluepfel, D., F. Shareck, F. Mondou, and R. Morosoli. 1986. Characterization of cellulase and xylanase activities of *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 230-234.
15. Kusakabe, I., T. Yasui, and T. Kobayashi. 1977. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 51: 669-679.
16. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* 227: 680-685.
17. Marui, M. K. Nakanishi, and T. Yasui. 1985. Purification and

- properties of the three types of xylanases induced by methyl  $\beta$ -xyloside from *Streptomyces* sp. Agric. Biol. Chem. 49: 3399-3407.
18. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
  19. Morosoli, R., J. L. Bertrand, F. Mondou, F. Shareck and D. Kluepfel. 1986. Purification and properties of a xylanase from *Streptomyces lividans*. Biochem. J. 239: 587-592.
  20. Nakajima, T., K. I. Tsukamoto, T. Watanabe, K. Kainuma, and K. Matsuda. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4- $\beta$ -D-xylanase from *Streptomyces* sp. J. Ferment. Technol. 62: 269-276.
  21. Okazaki, W., T. Akiba, K. Horikoshi, and R. Akahoshi. 1985. Purification and characterization of xylanases from alkaphilic thermophilic *Bacillus* spp. Agric. Biol. Chem. 49: 2033-2039.
  22. Park, Y. K., and M. Toma. 1974. Some interrelation between microbial xylanase and glucose isomerase. J. Gen. Appl. Microbiol. 20: 67-69.
  23. Park, Y. K. 1977. Studies on the formation, purification and properties of glucose isomerase from *Streptomyces bikiniensis*. Z. Zuckerind 27: 372-374.
  24. Ruiz-arribas, A., J. M. Fernandez-alalos, P. Sanchez, A. L. Garda, and R. I. Santamaria. 1995. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase(xys1) from *Streptomyces halstedii* JM8. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2414-2419.
  25. Schmidell, W., and M. V. Fernandes. 1976. The measurement of cellular protein content as a method for determining mold concentration. J. Ferment. Technol. 54: 225-228.
  26. Song, F. L., C. W. Firsberg., J. B. Rattray. 1987. Appl. Environ. Microbiol. 53: 644.
  27. Sreenath, H. K., R. Joseph, and V. S. Murthy. 1978. Folia Microbiol. (Prague) 23: 299-303.
  28. Takasaki, Y., Y. Kosugi, and A. Kanbayashi. 1969. Studies on sugar-isomerizing enzyme. purification, crystallization and some properties of the enzyme from *Streptomyces*. Agric. Biol. Chem. 33: 1527~1534.
  29. Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. Wood Sci. Technol. 1: 45-70.
  30. Tsujibo, H., K. Miyamoto, T. Kuda, K. Minami, T. Sakamoto, T. Hasegawa, and Y. Inamori. 1992. Purification, properties, and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 58: 371-375.
  31. Tsumura, N., and T. Sato. 1965. Enzymatic conversion of D-glucose

- to D-fructose. VI. Properties of the enzyme from *Streptomyces phaeochromogenes*. Agric. Biol. chem. 29: 1123-1128.
32. Wang, P., J. C. Mason, and P. Broda. 1993. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. J. Gen. Microbiol. 139: 1987-1993.
33. Wilson, D. B. 1988. Cellulose of *Thermomonospora fusca*. Methods Enzymol. 160: 314-323.
34. Wong, K. K.Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganism: functions and applications. Microbiol. Rev. 52: 305-317.