

*Penicillium verruculosum*의 D-Xylanase와 β -Xylosidase의 활성부위 특성

조 남 철

동신전문대학 식품영양과

Properties of Active Sites of D-Xylanase and β -Xylosidase from *Penicillium verruculosum*

Nam-Chul Cho

Department of Food and Nutrition, Dongshin Junior College, Kwangju 500-714, Korea

Abstract

To investigate the characteristics of active sites of the D-xylanase and β -xylosidase purified from *Penicillium verruculosum*, effects of various chemicals on the enzyme activity were analyzed. The D-xylanase was activated by Cu^{2+} , however it was inhibited by metal ions, Hg^{2+} and Mn^{2+} , by chemicals, N-bromosuccinimide, iodine, diethylpyrocarbonate, and 2,3-butanedione. These results suggested that the D-xylanase from *Penicillium verruculosum* contained tyrosine, histidine, arginine and tryptophan at the active center. The β -xylosidase was inhibited by Hg^{2+} , N-bromosuccinimide and sodium dodecyl sulfate, however it was not effected by Mn^{2+} and Cu^{2+} . It was suggested that the enzyme contained tryptophan at the active center.

Key words : *Penicillium verruculosum*, D-xylanase, β -xylosidase

서 론

Xylanase(EC 3.2.1.8)와 β -xylosidase(EC 3.2.1.37)는 농산폐기물중의 하나인 xylan을 분해하는 hemicellulase들이다. 이 효소들은 곰팡이를 포함한 많은 미생물들로부터 생산되며 이들 미생물들 중, *Trichoderma viride*¹⁾, *Malbranchea pulchella*²⁾, *Aspergillus*³⁾, *Trichoderma harzianum* E58⁴⁾, *Aureobasidium pullulans* CBS 58475⁵⁾, *Thielaviopsis basicola*⁶⁾, *Lentinula edodes*⁷⁾, *Schizophyllum radiatum*⁸⁾ 등이 보고된 바 있다. 최근 Chung 등⁹⁾은 자연계로부터 강력한 섬유소분해효소를 생산하는 곰팡이인 *Penicillium verruculosum*을 분리하였으며 조 등^{10, 11)}은 그 균주로부터 D-xylanase와 β -xylosidase를 분리, 정제하여 그 특성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 *P. verruculosum*에서 분리, 정제하여 보고한 바 있는 D-

xylanase와 β -xylosidase에 대한 화학적 성질을 검토하여 효소활성중심의 특성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 정제효소

정 등⁹⁾에 의해 자연계로부터 분리된 *P. verruculosum*을 단일탄소원으로 oat spelted xylan(Sigma X-0627)을 함유한 기본배지¹⁰⁾에 30℃에서 8일간 배양한 후 그 배양상정액으로부터 D-xylanase와 β -xylosidase를 분리 및 정제하여 본 실험에 사용하였다.

2. D-xylanase의 활성 측정

기질로서 oat spelted xylan을 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0에 1% 농도로 현탁하여 사용하였고 효소용액을 가해 60℃에서 반응시킨 후 DNS 법¹²⁾을 이용하여 xylose에 해당하는 환원당의 양을

측정하였으며 1분동안에 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소활성도를 1 unit라 하였다.

3. β -Xylosidase의 활성 측정

β -xylosidase의 활성도를 측정하기 위해 기질로서 pH 4.0의 0.05 M McIlvaine 완충용액에 최종농도가 0.5 mM이 되게 조제한 ρ -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside(PNPX)를 사용하였다. 조제된 기질용액에 효소용액을 가하고 70°C에서 20 분간 반응시킨 다음 1.0 M sodium carbonate 용액을 가해 생성된 ρ -nitrophenol의 양을 400 nm에서 흡광도를 측정함으로써 산출하였다. 효소활성도의 1 단위는 분당 1 μ mole의 ρ -nitrophenol을 생성하는 효소량으로 하였다.

4. 단백질 수식제 및 금속이온들의 영향

반응에 사용된 단백질 수식제로는 Diethylpyrocarbonate(DEP), 2,3-butanedione, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochlorid(EDC), N-ethylmaleimide(NEM), N-bromosuccinimide(NBS), 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene(FD-NB), phenylmethanesulphonylfluoride(PMSF)와 iodoacetamide(IAA)등으로 이들 단백질 수식제들을 최종농도가 각각 1 mM이 되도록 가한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후 잔존활성을 측정하였다. 반응에 사용된 각종 금속이온들은 최종농도가 1 mM되게 효소액에 첨가하고 상온에서 30분간 방치한 다음 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. D-Xylanase의 활성에 대한 화학수식제와 금속이온들의 영향

여러가지 화학수식제들을 1 mM이 되게 첨가하여 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다(Table 1). 그 결과 tryptophan의 indol기에 특이적으로 결합하여 효소활성을 저해하는 것으로 알려진 NBS와 arginine의 guanidyl기에 작용함으로써 효소활성을 저해하는 2,3-butanedione, 그리고 histidine의 imidazole기에 작용하는 것으로 알려진 DEP는 1 mM이하의 농도에

서 효소활성도를 현저히 감소시켰으며, 또한 tyrosine, histidine, cysteine 및 tryptophan잔기와 결합하여 효소활성을 저해시키는 물질로 알려진 iodine의 농도를 1 mM까지 변화시켜 그 효과를 검토한 결과 0.2 mM의 농도에서 약 50%의 활성이 감소하였고 1 mM의 농도에서는 약 20%의 잔존활성을 보임으로서 효소활성도는 iodine의 농도가 증가함에 따라 감소하였으나 iodine의 농도에 비례적으로 감소하지는 않았다(Fig. 1).

Table 1. Effects of various chemicals on the activity of xylanase from *P. verruculosum*.

Chemicals(1mM)	Relative enzyme activity(%)
None	100.0
ρ -HMB	97.3
β -Mercaptoethanol	79.5
SDS	95.5
PMSF	92.1
NBS	0.0
DEP	0.0
NEM	90.9
2,3-Butanedione	0.0
FDNB	83.4
IAA	95.0
EDC	90.9
Iodine	15.5
EDTA	103.4
Sodium azide	96.5

*P. verruculosum*으로부터 분리한 xylanase에 1mM의 농도로 Hg^{2+} 를 포함한 각각의 금속이온들을 가하여 효소활성에 대한 이들의 효과를 검토한 결과(Table 2) 이들 중 Hg^{2+} 와 Mn^{2+} 에 의해서는 xylanase의 활성도가 현저히 감소하였으며 Fe^{2+} 에 의해서도 약 20% 정도의 효소활성이 감소한 것으로 나타났다. 그러나 Cu^{2+} 를 첨가한 경우 금속이온을 첨가하지 않은 효소의 활성도에 비해 오히려 약 50% 가량 활성이 증가하였다(Fig. 2). Hg^{2+} , Mn^{2+} 과 Cu^{2+} 가 각각 처리된 효소용액에 EDTA를 농도를 변화시켜 가한 후 효소활성도를 측정된 결과 EDTA를 2 mM의 농도로 가했을 때 원래의 활성도를 회복하였다(Fig. 3). Hg^{2+} 는 단백질 분자의 histidine과 tryptophan

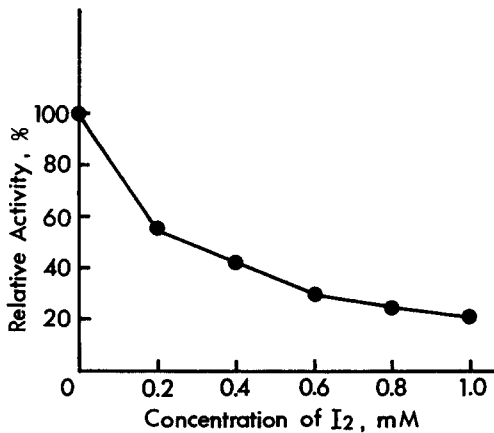


Fig. 1. Effect of iodine on the activity of D-xylanase from *P. verruculosum*.

After the enzyme was incubated with various concentrations of iodine in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) for 30 min at room temperature, residual activity of the enzyme was measured.

Table 2. Effects of metal ions on the activity of xylanase from *P. verruculosum*.

Metal ions (1 mM)	Relative enzyme activity (%)
None	100.0
HgCl ₂	10.2
CaCl ₂	103.5
MnCl ₂	20.6
FeSO ₄	80.4
ZnCl ₂	98.2
CoCl ₂	88.5
CuSO ₄	145.0
MgSO ₄	102.4
KCN	96.2

잔기와 결합하여 단백질의 구조를 변화시키는 것으로 알려져 있으며¹³⁾ 따라서 *P. verruculosum*으로부터 분리한 xylanase가 Hg²⁺에 의해 실활이 된다는 것은 이들 아미노산 잔기에 각각 작용하는 DEP와 NBS에 의해서도 이 효소의 거의 대부분의 활성이 실활된다는 결과와 일치하였다. 한편 *Streptomyces*¹⁴⁾가 생산하는 xylanase는 Hg²⁺, Fe²⁺, NBS 그리고 SDS에 의해 강력히 저해효과를 보인 반면 ρ -HMB는 전혀 저해효

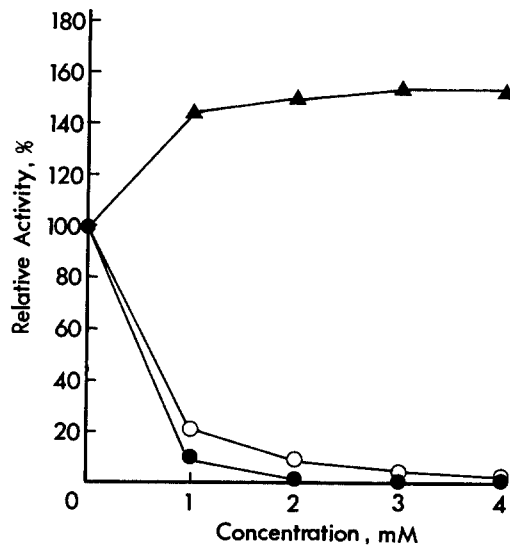


Fig. 2. Effects of metal ions on D-xylanase from *P. verruculosum*.

After the enzyme was incubated with various concentrations each of metal ions in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) for 30 min at room temperature, residual activity was measured. ●, Hg²⁺ treated enzyme; ○, Mn²⁺ treated enzyme; ▲, Cu²⁺ treated enzyme

과를 주지 않았다고 보고된 바 있으며 이런 성질들은 *P. verruculosum*에서 생산되는 xylanase의 경우와 대체로 유사하였다. *Bacillus*¹⁵⁾가 생산하는 xylanase의 경우 5mM의 Hg²⁺에 의해 효소활성도가 완전히 저해되었으며 Ag²⁺, Cu²⁺와 EDTA는 5mM에서 부분적인 저해를 하였으나 Cd²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, 그리고 Zn²⁺등은 5mM의 농도에서 전혀 효소활성도에 영향을 주지 않았고, ρ -HMB를 5 mM로 가했을 때 효소활성도의 40 %가 저해됨으로서 이 효소가 Hg²⁺에 의해 저해된다는 점은 같았으나 그 외에는 대체로 본 균주에서 생산되는 xylanase와 차이를 보였다. 한편 *Trichoderma lignotum*¹⁶⁾의 xylanase는 1 mM의 Cu²⁺에 의해 강하게 저해되었으나 Hg²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, 그리고 EDTA에 의해서는 별 영향을 받지 않는다는 결과를 볼 때 *P. verruculosum*의 xylanase와는 대조적인 결과를 나타냈다. 또한 *Bacil-*

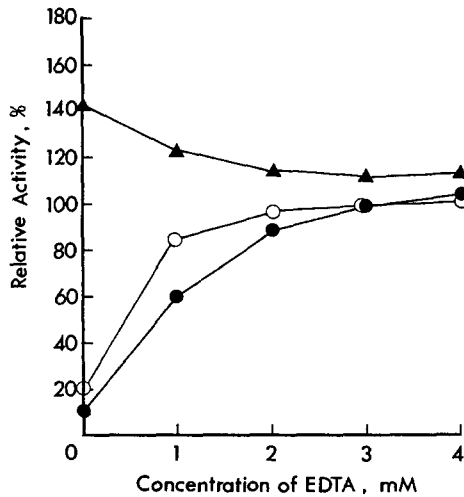


Fig. 3. Effect of EDTA on metal ion inhibition of D-xylosidase from *P. verruculosum*.

After the enzyme was incubated with with 1 mM each of metal ions in 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) for 30 min at room temperature, various concentrations of EDTA were added to the enzyme solution and then residual activity was measured. ●, Hg²⁺ treated enzyme; ○, Mn²⁺ treated enzyme; ▲, Cu²⁺ treated enzyme

*lus stearothermophilus*¹⁷⁾와 *Bacillus* sp.¹⁸⁾의 xylanase는 Hg²⁺에 의해 거의 완벽히 저해됨으로써, 그리고 *Talaromyces hyssochlamydoideis*¹⁹⁾의 xylanase 또한 HgCl₂과 KMnO₄에 의해 크게 저해됨으로써 미생물들로부터 생성되는 xylanase는 대체로 Hg²⁺에 의해서 효소활성도가 현저히 감소되는 것으로 보인다. *P. verruculosum*의 xylanase가 Hg²⁺에 의해서 효소활성도가 현저히 감소된다는 것은 다른 대부분의 xylanase들과 일치하나 Mn²⁺에 의해 효소활성도가 현저히 감소하고 Cu²⁺에 의해서는 효소활성도가 크게 증가하는 점은 다른 균주와 달랐다.

2. β-Xylosidase활성에 대한 화학수식제들과 금속 이온들의 영향

여러가지 화학수식제들을 농도를 달리하여 첨가하여 30 분간 방치한 후 남아 있는 β-xylosidase의 활성을 측정함으로써 이들 화학수식제들의 효소단백질에

Table 3. Effects of various chemicals on the activity of β-xylosidase from *P. verruculosum*.

Chemicals(1mM)	Relative enzyme activity(%)
None	100.0
ρ-HMB	100.9
β-Mercaptoethanol	95.9
SDS	7.0
PMSF	97.1
NBS	0.0
DEP	95.9
NEM	97.5
2,3-Butanedione	95.0
FDNB	90.4
IAA	98.2
EDC	95.0
Iodine	83.5
EDTA	99.6
Sodium azide	100.5

미치는 영향을 검토하였다(Table 3). 그 결과 tryptophan의 indol기에 특이적으로 결합하여 효소활성을 저해하는 것으로 알려진 NBS와 계면활성제인 SDS에 의해서 현저히 활성이 감소하였으나 다른 수식제들에 의해서는 별 영향을 받지 않았다. Tyrosine, cysteine, histidine 및 tryptophan잔기와 결합하여 효소활성을 저해하는 물질로 알려져 있는 iodine의 농도를 1 mM까지 변화시켜 그 효과를 검토한 결과 xylanase와는 달리 1 mM의 농도에서 약 20 %의 활성감소를 나타냄으로써 β-xylosidase의 활성도에는 별 영향을 미치지 않았다. *P. verruculosum*으로부터 분

Table 4. Effects of metal ions on the activity of β-xylosidase from *P. verruculosum*.

Metal ions(1 mM)	Relative enzyme activity(%)
None	100.0
HgCl ₂	10.0
CaCl ₂	97.7
MnCl ₂	101.4
FeSO ₄	107.7
ZnCl ₂	99.7
CoCl ₂	98.5
CuSO ₄	95.5
MgSO ₄	104.6
KCN	100.5

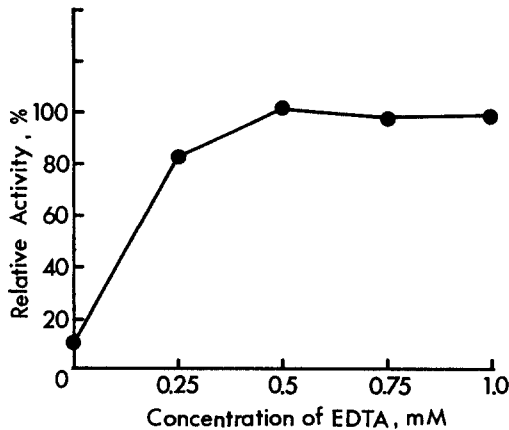


Fig. 4. Effect of EDTA on Hg^{2+} inhibition of β -xylosidase from *P. verrucosum*.

After the enzyme was incubated with with 1 mM of Hg^{2+} ion in 50 mM McIlvaine buffer (pH 4.0) for 30 min at room temperature, various concentrations of EDTA were added to the enzyme solution and then residual activity was measured.

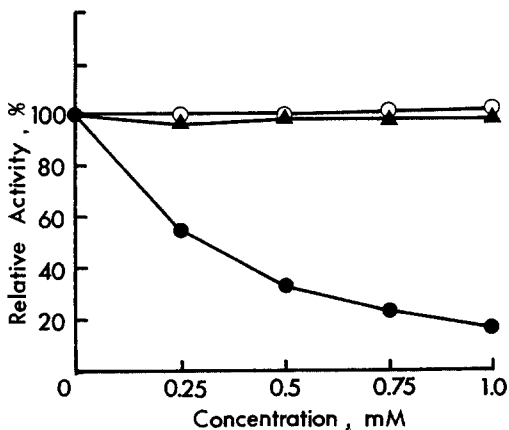


Fig. 5. Effect of β -mercaptoethanol on Hg^{2+} inhibition of β -xylosidase from *P. verrucosum*. ●, inhibition of Hg^{2+} ; ○, enzyme treated of β -mercaptoethanol without Hg^{2+} ; ▲, pretreated of 1 mM of β -mercaptoethanol before Hg^{2+} inhibition

리한 β -xylosidase에 대한 Hg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} 와 KCN 등의 효과를 검토한 결과 (Table 4) 이들 중 Hg^{2+} 이온은 1 mM의 농도에서

90 % 가량의 효소활성도를 감소시켰으며, 1 mM의 Hg^{2+} 이온에 의한 β -xylosidase의 활성도 감소는 0.5 mM의 EDTA에 의해 거의 회복되었다(Fig. 4). 한편, Mn^{2+} 은 1 mM의 농도에서 오히려 효소활성도를 15 % 가량 상승시켰고 Cu^{2+} 에 의해서는 20 % 가량 효소활성도를 감소시켰으므로 xylanase와는 대조적인 결과를 보였다. 그러나 이들을 제외한 나머지 금속 이온들은 β -xylosidase의 활성도에 별 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. *Pseudomonas* sp. CB-33의 β -xylosidase¹⁹⁾는 NBS, iodine, ρ -HMB와 SDS에 의해서 효소활성도가 매우 감소되었고 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , 그리고 Ni^{2+} 에 의해 강하게 저해되었으나 Mg^{2+} 와 Li^{2+} 는 효소활성도를 각각 40 %, 30 % 정도 촉진하였다고 보고된 바 있으며 *Sclerotium rolfsii*²¹⁾의 β -xylosidase는 2 mM의 Hg^{2+} , Ag^{2+} , 그리고 Cu^{2+} 에 의해 각각 100 %, 78 %, 그리고 30 % 저해되었으며 2 mM의 Ca^{2+} 와 Fe^{2+} 에 의해서는 영향을 받지 않았고 1~2 mM의 ρ -HMB, NBS, 그리고 IAA에 의해서 매우 저해되었다고 보고된 바 있다. 그리고 *Trichoderma lignolum*¹⁶⁾의 β -xylosidase는 0.1 mM의 Hg^{2+} 에 의해 강하게 저해되었고 *Malbracchea pulchella* var. *sulfurea*, *Trichoderma viride*, 그리고 *Emericella nidulans*의 β -xylanase들²²⁾의 경우 또한 Hg^{2+} , NBS, ρ -HMB, 그리고 SDS에 의해 강하게 효소활성이 저해된다고 보고된 바 대체로 미생물에서 생산되는 β -xylosidase들은 금속이온 Hg^{2+} 에 의해서 현저히 저해 받으며 NBS나 ρ -HMB와 같은 화학수식제들에 의해서도 크게 저해되는 것으로 나타났다. *P. verrucosum*으로부터 분리한 β -xylosidase는 Hg^{2+} , NBS, 그리고 SDS에 의해 매우 저해되었으나 ρ -HMB에 의해서는 거의 영향을 받지 않았다는 점이 다른 미생물들로부터 생산되는 β -xylosidase들과 달랐다.

*P. verrucosum*의 xylanase와 β -xylosidase는 cysteine잔기를 수식하는 NEM이나 IAA를 처리하였을 때 이들을 처리하지 않았을 때보다 효소활성이 약간 낮았으나 이는 효소활성부위의 변형에 의해서 보다는 효소단백질의 작은 구조적 변화에 의한 효소활성도의 감소일 것으로 생각되었다. 효소단백질의 -SH기에 비가역적으로 작용하는 ρ -HMB의 경우 이들 두 효소

의 활성도에 변화를 주지 않았을 뿐만 아니라 disulfide결합을 환원시키며, Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 를 함유하는 metalloenzyme의 활성을 저해하는 sodium azide에 의해서도 영향을 받지 않았다. *P. verrucosum*의 xylanase와 β -xylosidase의 활성중심에는 -SH기가 관여하지 않고 또한 이 효소가 metalloenzyme에도 속하지 않은 것으로 생각되었다.

한편, serine의 -OH기에 작용하는 PMSF나 carboxyl기를 변형시킴으로써 효소 활성을 저해하는 EDC 역시 이들 두 효소에 별 효과를 주지 않음으로써 *P. verrucosum*의 xylanase와 β -xylosidase가 serine enzyme이 아니며 효소활성부 위에 aspartic acid나 glutamic acid 또한 관여하지 않는 것으로 생각되었다. 또 *P. verrucosum*이 생산하는 xylanase와 β -xylosidase는 지금까지 보고된 여러가지 미생물들로부터 생산되는 대부분의 xylanase와 β -xylosidase처럼 NBS와 Hg^{2+} 에 의해 강력하게 저해됨으로써 tryptophan이 xylanase와 β -xylosidase의 효소활성도에 매우 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

3. Hg^{2+} 저해에 대한 β -mercaptoethanol과 EDTA의 영향

Hg^{2+} 이온에 의한 β -xylosidase활성저해와 β -mercaptoethanol의 영향에 대해 검토한 결과(Fig. 5), β -xylosidase는 1 mM의 Hg^{2+} 이온에 의해 90% 가량의 활성 감소가 일어 났으나 Hg^{2+} 이온을 처리하기 전에 β -mercaptoethanol로 전처리한 경우 활성도의 감소는 거의 나타나지 않았다.

요 약

*P. verrucosum*의 xylanase는 iodine, NBS, DEP, 그리고 2,3-butanedione에 의해 실험되는 것으로 보아 활성중심에 tyrosine, histidine, tryptophan 및 arginine 잔기가 존재함으로써 효소활성에 직접적으로 또는 간접적으로 관여하는 것으로 생각된다. 금속이온들 중 Hg^{2+} 와 Mn^{2+} 에 의해서 현저히 활성이 저해되었으나 Cu^{2+} 에 의해서는 반대로 활성이 크게 증가되었으며 Hg^{2+} 에 의한 활성의 저해효과는 β -mercaptoethanol의 첨가에 의해 보호되었다. *P.*

*verrucosum*으로부터 분리한 β -xylosidase는 NBS와 SDS에 의해 효소활성이 크게 저해되는 반면 실험에 사용된 다른 수식제들에 의해서는 별 영향을 받지 않았으며 금속이온들 중 Hg^{2+} 에 의해서 크게 활성이 저해됨으로써 효소활성에 tryptophan잔기가 관여할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Poutanen, K. and Puls, J. : Characteristics of *Trichoderma reesei* xylosidase and its use in the hydrolysis of solublized xylans, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 425(1988)
2. Matsuo, M. and Yasui, T. : Xylanase of *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*, *Meth. Enzymol.*, **16**, 671(1988)
3. Bailey, M. J. and Poutanen, K. : Production of xylanolytic enzymes by strains of *Aspergillus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 5(1989)
4. Senior, D. J., Mayers, P. R. and Saddler, J. N. : Xylanase production by *Trichoderma harzianum* E58, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 137(1989)
5. Dobberstein, J. and Emeis, C. C. : β -Xylanase produced by *Aureobasidium pullulans* CBS 58475, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 262(1989)
6. Ghosh, V. K. and Deb, J. K. : Production and characterization of xylanase from *Thielaviopsis basicola*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 44(1988)
7. Mishra, C., Forrester, I. T., Kelley, B. D., Burgess, R. R. and Leatham, G. F. : Characterization of major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 226(1990)
8. Cavazzoni, V., Manzoni, M., Parini, C. and Bonferoni, M. C. : D-Xylanase produced by *Schizophyllum radiatum*, *Appl. Microbiol.*

- Biotechnol.*, **30**, 247(1989)
9. Chung, K. C., Kawai, K., Yashima, S. and Eguchi, Y. : Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verrucosum*, *Hak kokogaku*, **60**(5), 355(1982)
10. 조남철, 권수진, 김강화, 정기철, 전순배: *Penicillium verrucosum*의 D-xylanase의 정제 및 특성, *한국생화학회지*, **25**(7), 670(1992)
11. 조남철, 김강화: *Penicillium verrucosum*의 β -xylosidase의 정제 및 특성, *한국생화학회지*, **25**(7), 631(1992)
12. Miller, G. L. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, **31**(3), 426((1959).
13. Vallee, B. L. and Ulmer, D. D. : Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead, *Ann. Rev. Biochem.*, **41**, 91(1972)
14. Yasui, T., Marui, M., Kusakabe, I. and Nakanishi, K. : Xylanase of *Streptomyces*, *Meth. Enzymol.*, **160**, 648(1988)
15. Akiba, T. and Horikoshi, K. : Xylanase of Alkalophilic Thermophilic *Bacillus*, *Meth. Enzymol.*, **160**, 656(1988)
16. John, M. and Schmidt, J. : Xylanase and β -xylosidase of *Trichoderma lignolum*, *Meth. Enzymol.*, **160**, 662(1988)
17. 배성호, 최용진: *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 Xylanase의 정제 및 특성, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(6), 592(1991)
18. 김원곤, 이찬용, 이계호: *Bacillus* sp. N-25가 생산하는 xylanase의 특성, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(5), 559(1992)
19. Hayashida, S., Ohta, K. and Mo, K. : Xylanase of *Talaromyces byssochlamydoides*, *Meth. Enzymol.*, **160**, 675(1988)
20. 유진환: *Pseudomonas* sp. CB-33이 생산하는 β -xylosidase의 정제 및 특성, *충북대학교 석사학위논문*(1994)
21. Lachke, A. H. : 1,4- D-Xylan Xylohydrolase of *Sclerotium rofsii*, *Meth. Enzymol.*, **160**, 679 (1988)
22. Matsuo, M. and Yasui, T. : β -xylosidase of several Fungi, *Meth. Enzymol.*, **160**, 684 (1988)

(1994년 2월 14일 수리)