

## *Aspergillus niger* SFN-416로부터 생산한 Xylanase II의 분리정제 및 특성

성찬기<sup>1</sup> · 이상원<sup>2</sup> · 박석규<sup>3\*</sup> · 손봉수<sup>2</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 화학과, <sup>2</sup>경상대학교 식품공학과, <sup>3</sup>순천대학교 식품영양학과

**Purification and Characterization of Xylanase II from *Aspergillus niger* SFN-416.** Chan-Ki Sung<sup>1</sup>, Sang-Won Lee<sup>2</sup>, Seok-Kyu Park<sup>3\*</sup> and Bong-Soo Shon<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Department of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul 156-757, <sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, <sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea - Xylanase (EC 3.2.1.8) was purified approximately 4.3 fold from *Aspergillus niger* SFN-416 by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 gel filtration and DEAE-Sephacel ion exchange chromatography. Molecular weight of the enzyme was approximately 42,000 daltons. The optimum pH and temperature of the enzyme activity were 5.5 and 50°C, respectively. The enzyme activity was enhanced by Fe<sup>2+</sup>, and inhibited by Hg<sup>2+</sup>. The activity was decreased by addition of methanol, ethanol, isopropanol and 1-butanol at a concentration of 10%(v/v).

고등식물 세포벽의 주성분 중에 하나인 xylan은 hemicellulose의 주성분으로 식물 세포벽의 cellulose와 lignin 성분과 결합되어 있고, 대체 에너지원인 알코올 생산의 기질로서 주목을 받고 있는 중요한 biomass 자원이다. Xylan은 많은 세균과 곰팡이들에 의해서 생성되는 endo-1,4-xylanase(EC 3.2.1.8)와  $\beta$ -xylosidase(EC 3.2.1.37)의 동시작용에 의해 가수분해 되어진다(1). 즉 xylanase는 acetyl, arabinosyl과 glucuronosyl잔기들로 치환된  $\beta$ -1,4-D-xylopyranoside잔기들의 선형 polymer인 xylan의  $\beta$ -1,4결합을 절단하는 효소로서 미생물들에 의해서 생산된다. 많은 세균과 곰팡이는 exoxylanase, endoxylanase,  $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase 및 esterase 등의 다양한 효소들을 생성하므로 xylan을 탄소원으로 이용하여 성장한다(2-5).

식물체의 질병인자로서 xylanase와 다른 hemicellulase의 역할은 아직 명확하게 알려져 있지는 않지만, 숙주와 질병의 상관 관계에서 질병 발생시 xylanase의 연관 가능성에 대하여 몇가지의 보고들이 있다(6-8).

펄프와 제지산업에서 미생물의 xylanase를 응용하기 위해 많은 연구자들이 상당한 관심을 가지고 있다. 왜냐하면 효과적인 생물표백제로 선택하므로써 chloride와 chlorine dioxide같은 독성 화학제품의 소비를 상당히 감소시킬 수 있는 원인이 된다(9).

본 연구에서는 유기용매에 비교적 안정한  $\beta$ -glucosidase를 우수하게 생산하는 균주로서 분리·동정한 바 있는(10) *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 제지산업, 식품산업, 환경분야, 알코올 생산 및 의약품분야 등에

상당한 관련있고, 한편 기초적인 토대를 마련하기 위해 xylanase를 분리·정제하여 그 이화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 재료

공시균주는 순천대학교 공업기술연구소에 보관중인 *Aspergillus niger* SFN-416(10)을 사용하였다.

시약으로 p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside(PNPG), coomassie brilliant blue R-250 등은 Fluka Chemie(Switzerland)제품을, p-nitrophenol(PNP), Sephadex G-100, bovine serum albumin 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.) 제품을, DEAE-Sephacel은 Pharmacia Fine Chemicals(Uppsala, Sweden) 제품을, standard marker protein은 BIO-RAD(Richmond, CA, U.S.A) 제품을 사용하였다. 이외의 다른 시약도 특급을 사용하였다.

#### 배지

보존 및 포자형성용 배지는 각각 potato dextrose agar(PDA) 및 malt extract agar(MEA) 배지를 사용하였으며, 효소생성의 기본배지(11)는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.4 g, urea 0.3 g, CaCl<sub>2</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g, Bacto peptone 1.0 g, CMC 10.0 g, trace solution 1.0 ml(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5%, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.16%, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.14%, CoCl<sub>2</sub> 0.2%), tween 80 2.0 g, DW 1.0 L로 조제하여 사용하였다.

\*Corresponding author.

Key words: *Aspergillus niger* SFN-416, xylanase II

균주 배양 및 조효소액 조제

효소 생산용 액체배지 10 ml를 L-type 시험관에 넣어

살균(121°C, 10 min)하고, 포자현탁액 0.5 ml를 무균상 내에서 접종하여 30°C에서 5일 동안 진탕배양(120 rpm, storke 5.4 cm)한 다음, 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 20 min) 하였다. 그 상정액을 -20°C로 냉각시킨 ethanol를 가하여 최종 농도가 70%되게 하여 얻은 ethanol (v/v)침전물을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)에 용해시켜 조효소로 사용하였다.

### 활성도 및 단백질 정량

효소 활성 측정은 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 5.5)에 용해한 1% xylan를 효소와 혼합한 다음, 50°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 dinitrosalicylic acid(DNS)법(12)을 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 50°C에서 1분간 1 mole의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

단백질의 농도는 Lowry 등(13)의 방법에 따라 측정하였으며, 이때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 작성하여 정량하였다.

### 정제

조효소를 4°C에서 ammonium sulfate로 30%포화시켜 1시간 동안 방치시킨 후, 8,000 rpm에서 10분동안 원심분리하고 상층액을 모아 4°C에서 ammonium sulfate로 90%포화시켜 하룻 밤 방치시킨 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 용해시켰다.

Sephadex G-100을 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 상온에서 72시간동안 부풀린 후 분류관(10×900 mm)에 충전시키고 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 평형시킨 후, ammonium sulfate(30~90%)로 포화시켜 부분 정제된 효소를 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 용출시켰다. 이 때 유출속도는 자연유속으로 하였고, 용출액은 3 ml씩 각 시험관에 받았다. 이의 각 용출액은 280 nm에서 단백질을 확인한 다음, 510 nm에서 효소 활성도를 측정하여, 활성도가 큰 부분만을 모아 냉동건조기로 농축시켜 다음 정제과정의 효소로 사용하였다.

DEAE-Sephacel은 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 씻은 다음, 분류관(150×280 mm)에 충전시키고 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 평형을 유지시켰다. 이 분류관은 Sephadex G-100 column chromatography에 의하여 모은 효소를 흡착시킨 후 0~0.5 M NaCl로 linear gradient하여 용출시켰다. 이 때 용출속도는 12 ml/hr로 하였고, 용출액은 3 ml씩 각 시험관에 받아서 단백질과 효소의 활성도를 측정한 다음, 활성도가 큰 분획만을 모아 이를 정제된 효소액으로 사용하였다.

### 분자량 측정

정제된 효소의 순도 및 분자량을 측정하기 위해서 SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동을 Laemmli의 방법(14)으로 행하였다. 이때 10% polyacrylamide gel을 사용하여 25 mA로 3시간 동안 전기영동하였다. 영동이 끝난 gel은 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 다음 탈색시켜 정제상태와 분자량을 관찰하였다.

분자량을 결정하기 위하여 표준단백질을 함께 전기영동하여 그들의 상대적 이동거리의 값으로 표준곡선을 작성하여 분자량을 결정하였다. 표준단백질로는  $\alpha$ -lactalbumin(14,200 daltons), trypsin inhibitor(20,100 daltons), trypsinogen(24,000 daltons), carbonic anhydrase (29,000 daltons), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36,000 daltons), albumin egg(45,000 daltons), albumin bovine(66,000 daltons)을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### Xylanase의 정제

*Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생성한 xylanase는 -20°C로 냉각시킨 ethanol를 가하여, 최종농도가 70%되게 하여 ethanol(v/v)침전물을 얻었다. 이 침전물을 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)에 용해시킨 후 ammonium sulfate(30~90%)로 포화시켜 얻은 효소를 Sephadex G-100(Fig. 1) 및 DEAE-Sephacel column chromatography(Fig. 2)하여 xylanase 활성을 나타내는 두 종류의 peak를 얻었는데 이들 중 뒤쪽 peak(xylanase II)를 이후의 실험에 이용하였다.

각 단계별 specific activity는 조효소에서 8.8 units/mg protein, ammonium sulfate 침전법 10.4 units/mg protein, Sephadex G-100 17.4 units/mg protein, 및 DEAE-Sephacel 38.2 units/mg protein으로 각각 1.2, 2.0, 4.3배 정제되었다(Table 1).

한편, 배 등(15)은 알칼리성 용액에서 높은 효소활성을 나타내는 *Bacillus stearothermophilus*의 specific activity가 17.68 units/mg으로 27.63배의 정제도를 보고하였고, Peltinen 등(16)은 *Bipolaris sorokiniana*의

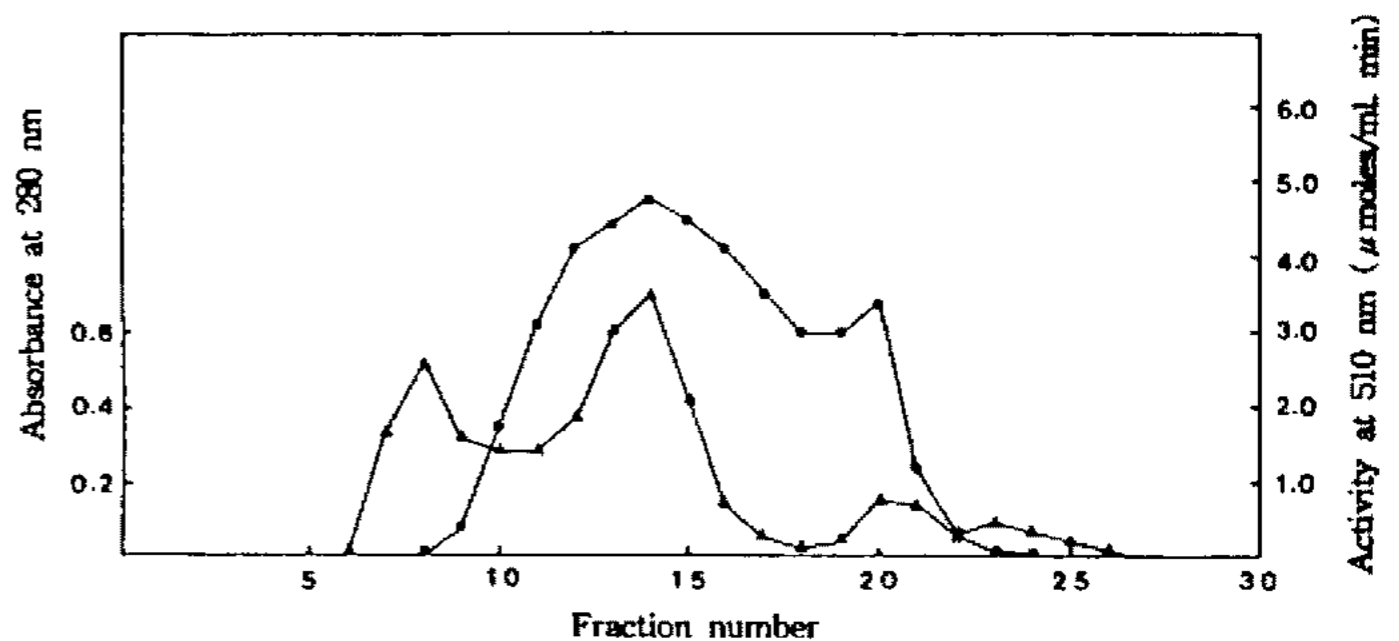


Fig. 1. Elution profile of xylanase II on Sephadex G-100 column chromatography (10×900 nm).

An aliquot of each fraction was assayed for xylanase II activity (●-●) and protein (▲-▲).

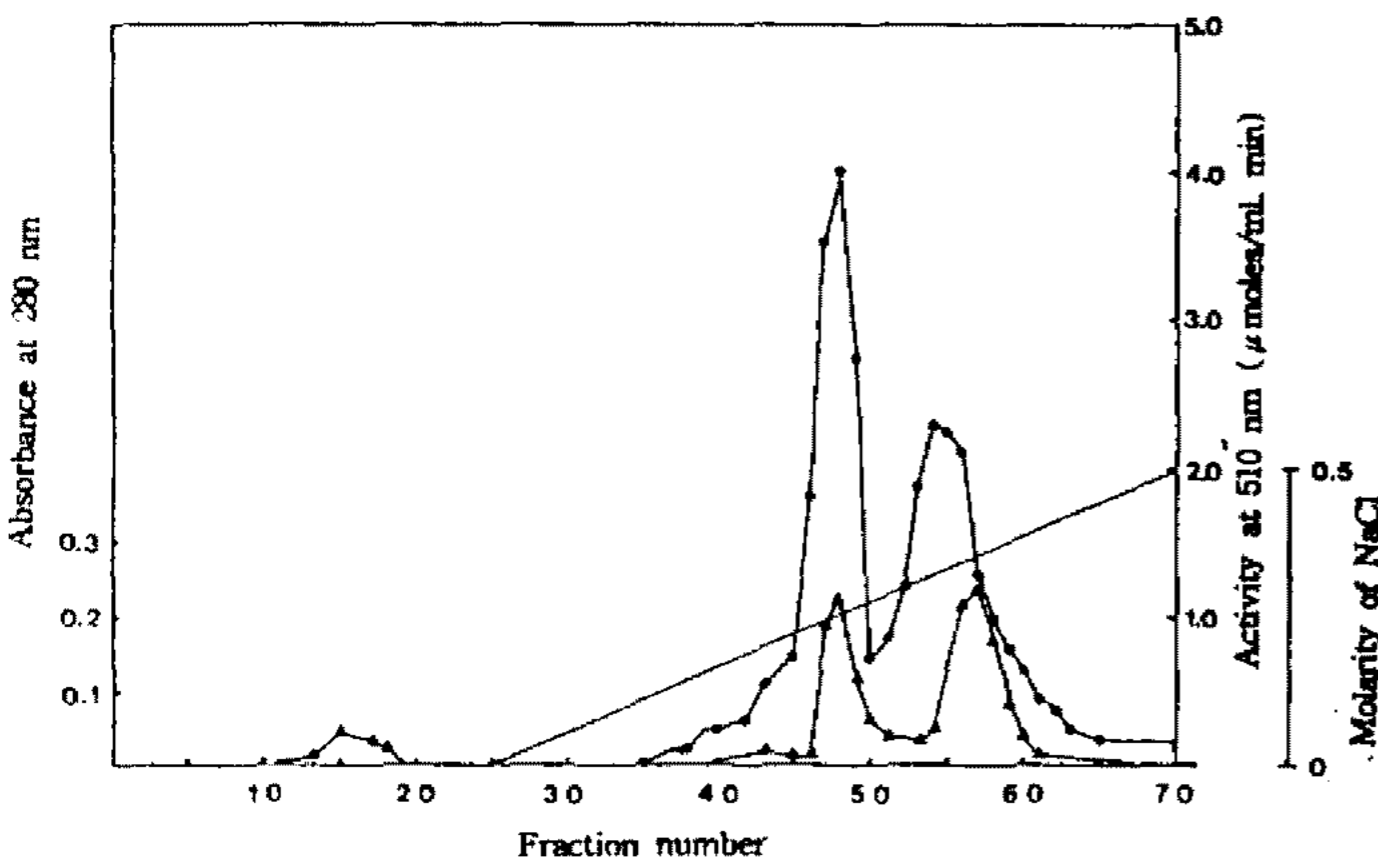
specific activity가 125 nkat/mg으로 13배의 정제도를, Li 등(17)은 *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1의 specific activity가 2,440 U/mg으로 5.8배 정제도를 보고한 바 있다.

**온도의 영향**

Xylanase II의 활성에 미치는 온도효과를 측정하기 위하여 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 xylan을 1%되게 용해시키고, 이 용액을 취하여 온도를 20~70°C까지 변화시키면서 정제된 효소액을 가하고 활성을 측정한 결과(Fig. 3), 50°C에서 최대 활성을 보였다. Peltonen 등(16)은 *Bipolaris sorokiniana*에서 생산되는 xylanase의 최대 활성온도가 70°C로서 상당히 높은 온도임을 보고하였고, 배 등(15)은 *Bacillus stearothermophilus*의 최적 반응온도가 55°C로, Li 등(17)은 *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1의 xylanase의 최대 활성온도가 54°C로서 본 xylanase II의 최적온도와 비슷한 것으로 나타났다.

**pH의 영향**

Xylanase II의 활성에 미치는 최적 pH를 측정하기 위하여 citrate-phosphate buffer(pH 3.0~6.5), phosphate buffer(pH 7.0~8.0)를 조제하여 xylan을 1%되게 용해시켜, 이 용액을 취하여 정제된 효소액을 가한 다음



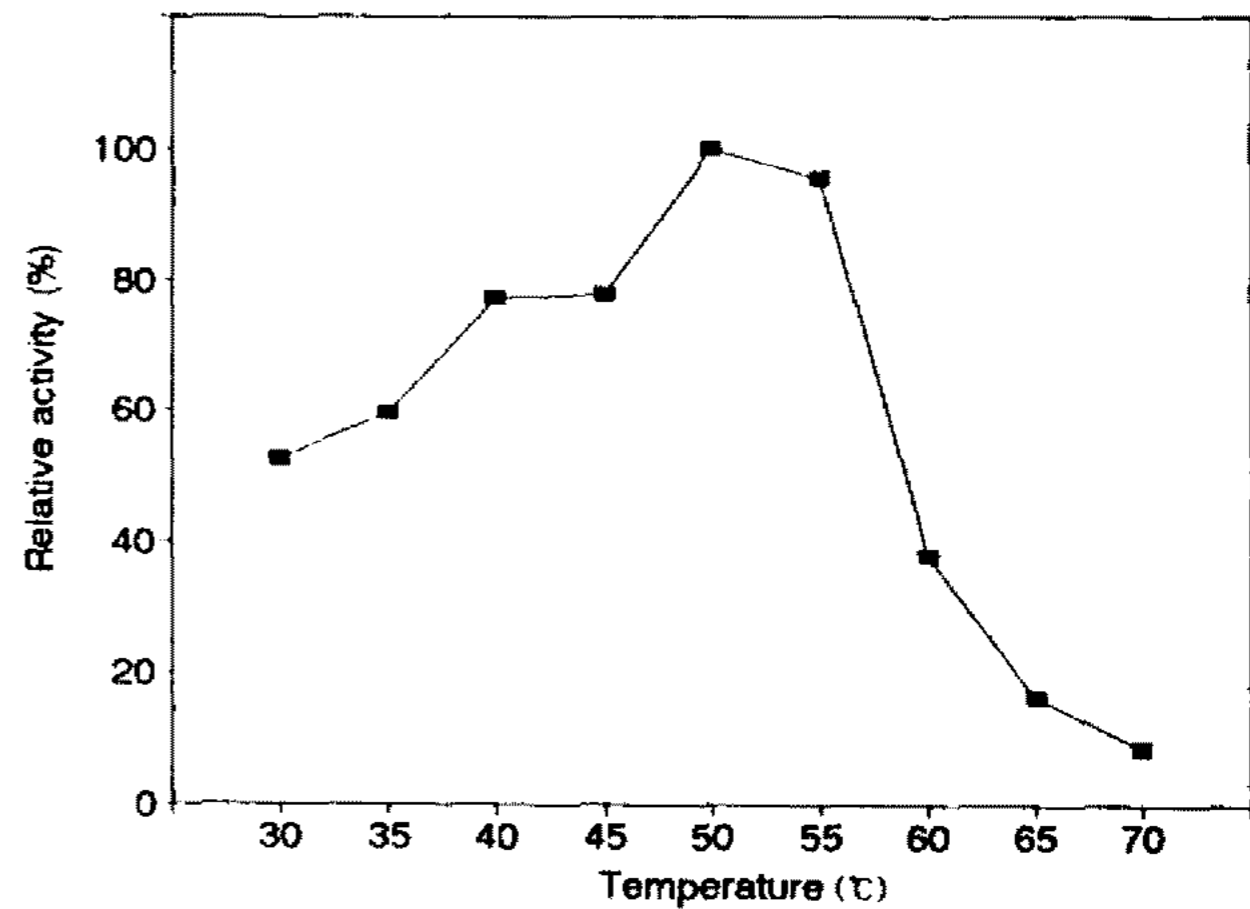
**Fig. 2. Elution profile of xylanase II on DEAE-Sephacel column chromatography (150×280 nm).** An aliquot of each fraction was assayed for xylanase II activity (●-●) and protein (▲-▲). A linear gradient indicated by the solid line.

**Table 1. The purification of xylanase II from *Aspergillus niger* SFN-416.**

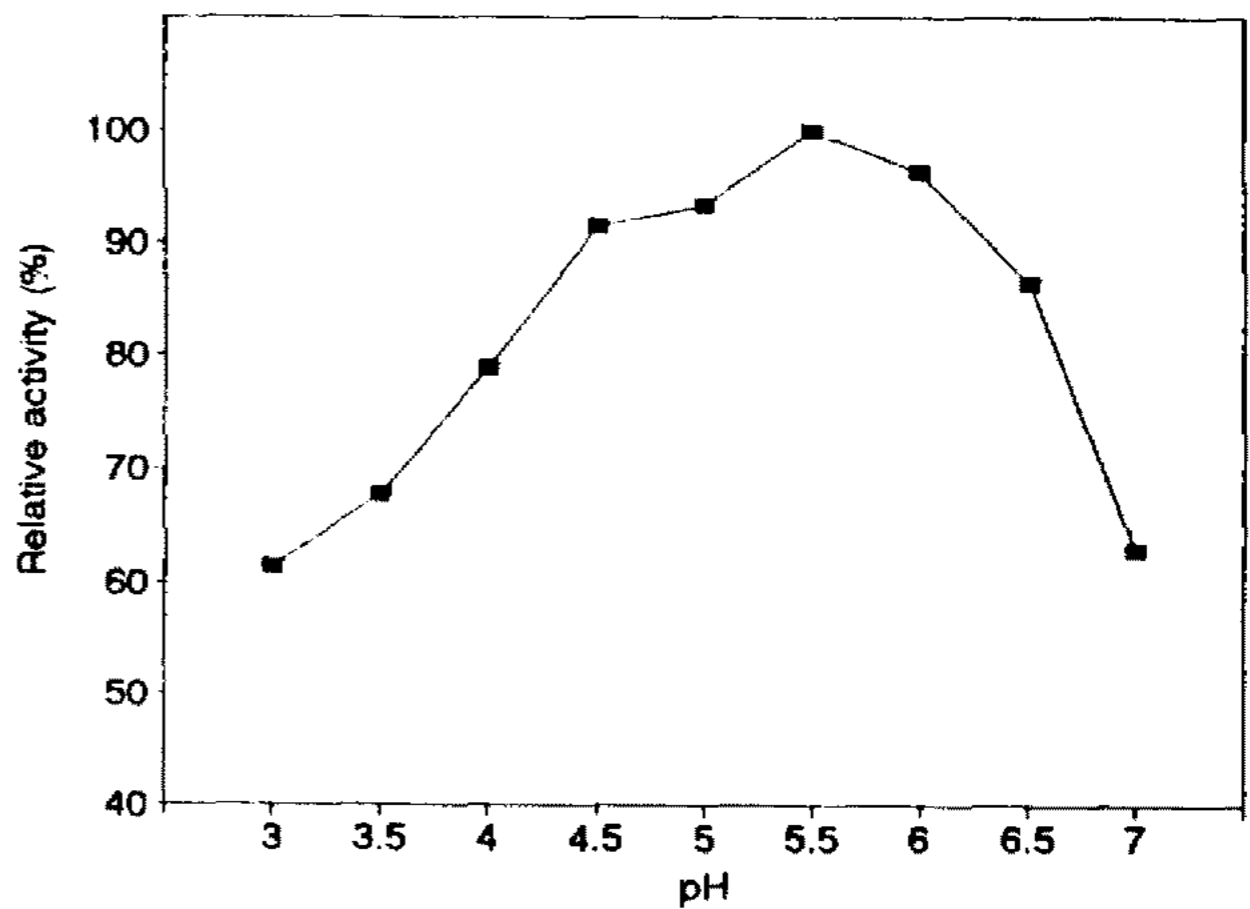
Purification step	Volume (ml)	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity (Units/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	125.0	858.4	97.5	8.8	1.0	100.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30~90%)	3.6	476.8	45.9	10.4	1.2	55.5
Sephadex G-100	60.0	415.2	23.8	17.4	2.0	48.4
DEAE-Sephacel	21.0	57.3	1.5	38.2	4.3	6.7

그 활성을 측정한 결과(Fig. 4), pH 5.5 부근에서 최적 활성을 나타내었다. Morales 등(18)은 *Bacillus polymyxa*로부터 생성된 alkaline xylanase의 X<sub>34</sub>C가 45°C, pH 6.0~7.0 사이에서 최적활성을, X<sub>34</sub>E가 50°C, pH 4.0~6.0 사이에서 최대활성을, X<sub>22</sub>가 55°C, pH 6.0~7.0 사이에서 최적활성을 가지는 것으로 보고 하였고, Braun과 Rodrigues(19)는 *Erwinia chrysanthemi*로부터 생성된 xylanase는 pH 5.5에서 최적활성을 가지는 것으로 보고하였다.

본 xylanase II는 이들 효소와 비슷한 pH에서 최적



**Fig. 3. Effect of temperature on xylanase II activity of *Aspergillus niger* SFN-416.**



**Fig. 4. Effect of pH on xylanase II activity of *Aspergillus niger* SFN-416.**

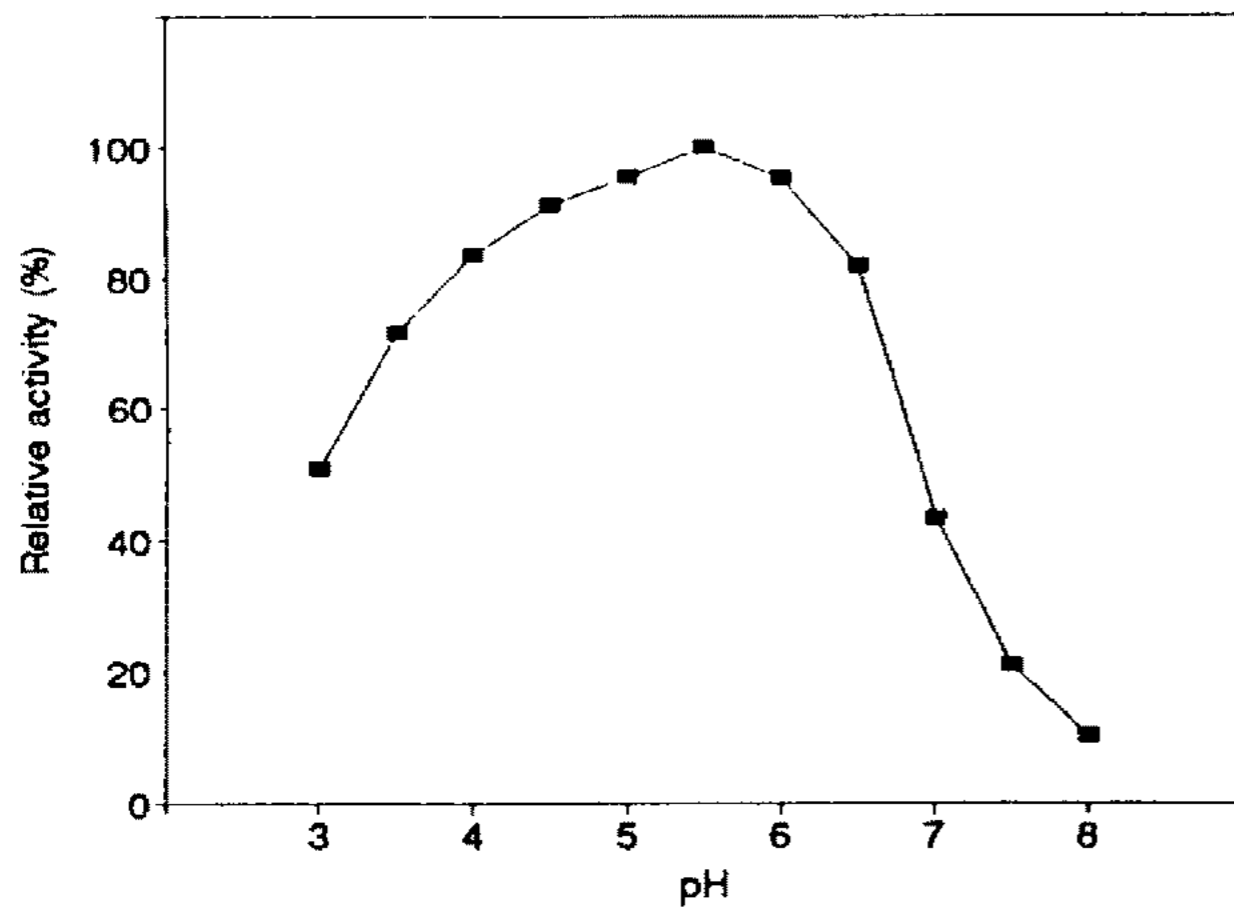


Fig. 5. Effect of pH stability on xylanase II of *Aspergillus niger* SFN-416.

활성을 나타내는 것으로 생각된다. pH 안정성을 측정하기 위하여 citrate-phosphate buffer(pH 3.0~6.5), phosphate buffer(pH 7.0~8.0)를 조제하고, 이 용액을 취하여 정제된 효소액을 가하고 50°C에서 1시간 동안 방치한 후 1% xylan을 가하여 활성을 측정한 결과(Fig. 5), pH 4.5~6.0 사이에서 비교적 안정함을 보였다. Braun과 Rodrigues(19)는 *Erwinia chrysanthemi*로부터 생성된 xylanase가 상당히 넓은 pH에서 안정함을 보였으며, 배 등(15)은 *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 xylanase는 pH 5.0~7.0 사이에서 비교적 안정한 것으로 보고 하였고, 김 등(20)은 *Bacillus* sp. N-25가 생산하는 xylanase는 pH 6.0~8.0 사이에서 안정한 것으로 보고하였다.

본 xylanase II는 이들 효소들 보다 약간 낮은 pH에서 안정성을 나타내는 것으로 생각된다.

#### 금속이온의 영향

금속이온들이 xylanase II 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 xylan을 1%되게 용해시키고, 이 용액에 각 금속이온들의 농도를 2 mM되게 하여 50°C를 유지시키면서 정제된 효소액을 가하여 활성을 측정한 결과(Table 2), 대부분의 금속이온에 효소활성이 저해되었고, 특히  $Hg^{2+}$ 에서는 3.7%로 강하게 효소활성이 저해됨을 보였다. 그렇지만  $Fe^{2+}$ 에서는 100%의 상대활성을 나타내었다. 배 등(15)은 *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 xylanase는  $Mn^{2+}$ 와  $Co^{2+}$ 에서 효소활성을 증가시키고,  $Hg^{2+}$ 는 저해효과를 나타내는 것으로 보고하였고, Braun과 Rodrigues(19)은 *Erwinia chrysanthemi*에서 생성되는 xylanase가 1 mM  $Hg^{2+}$ , 1 mM  $Ag^+$ 에서 완전히 저해되는 것으로, Park 등(21)은 알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14에서 생성되는 xylanase는  $Hg^{2+}$ 에 의해 강하게 저해됨을, 김 등(20)은 *Bacillus* sp. N-25에서 생성되는 xylanase는  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Mn^{2+}$ 에 의해 저해됨을 보고

Table 2. Effect of metal ions on xylanase II activity of *Aspergillus niger* SFN-416.

Ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	0	100
$K^+$	2	90.2
$Na^+$	2	96.3
$Ca^{2+}$	2	97.7
$Hg^{2+}$	2	3.7
$Sn^{2+}$	2	95.4
$Mg^{2+}$	2	93.7
$Cu^{2+}$	2	64.1
$Fe^{2+}$	2	100
$Mn^{2+}$	2	76.4
$Zn^{2+}$	2	94.8

Table 3. Effect of organic solvents on xylanase II activity of *Aspergillus niger* SFN-416.

Organic solvents	Concentration (%)	Relative activity (%)
None	0	100
Methanol	10	46.8
Ethanol	10	29.0
Isopropanol	10	12.9
1-Butanol	10	2.0

하였다.

본 xylanase II도  $Hg^{2+}$ 에 의해 강하게 저해되고, 많은 금속이온에 대해 저해를 보이므로써 비슷한 결과를 나타내는 것으로 생각된다.

#### 유기용매의 효과

Xylanase II 활성이 유기용매 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol 각각의 농도를 10%(v/v)되게 하고, xylan을 1%되게 용해시켜, 정제된 효소액을 가하여 50°C에서 10분간 반응시켜 활성을 측정한 결과(Table 3), 모두 낮은 활성을 나타내었고, 특히 1-butanol에서 거의 활성을 나타내지 않았다. 이 결과로부터 *Aspergillus niger* SFN-416이 생산하는 xylanase II은  $\beta$ -glucosidase(10) 보다 유기용매 효과가 좋지 않는 것으로 생각된다.

#### 분자량

정제된 xylanase II는 SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동을 하여 순도 및 분자량을 측정한 결과(Fig. 6), *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생성된 xylanase II의 분자량은 42,000 daltons으로 확인되었다. 한편, 본 xylanase II는 배 등(15)의 *Bacillus stearothermophilus*가



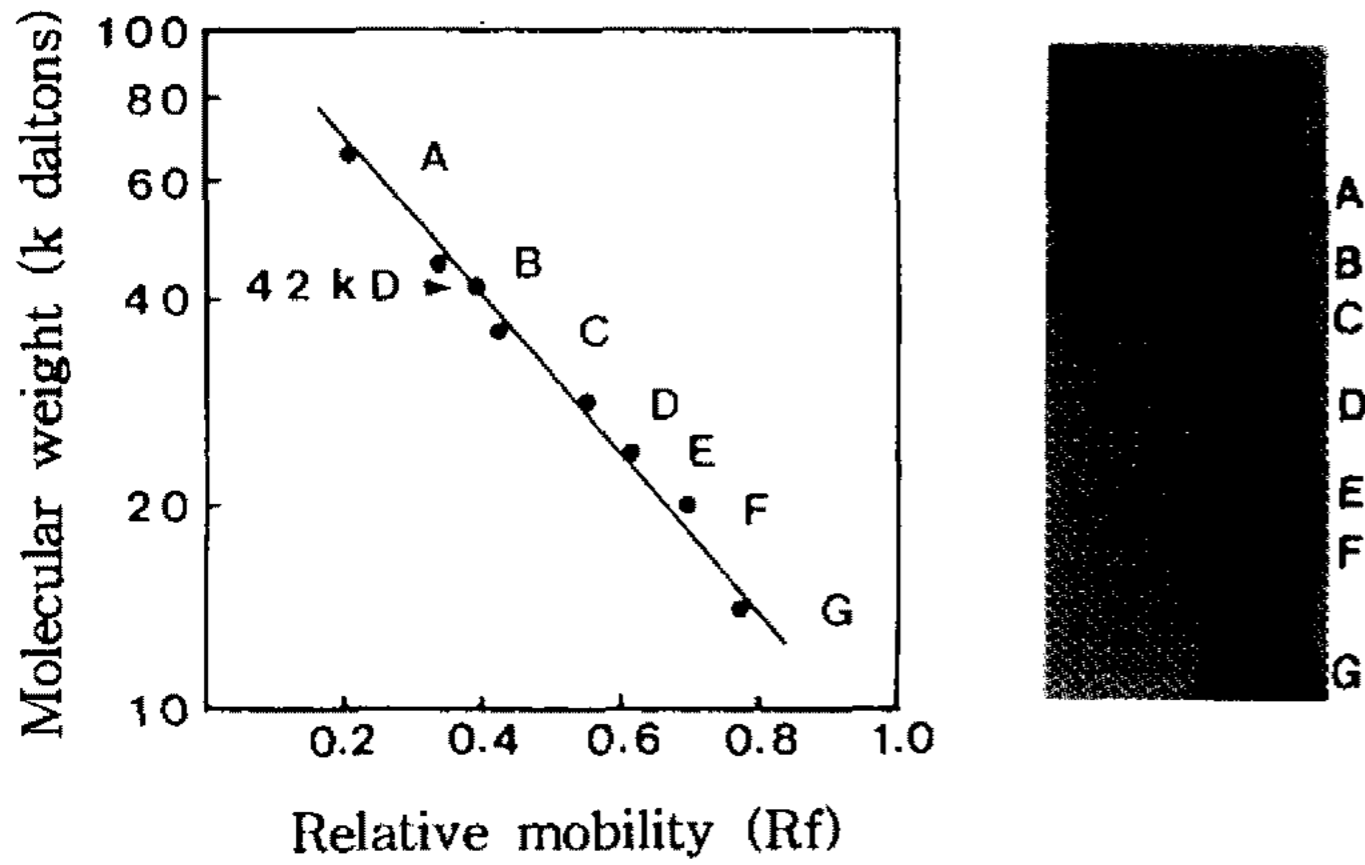


Fig. 6. Molecular weight determination of xylanase II from *Aspergillus niger* SFN-416 by SDS-PAGE.

A; Albumin, bovine (66,000 daltons), B; Albumin, egg (45,000 daltons), C; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36,000 daltons), D; Carbonic anhydrase (29,000 daltons), E; Trypsinogen (24,000 daltons), F; Trypsin inhibitor (20,100 daltons), G;  $\alpha$ -Lactalbumin (14,200 daltons)

생산하는 xylanase의 분자량인 170,000 daltons보다 낮았고, Braun과 Rodrigues(19)의 *Erwinia chrysanthemi*가 생산하는 xylanase의 분자량인 42,000 daltons과 비슷하였으며, 조 등(22)의 *Penicillium verruculosum*이 생산하는 D-xylanase II의 분자량인 22,000 daltons보다 높게 나타났다. 이와 같은 분자량의 차이는 미생물의 균종에 따라 다른 것으로 생각된다.

요 약

*Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생성된 xylanase II를 분리·정제하여 특성을 조사하였다. *Aspergillus niger* SFN-416의 배양액을 ethanol(70%) 침전,  $(NH_4)_2SO_4$  (30~90%) 침전, Sephadex G-100 chromatography 및 DEAE-Sephacel ion chromatography 등의 정제과정을 거친 결과, specific activity가 38.2 units/mg protein으로 4.3배 정제되었고, 정제효소의 최적 활성온도는 50°C였다. 최적 pH는 5.5이었고, pH 4.5~6.0 사이에서 비교적 안정하였다. 또한 금속이온에 대한 효소의 활성은 대부분 억제됨을 보였고, 특히  $Hg^{2+}$ 에서는 3.7%로 강하게 효소활성이 저해됨을 보였고,  $Fe^{2+}$ 에서는 100%의 상대활성을 나타내었다.

정제 효소의 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 42,000 daltons이었으며, 유기용매에 대한 활성은 10%의 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol에 대하여 모두 낮은 활성을 나타내었다.

참고문헌

1. Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1975. Purification,

properties and mode of action of hemicellulase II by *Ceratocystis paradoxa*. *Carbohydrate Research* **42**: 107-123.

2. Biely, P., J. Puls and H. Schneider. 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic system. *FEBS Lett.* **186**: 80-84.

3. Dekker, R.F.H. 1985. Biodegradation of the hemicelluloses. p. 505. In T. Higuchi (ed.), *Biosynthesis and biodegradation of wood components*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla..

4. Thomson, J.A. 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 65-82.

5. Woodward, J. 1984. Xylanase: functions, properties and application. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* **8**: 9-15.

6. Hancock, J.G. 1967. Hemicellulose degradation in sunflower hypocotyls infected with *Sclerotium*. *Phytopathology* **57**: 203-206.

7. Van Etten, H.D. and D.F. Bateman. 1969. Enzymatic degradation of galactan, galactomannan and xylan by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* **59**: 968-972.

8. Mullen, J.M. and D.F. Bateman. 1975. Polysaccharide degrading enzymes produced by *Fusarium roseum* 'Avenaceum' in cultures and during pathogenesis. *Physiological Plant Pathology* **6**: 233-246.

9. Viikari, L., A. Kantelinen, M. Ratto and J. Sundguist. 1990. In. ACS Symp. Ser. 460: G. E. Leatham and E. M. Himmel (Eds.), *American Chemical Society*, Washington DC.

10. 박석규, 문일식, 성낙제. 1993.  $\beta$ -Glucosidase를 생산하는 균주의 분리 및 조효소의 특성. *산업미생물학회지* **21**: 440-445.

11. Mandels, M. and E.T. Reese. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metal. *J. Bacteriol.* **73**: 269-278.

12. Miller, G.L. 1956. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.

13. Lowry, O.H., N.J. Resebrough, Farr A. Lewis and R.J. Randall. 1951. Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

14. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685.

15. 배성호, 최용진. 1991. *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 xylanase의 정제 및 특성. *산업미생물학회지* **19**: 592-597.

16. Peltonen, S., R. Karjalainen and M.L. Niku-Paavola. 1994. Purification and characterization of xylanase from *Bipolaris sorokiniana*. *Mycological Research* **98**: 67-73.

17. Li, X.L., Z.Q. Zhang, F.D.D. Jeffrey, L.E. Karl-Erik and G.L. Lars. 1993. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3212-3218.

18. Morales, P., A. Madarro, J.A. Perez-Gonzalez, J.M. Sendra, F. Pinaga and A. Flors. 1993. Purification and characterization of alkaline xylanase from *Bacillus Polymyxa*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1376-1382.

19. Braun, E.J. and C.A. Rodrigues. 1993. Purification and

- properties of an Endoxylanase from a corn stalk rot strain of *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology* **83**: 322-338.
20. 김원근, 이찬용, 이계호. 1992. *Bacillus* sp. N-25가 생산하는 xylanase의 특성. *산업미생물학회지* **20**: 559-564.
21. Park, Y.S., D.Y. Yum, B.K. Hahm, D.H. Bai and J.H. Yu. 1994. Purification, characterization and chemical modification of the xylanase from alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14. *J. Microbiol. Biotech.* **4**: 41-48.
22. 조남철, 강영태, 이태훈, 정기철, 김강화. 1992. *Penicillium verruculosum*으로부터 D-xylanase II의 정제 및 특성. *산업미생물학회지* **25**: 588-593.

(Received 28 July 1996)