

*Streptomyces thermocyaneoviolaceus*의 Xylanase 생산조건 및 Xylooligo당의 생산

최준호 · 권달호 · 이오석 · 주길재 · 박희동* · 이인구

경북대학교 농화학과, 경북대학교 식품공학과*

Production Conditions of Xylanase from *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* and Production of Xylooligosaccharides

Jun-Ho CHOI · Dal-Ho KWON · Oh-Seuk LEE · Gil-Jae JOO · Heui-Dong PARK* · In-Koo RHEE

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

* *Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University*

Abstract

A thermotolerant bacterium, *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* which produced xylan-degrading enzymes, utilized excellently xylan of wheat bran by producing the enzymes in comparison with that of birchwood or oat spelts. Optimal enzyme production was achieved in WB medium containing 0.8% wheat bran, 0.06% yeast extract, 0.06% bactopectone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 , and, 0.2% K_2HPO_4 (pH 7.0) at 50 °C for 24 hrs. The optimal pH and temperature for the hydrolysis of xylan were pH 5.5 and 65 °C, respectively. The enzyme activity was retained more than 80% at the range from pH 4.5 to pH 9.5 at 4 °C for 12 hrs and 94% on the heat-treatment at 60 °C for 1 hr. Xylobiose, xylotriose, xylose, and other xylooligosaccharides were produced as end products from hydrolysis of birchwood xylan by the xylanase of *S. thermocyaneoviolaceus*.

Key words : *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*, xylanase, xylooligosaccharides

1. 서론

식물세포벽의 주성분을 이루는 hemicellulose는 섬유질 biomass의 15~30%가량을 차지하며, cellulose에 비해서 산이나 알칼리에 의해서 쉽게 분해 및 추출될 수 있다. 이러한 hemicellulose의 주요구성성분은 xylan이며, 이 xylan은 활엽수 hemicellulose의 80~90%를, 침엽수 hemicellulose의 20~45%를 차지하고 있다(이 등, 1981).

자연계에서 xylan은 여러 가지 종의 곰팡이와 세균들이 생산하는 extracellular enzyme들의 작용에 의해 최종적으로 단당류로 가수분해된다(Dekker와 Richards, 1976; Dekker, 1985; Wong 등, 1988). Xylan을 가수분해하는 효소로는 endoxylanase인 β -1,4-xylanase (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8)와 exoxylanase인 β -xylosidase(1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37)가 있다(Dekker와 Richards, 1976; Reilly, 1981). β -1,4-xylanase는 β -1,4-D-xylopyranoside의 주골격에 acetyl, arabinosyl 및 glucuronosyl 잔기가 side chain으로 연결되어 있는 xylan의 β -1,4-D-xylopyranosyl linkage를 절단하여 xylooligo당을 생산하며(Dekker, 1985; Irwin 등, 1994), 이 xylooligo당은 β -xylosidase에 의해서 최종분해산물인 xylose로 가수분해된다(Biely, 1980; Frederick 등, 1985).

방선균종 *Streptomyces*속의 미생물은 자연 환경내의 xylan을 비롯한 복합탄수화물을 분해할 수 있는 다양한 가수분해효소를 생산한다. 이 중에서 xylan 가수분해효소를 많이 생산하는 균으로는 *Streptomyces* sp.(Nakajima 등, 1984; Yasui 등, 1988), *S. halstedii*(Ruiz-Arribas 등, 1995), *S. lividans*(Morosoli 등,

1986; Shareck 등, 1991), *S. thermoviolaceus*(Tsujiibo 등, 1992; Garg 등, 1996) 등이 보고되어 있다.

Xylan의 가수분해산물인 xylooligo당은 xylose가 β (1 \rightarrow 4) 결합으로 2~7개가 연결된 올리고당이다. 이러한 xylooligo당은 난소화성 당으로 감미도는 설탕의 50%정도이며 장내 소화효소에 의해 분해되지 않고 칼로리가 매우 낮은 장점을 가지고 있을 뿐만 아니라, 설탕과는 달리 충치의 원인이 되지 않는 물질로서 특히 비만 및 당뇨병으로 설탕의 섭취가 제한되는 사람에게 좋다(安田, 1993). 또한 xylooligo당은 섭취후 소장에서 분해되지 않고 대장까지 도달되어 장내 유용세균인 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용되기 때문에 장내균총의 변화를 가져다주는 동시에 장의 운동을 촉진시켜 변비의 개선효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 기능성 건강식품으로서 요구르트, 차, 빵, 젤리 및 프리믹스 제품 등의 첨가제로서 그 사용이 기대된다(安田, 1993).

Xylan으로부터 효율적인 xylooligo당의 생산을 위해서는 xylanase가 필수적이며 따라서 이를 효율적으로 생산하는 미생물의 분리가 수반되어야 할 것이다. 이와 같은 관점에서 보다 효율적으로 xylooligo당을 생산할 수 있는 xylanase 생산균을 선별하고, 선별균이 생산하는 xylanase의 특성을 검토하여 xylooligo당을 생산하기 위한 기초연구로서 본 실험을 시도하였다. 그래서 본 연구에서는 내열성이 좋으면서 효소활성이 높고 효소생산량이 많은 *S. thermocyanoviolaceus* M049를 선별하여 효소생산조건을 조사하고 효소에 의한 xylooligo당의 생산양상을 조사한 바를 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양

가. 사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC) 및 한국종균협회 부설 미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 내열성 세균 및 방선균류 34주와 부식토에서 직접 분리한 세균 및 방선균류 50여주 중에서 xylanase 생산력이 가장 우수한 *S. thermocyaneoviolaceus* M049를 선발하여 사용하였다.

나. 균의 배양

사용균은 XM배지(1.0% birchwood xylan, 0.1% yeast extract(Difco 사), 0.1% bacto-peptone(Difco사), 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 및 0.2% K_2HPO_4)에 XM한천배지상의 포자 1 백급이를 접종하여 50 °C에서 24 시간 진탕배양(200 rpm, rotary shaker)하여 종배양액으로 사용하였다. 본배양은 XM배지에 종배양액을 2% 접종하여 동일조건으로 배양하였다. 위의 XM 배지를 기본으로 하여 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract, 0.06% bacto-peptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 및 0.2% K_2HPO_4 로 구성된 배지를 효소생산을 위한 배지(WB배지)로 개발하여 동일조건으로 배양하였다.

2. 조효소액의 조제 및 xylanase의 활성 측정

*S. thermocyaneoviolaceus*의 WB배지 배양액을 탈지면으로 여과후 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 균체를 제거하고 상청액을 조효소액으로 하여 효소생산성 조사에 사용하였으며, 효소학적 성질 및 xylan 분해조건의

조사는 배양 원심상청액에 고체상태의 황산암모니아를 가하여 50% 포화시켜 하룻밤 방치 후, 12,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 침전물을 최소량의 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹여 동일완충액으로 2 시간마다 교환하면서 8 시간이상 투석한 것을 조효소액으로 사용하였다.

Xylanases의 활성을 측정하기 위하여 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.2 ml에 효소액(또는 배양상청액) 0.2 ml와 1.0% birchwood xylan 현탁액 0.4 ml를 혼합하여 50°C에서 30 분간 반응시킨 후 DNS (dinitro-salicylic acid, Miller, 1959) 용액 0.8 ml를 가하여 효소반응을 정지시키고 반응액을 boiling water bath에서 10 분간 반응시킨 후 급냉하고 재증류수 2.4 ml를 첨가하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성단위는 위의 조건에서 1 분간에 1 μ mol의 xylose에 해당하는 환원당을 생산하는 효소의 양으로 나타내었다.

3. 당의 분석

가. TLC(Thin layer chromatography)에 의한 분석

Xylan을 효소로 분해한 후, 생성된 xylooligo당을 TLC(Silica gel 60 F₂₅₄, E. Merck사)로 분석하였다. 전개용매는 1-butanol : 2-propanol : water : acetic acid : acetonitrile(7 : 5 : 4 : 10 : 2, V/V/V/V/V)을 사용하였고, 발색시약으로 orcinol : sulfuric acid : methanol (0.2 : 10 : 90, W/V/V)에 담근후 95 °C에서 5 분간 발색시켜 확인하였다.

나. HPLC(High performance liquid chromatography)에 의한 분석

Xylan을 효소로 분해한 후, 생성된 xylooligo당을 Sugar-Pak I column(ϕ 6.5×300 mm, Water

Co.)이 장착된 HPLC(Water Model 600E; Refractive Index Detector)를 사용하여 분석하였다. 이동상으로는 Ca-EDTA 용액(50 mg Ca-EDTA/l 초순수)을 사용하였고, column의 온도는 85 °C이고, 유속은 분당 0.5 ml로 하고, 주입량은 20 µl로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효소생산을 위한 배양조건

가. 배양초기 pH의 영향

효소생산에 미치는 배양초기 pH의 영향을 조사하기 위해서 XM배지에서 배지초기 pH를 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH로 pH 4.0~10.0으로 조정한 후 배양한 결과, 그림 1과 같이 pH 7.0에서 가장 높은 생산성을 나타내었고, pH 6이하와 pH 8이상에서는 효소생산이 68%이하로

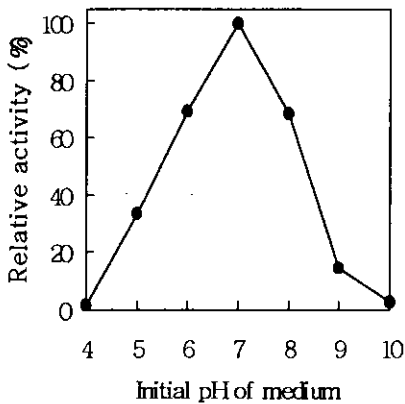


Fig. 1. Effect of the initial pH on the xylanase production. The medium was composed of 1.0% birchwood xylan, 0.1% yeast extract, 0.1% bactopectone, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.005% FeSO₄ · 7H₂O, 0.05% KH₂PO₄, and 0.2% K₂HPO₄. The pH was adjusted by 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH.

낮아짐을 알 수 있었다.

나. 기질 종류별 영향

XM배지의 xylan 대신에 경제성을 고려하여 밀기울, 쌀겨(rice bran), 왕겨(rice hull), glucose 및 sucrose 등 각종 기질의 종류가 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 표 1과 같이 xylanase 생산량은 밀기울을 첨가한 배지에서 가장 높게 나타났다. 또한 기본배지의 성분을 첨가하지 않고 1.0% 밀기울만 증류수에 가하여 조제한 배지에서도 XM배지보다 높은 효소생산성을 나타내었으며, 쌀겨나 왕겨를 첨가한 배지에서도 glucose나 sucrose를 첨가한 배지에 비해서 상대적으로 높은 효소생산성을 나타내었다. 따라서 본 균에 의한 xylanase 생산에서는 값비싼 xylan 대신에 값싸게 구입할 수 있는 밀기울을 사용함으로써 효소생산단가를 낮출 수 있게 되었다.

Table 1. Effect of substrates on the xylanase production

Substrate (1%)	Xylanase activity (unit/ml)	Relative activity (%)
Birchwood xylan	1.43	100 ^a
Oat spelts xylan	0.79	55
Glucose	0.21	15
Sucrose	0.21	15
Rice hull	0.43	30
Rice bran	0.59	41
Wheat bran	2.47	173
Only wheat bran ^b	2.28	159

Basal medium was composed of 0.1% yeast extract, 0.1% bactopectone, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.005% FeSO₄ · 7H₂O, 0.05% KH₂PO₄, and 0.2% K₂HPO₄.

a, The activity in the birchwood xylan was taken as 100%.

b, The medium contained only 1% wheat bran without basal medium.

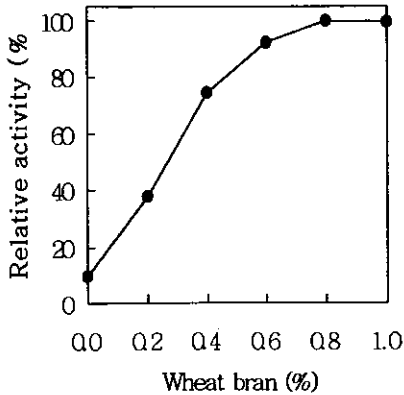


Fig. 2. Effect of wheat bran concentration on the xylanase production. Basal medium was composed of 0.1% yeast extract, 0.1% bactopectone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 , and 0.2% K_2HPO_4 .

다. 밀기울 농도의 영향

밀기울 농도가 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해서 XM배지에 xylan 대신에 밀기울을 농도별로 첨가하여 xylanase 생산성을 조사한 결과, 그림 2와 같이 밀기울 농도 0.8%에서 가장 높은 효소생산성을 나타내었다.

라. Yeast extract 및 peptone 농도의 영향

Xylanase 생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던 0.8% 밀기울을 첨가한 배지에서 yeast extract 농도가 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해서 birchwood xylan 대신에 0.8% 밀기울을 가한 XM배지에 yeast extract를 농도별로 첨가하여 xylanase 생산성을 조사한 결과, 그림 3과 같이 yeast extract의 농도에 따른 효소생산성의 영향은 거의 없었으나, 0.06~0.2%농도에서 약간 높은 효소생산을 보였고, 0.3%이상에서는 오히려 감소하였다.

Xylanase 생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract를 첨가한 배지에서 peptone 농도가 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해서 bactopectone을 농도별로 첨가하여 xylanase 생산성을 조사한 결과, 그림 3과 같이 bactopectone의 농도에 따른 효소생산성의 영향은 거의 없었으나, 0.06%정도의 저농도에서 약간 높은 효소생산을 보였고, 0.2%이상에서는 오히려 감소하였다.

그래서 최종적으로 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract, 0.06% bactopectone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 및 0.2% K_2HPO_4 (pH 7.0)로 구성된 효소생산배지(WB배지)를 확립하였다.

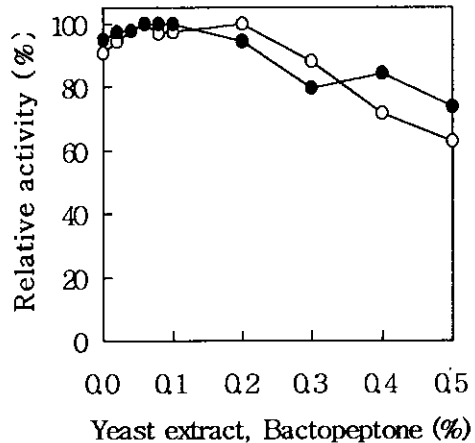


Fig. 3. Effect of yeast extract and peptone concentration on the xylanase production. Basal medium was composed of 0.8% wheat bran, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 , and 0.2% K_2HPO_4 . Effect of yeast extract (○-○) and bactopectone(●-●) concentration were investigated in the basal medium containing 0.1% bactopectone and 0.06% yeast extract, respectively.

2. 효소학적 성질

가. 최적 pH와 pH 안정성

효소활성 최적 pH를 조사하기 위해서 pH 3.0~6.0사이에서는 100 mM citratephosphate buffer로 pH 6.0~8.0사이에서는 100 mM sodium phosphate buffer 및 pH 8.0~10.0사이에서는 100 mM Tris-HCl buffer로 pH 3.0~10.0 사이에서의 효소활성을 측정된 결과, 그림 4와 같이 최적 pH는 5.5였으며, pH 5.0~9.0 사이에서는 93%이상의 효소활성을 나타내었고 pH 4.5이하에서는 효소의 활성이 급격히 낮아짐을 알 수 있었다. 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서 위와 동일한 완충액을 사용하여 각 pH별로 효소를 4℃에서 12시간 방치한 후 pH를 7.0으로 조정하여 잔존활성을 측정된 결과, 그림 4와 같이 pH 4.5~9.5사이에서 80%이상의 활성을 유지하였다.

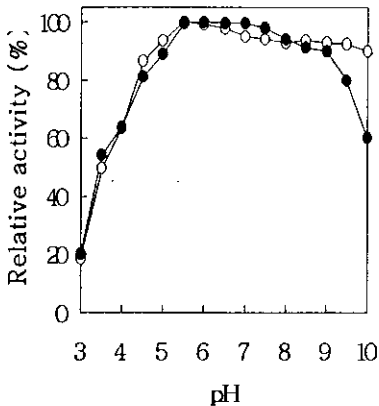


Fig. 4. Optimal pH(○—○) and pH stability (●—●) of xylanase of *S. thermocyaneoviolaceus*. The buffers used: pH 3.0~6.0, 100 mM citrate-phosphate buffer; pH 6.0~8.0, 100 mM sodium phosphate buffer; pH 8.0~10.0, 100 mM Tris-HCl buffer.

S. thermoviolaceus OPC-520이 생산하는 xylanase인 Stx I 과 Stx II는 최적작용 pH가 7.0이고 pH 5.0~9.0에서 안정하였고(Tsujibo 등, 1992), *S. halstedii*의 xylanase는 최적작용 pH가 6.3이고 pH 4.0~10.0에서 안정하였다(Ruiz-Arribas 등, 1995). 본 효소는 이 효소들보다 낮은 pH에서 효소활성 최적 pH를 나타내었고, pH 안정성은 서로 비슷하였다.

나. 최적온도와 열 안정성

효소의 최적활성온도를 조사하기 위해서 pH 7.0에서 30 분간 각 온도별로 효소활성을 측정된 결과, 그림 5와 같이 최적온도는 65℃였으며, 40~60℃사이에서는 60~93%, 70℃에서는 89%이상의 효소활성을 나타내었고, 75℃이상에서는 효소의 활성이 급격히 낮아짐을 알 수 있었다. 효소의 열 안정성을 조사하기 위해서 효소를 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에서 각 온도별로 60 분간 방치 후 50℃에서 잔존활성을 측정된 결과, 그림 5와 같이 비교적 높은 온도인 60℃까지도 94%이상의 효소활성을 유지하였다.

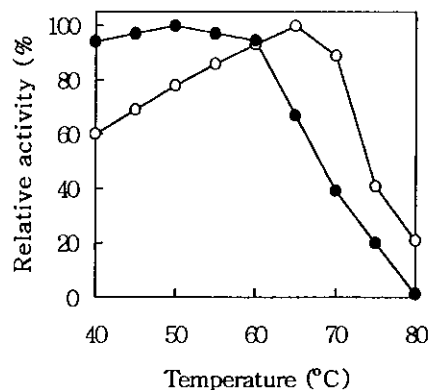


Fig. 5. Optimal temperature(○—○) and thermal stability(●—●) of xylanase of *S. thermocyaneoviolaceus*.

S. thermoviolaceus OPC-520이 생산하는 xylanase인 Stx I 과 Stx II의 최적온도가 각각 70 °C와 60 °C이고, 60 °C이상에서 30 분후 효소활성이 급격히 낮아졌고(Tsujibo 등, 1992), 내열성 방선균인 *Streptomyces* T7의 xylanase는 최적작용온도가 60 °C이고 60 °C에서 효소활성 반감기가 30 분이였다(Keskar 등, 1989). 본 효소는 효소활성 최적온도는 두 내열성 방선균의 xylanase와 비슷했지만, 열안정성은 60 °C에서 60 분 처리후에도 94 %이상의 효소활성을 유지하는 내열성이 높은 효소임을 알 수 있었다.

3. Xylooligo당의 생산조건

가. 반응 pH별 분해양상

반응 pH별 xylan 분해양상을 확인하기 위해서 pH 5.0에서는 50 mM citrate-phosphate buffer로 pH 6.0~8.0사이에서는 50 mM sodium phosphate buffer로 pH 9.0에서는 50 mM Tris-HCl buffer로 각각 희석한 xylanase 용액 2 ml(5 unit/ml)와 2% birchwood xylan 용액 2 ml를 혼합하여 반응 pH별 분해산물을 확인한 결과, 그림 6A와 그림 7A와 같이 pH가 낮을수록 xylo-tetraose(X₄)이상의 xylooligo당의 양에 비해서 xylobiose, xylo-triose 및 xylose의

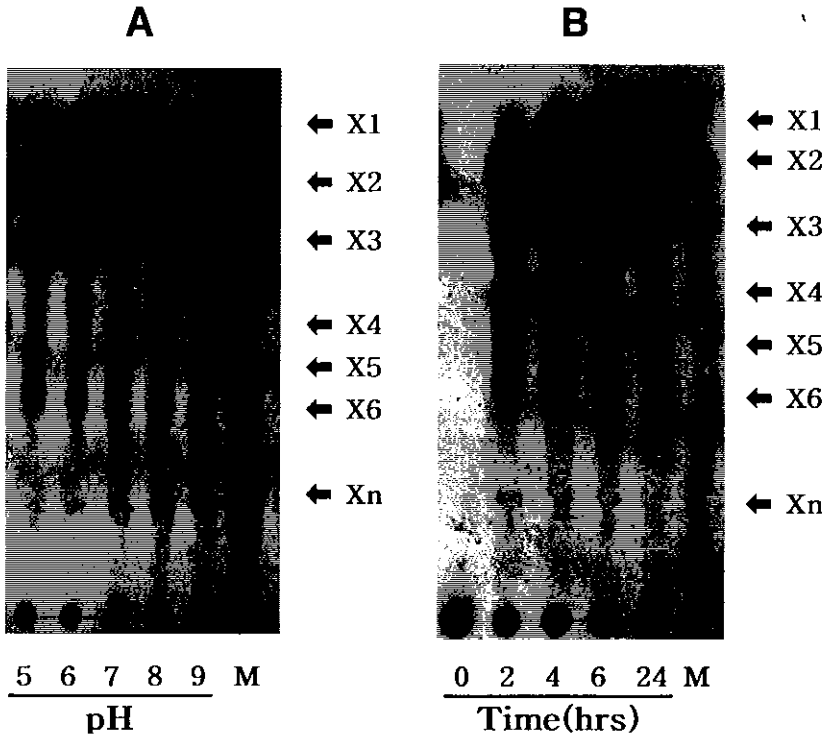


Fig. 6. TLC analysis of xylooligosaccharides in birchwood xylan hydrolysis by xylanase of *S. thermocyanoviolaceus* at various pH(A) and reaction time(B). The reaction mixture consisted of 2 ml of 2% birchwood xylan solution and 2 ml of xylanase solution(5 unit/ml). X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylo-triose; X4, xylo-tetraose; X5, xylo-pentaose; X6, xylo-hexaose; Xn, xylooligosaccharides longer than xylo-hexaose; X, xylan. M, Marker.

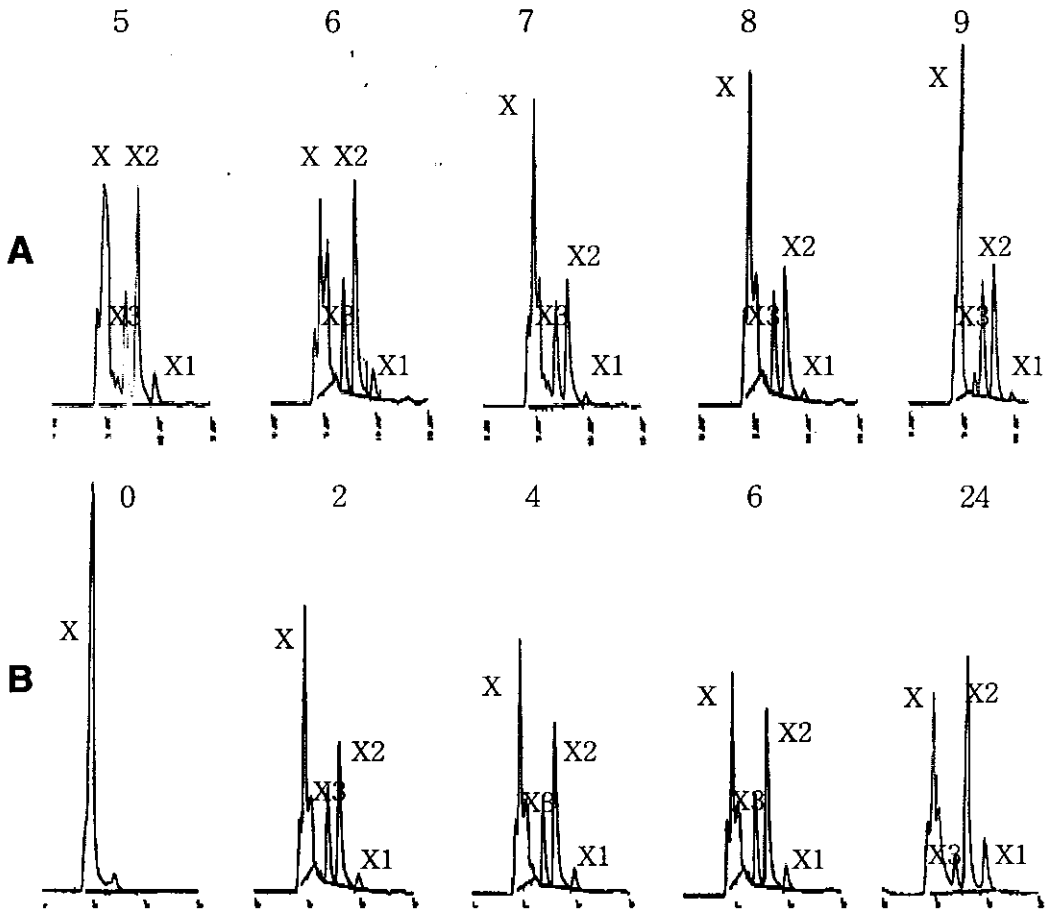


Fig. 7. HPLC analysis of xylooligosaccharides in birchwood xylan hydrolysis by xylanase of *S. thermocyaneoviolaceus* at various pH(A) and reaction time(B). Symbols are the same as Fig. 6.

양이 증가하였고, pH가 높을수록 X₄이상의 xylooligo당이 많이 생산되었다. xylan의 상대량은 pH 9.0에서는 54%로 감소한 것에 비해서 pH 5.0에서는 49%로 감소되었다.

나. 반응시간별 분해양상

반응시간별 xylan 분해양상을 확인하기 위해서 pH 7.0에서 50 mM sodium phosphate buffer로 희석한 xylanase 용액 2 ml(5 unit/ml)와 2% birchwood xylan 용액 2 ml를 혼합하

여 반응시간별 분해산물을 확인한 결과, 그림 6B와 그림 7B와 같이 반응초기에는 xylan의 양이 감소하면서 xylobiose, xylotriose, X₄이상의 xylooligo당 및 소량의 xylose가 생산되었으며, 반응 24 시간후에는 xylan의 상대량은 25%로 감소하고 X₄이상의 xylooligo당의 양이 상대적으로 감소하면서 주분해산물로 xylobiose가 생산되었으며 xylotriose와 xylose도 소량 생산됨을 확인하였다.

각종 *Streptomyces* sp.(Yasui 등, 1988)와 *S. thermoviolaceus* OPC-520이 생산하는 xylanase(Tsujibo 등, 1992)의 xylan 분해산물은 xylose와 xylobiose이며, *S. halstedii*가 생산하는 xylanase의 xylan 분해산물은 xylobiose가 주성분이고 xylotriose, X₄ 및 소량의 xylose이며(Ruiz-Arribas 등, 1995), *Streptomyces* T7이 생산하는 xylanase의 분해산물은 xylobiose와 xylooligo당(X₃~X₆)이고 16 시간 분해후 소량의 xylose를 생산하였다. 본 균인 *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase로 생산되는 xylan 분해산물은 주로 xylobiose를 생산하고 xylose, xylotriose 및 X₄이상의 각종 xylooligo당을 생산하기 때문에 새로운 기능성 식품인 xylooligo당의 제조에 이용될 수 있을 것 같다.

IV. 적 요

농산폐자원으로부터 기능성물질인 xylooligo당을 생산하기 위해서 내열성 균주인 *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase의 생산최적조건을 검토한 결과, 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract, 0.06% bactopectone, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.005% FeSO₄·7H₂O, 0.05% KH₂PO₄ 및 0.2% K₂HPO₄를 함유한 배지(pH 7.0)에서 50℃, 24시간 배양시 최고효소활성(2.47 unit/ml)의 배양상징액을 얻을 수 있었다. 효소의 최적반응조건은 pH 5.5, 65℃였다. 또한 pH 안정성을 조사한 결과 pH 4.5~9.5사이에서 4℃에서 12시간후에도 80% 이상의 효소활성을 유지하였고, 열 안정성은 60℃에서 1시간 처리후 94%이상의 효소활성을 유지하는 내열성이 있는 효소였다. 생

산된 xylanase의 birchwood xylan 반응생성물을 TLC 및 HPLC로 확인해 본 결과, pH가 낮을수록(pH 5.0~6.0) xylobiose와 xylotriose 및 소량의 xylose의 양이 증가하였고, pH가 높을수록(pH 8.0~9.0) X₄이상의 각종 xylooligo당의 양이 상대적으로 증가하였다. 또한 24시간후에는 xylan의 상대량이 25% 이하로 감소하면서 주분해산물로 xylobiose가 생산되었으며 xylotriose와 xylose 및 X₄ 이상의 각종 xylooligo당이 생산되었다.

V. 감사의 글

본 논문은 1997년도 농림기술연구과제 연구비지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. Trends Biotechnol., 3: 286-290.
2. Dekker, R. F. H. 1985. Biodegradation of the hemicelluloses. pp. 505-533. In T. Higuchi(ed.), Biosynthesis and biodegradation of wood components. Academic Press Inc., Orlando, Fla.
3. Dekker, R. F. H., and G. N. Richard. 1976. Hemicellulases : their occurrence, purification, properties, and mode of action. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 32: 277-352.
4. Frederick, M. M., C. H. Kiang, J. R. Frederick, and P. J. Reilly. 1985. Purification and characterization of endo-xylanases

- from *Aspergillus niger*. Two isozymes active on xylan backbones near brachpoint. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 525-532.
5. Garg, A. P., A. J. McCarthy, and J. C. Roberts. 1996. Biobleaching effect of *Streptomyces thermoviolaceus* xylanase preparations on birchwood kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.*, 18: 261-267.
 6. Irwin, D., E. D. Jung, and D. B. Wilson. 1994. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(3): 763-770.
 7. 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.
 8. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31: 426-428.
 9. 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.
 10. Nakajima, T., K. Tsukamoto, T. Watanabe, K. Kainuma, and K. Matsuda. 1984. Purification and some properties of an endo-1,4- β -D-xylanase from *Streptomyces* sp. *J. Ferment. Technol.*, 62(3): 269-276.
 11. Reilly, P. J. 1981. Xylanase : structure and function. *Basic Life Sci.*, 18: 111- 129.
 12. Ruiz-Arribas, A., J. M. Fernandez-Abalos, P. Sanchez, A. L. Garda, and R. I. Santamaria. 1995. Overproduction, purification, and biochemical characterization of a xylanase(Xys1) from *Streptomyces halstedii* JM 8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6): 2414-2419.
 13. Shareck, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli, and D. Kluepfel. 1991. Sequence of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. *Gene*, 107: 75-82.
 14. 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(1): 371-375.
 15. Wong, K., Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms : functions and applications. *Microbiol. Rev.*, 52: 305-317.
 16. Yasui, T., M. Marui, I. Kusakabe, and K. Nakanishi. 1988. Xylanases of *Streptomyces*. *Methods Enzymol.* 160: 648-654.
 17. 安田 隆. 1993. キシロオリゴ糖の加工食品への応用. *New Food Industry*, 35: 72-79.
 18. 이종윤, 윤병호, 민두식. 1981. 선진문화사. 목재화학. 417p.