

## *Paenibacillus* sp. DG-22에서의 $\beta$ -xylosidase 생합성 조절

이태형 · 임평옥<sup>1</sup> · 이용익\*

동국대학교 과학기술대학 생명공학과, <sup>1</sup>제주대학교 사범대학 과학교육과

Received January 4, 2007 / Accepted February 22, 2007

**Regulation of  $\beta$ -xylosidase biosynthesis in *Paenibacillus* sp. DG-22.** Tae Hyeong Lee, Pyung Ok Lim<sup>1</sup> and Yong-Eok Lee\*. Department of Biotechnology, Dongguk University, Kyungju, Kyongbuk 780-714, Korea. <sup>1</sup>Department of Science Education, Cheju National University, Jeju-Si, Jeju 690-756, Korea - Regulation of  $\beta$ -xylosidase synthesis in *Paenibacillus* sp. DG-22 was studied to optimize the enzyme production.  $\beta$ -Xylosidase synthesis of the *Paenibacillus* sp. DG-22 was observed to be regulated by carbon sources present in culture media. The synthesis of  $\beta$ -xylosidase was induced by xylan and methyl  $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\beta$ MeXyl) but slightly repressed by readily metabolizable monosaccharides.  $\beta$ MeXyl was found to be the best substrate for the induction of  $\beta$ -xylosidase and the most effective induction was obtained at a concentration of 10 mg/ml.  $\beta$ -Xylosidase production showed a cell growth associated profile with the maximum amount formed during the late exponential phase of growth. The presence of glucose and xylose decreased the level of  $\beta$ -xylosidase activity indicating that its production was subjected to a form of carbon catabolite repression. SDS-PAGE and zymogram techniques demonstrated the induction by  $\beta$ MeXyl and revealed the presence of one  $\beta$ -xylosidase of approximately 80 kDa.

**Key words** – *Paenibacillus* sp. DG-22,  $\beta$ -xylosidase, regulation

### 서 론

자연에서 cellulose 다음으로 많이 존재하는 탄수화물인 xylan은 식물 세포벽을 구성하는 hemicellulose의 주된 성분으로 xylopyranose들이  $\beta$ -1,4 결합으로 연결된 중합체 골격에 L-arabinofuranose, D-glucuronic acid 및 acetyl기 등이 치환된 구조로 되어있다[1]. 따라서 xylan의 완전한 분해를 위해서는 endoxylanase,  $\beta$ -xylosidase 및  $\alpha$ -arabinosidase와 acetyl esterase와 같은 치환기를 끊는 효소들의 협동작용이 필요하다[19]. 이들 xylan 분해효소들 중 주된 효소는 endoxylanase (1,4- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase: EC 3.2.1.8)와  $\beta$ -xylosidase (1,4- $\beta$ -D-xylan xylohydrolase: EC 3.2.1.37)로서 endoxylanase는 xylan을 xylooligosaccharides와 xylose로 가수분해하며  $\beta$ -xylosidase는 xylobiose와 짧은 xylooligosaccharides의 비환원 말단으로부터 xylose기를 유리시킨다[1,16]. 두 효소는 모두 xylan에 의해 유도되는 효소이며 glucose에 의해 catabolite repression을 받는다[1,18].

$\beta$ -Xylosidase는 xylan의 D-xylose로의 완전한 가수분해를 위해 필수적이며 최종산물에 의한 endoxylanase의 억제를 감소시키는데 기여하기 때문에 미생물의 xylan 분해계에서 중요한 효소이다[19]. 여러 종류의 미생물들로부터 다양한  $\beta$ -xylosidase가 분리되어 그 특성들이 보고되었다. 곰팡이 중에서는 *Aspergillus*, *Penicillium* 및 *Trichoderma* 속에 의해 생

산되는  $\beta$ -xylosidase가 많이 연구되었는데 이들 곰팡이 유래 효소들은 주로 여러 크기의 단일 단백질로 구성되어 있고, 최적 반응온도가 50-65 $^{\circ}$ C 범위에 있으며, 산성 pH 부근에서 최대 활성을 나타낸다[6,16,21]. 방선균인 *Streptomyces* 속 균주의  $\beta$ -xylosidase에 대한 연구도 많이 되어있다[3,5]. 박테리아에서는 *Bacillus*와 *Clostridium* 속 균주에서 생산되는  $\beta$ -xylosidase가 주로 연구되었는데, 곰팡이 유래의  $\beta$ -xylosidase에 비해 분자량, 최적 반응온도 및 반응 pH가 다양한 것으로 알려져 있다[12,17].

세포외로 분비되는 endoxylanase와는 달리  $\beta$ -xylosidase는 박테리아와 효모에서는 주로 세포내에 존재하며[5] 곰팡이에서는 배양액과 세포표면에서 발견된다[21]. 비록 여러 곰팡이와 박테리아로부터  $\beta$ -xylosidase가 분리되어 특성들이 조사되었지만 이들 효소의 생합성 조절기작에 관한 연구는 일부 곰팡이에서만 보고되어 있고[6] 박테리아로부터 생산되는  $\beta$ -xylosidase의 조절기작에 대해서는 알려진 게 거의 없다.

본 연구에서는 *Paenibacillus* sp. DG-22에서 생산되는  $\beta$ -xylosidase의 탄소원에 따른 생합성의 유도 및 억제에 관해 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 *Paenibacillus* sp. DG-22는 목재 저장소의 토양에서 분리된 호열성균으로 cellulase 활성이 없으며 세포외로 분비되는 내열성 xylanase와 세포내에 존재하는  $\beta$ -

\*Corresponding author

Tel : +82-54-770-2226, Fax : +82-54-770-2226

E-mail : yelee@mail.dongguk.ac.kr

xylosidase를 생산한다[8,9].

배지는 2x YT 배지 (1.6% trypton, 1.0% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0)를 기본배지로 하여 필요에 따라 탄소원으로 여러 가지 당을 1.0%되게 첨가하여 사용하였다. 배양은 45°C에서 18시간동안 150 rpm으로 진탕배양하였다.

#### 세포내 단백질의 추출

세포내 단백질을 분리하기 위하여 균주를 액체배지에서 대수기 말까지 배양한 뒤 원심분리로 세포를 모아 멸균된 생리식염수로 세척한 후 50 mM sodium acetate 완충액 (pH 5.5)에 현탁시켰다. 초음파분쇄기 (Sonifier 450, Branson ultrasonics, U.S.A.)를 이용하여 세포를 파괴한 뒤 원심분리하여 얻은 상등액을 세포내 조효소액으로 사용하였다.

#### 효소의 활성측정 및 단백질 정량

$\beta$ -Xylosidase의 활성은 *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (pNPX)를 기질로 이용하여 효소반응 후 유리되는 *p*-nitrophenol의 양을 측정하여 결정하였다. 1 mM pNPX, 50 mM sodium acetate (pH 5.5)와 희석된 조효소로 구성된 0.4 ml의 반응 혼합물을 60°C 수조에서 10분간 반응시킨 후 1 M sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 용액 0.8 ml를 첨가하여 효소반응을 중지시킨 뒤 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.  $\beta$ -Xylosidase의 활성은 1분 동안 1  $\mu$ mol의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit로 계산하였다.

단백질 함량은 Bio-Rad사 (Hercules, U.S.A)의 protein assay reagent를 사용하여 Bradford 방법[2]에 따라 결정하였고 표준물질로서는 bovine serum albumin (Sigma, St. Louis, U.S.A.)을 사용하였다.

#### 탄소원에 따른 균주의 성장과 효소생산

탄소원의 종류에 따른 효소 생산성을 알아보기 위해 기본배지인 2x YT 배지에 각 탄소원을 1% (w/v)가 되게 첨가하였다. 탄소원이 첨가되지 않은 2x YT 배지에서 하룻밤 자란 배양액을 각각의 배지에 1%되게 접종한 후 45°C에서 18시간 배양한 뒤 원심분리로 세포를 회수하여 세포내에 존재하는 효소의 활성을 측정하였다.

#### 배양시간에 따른 균주의 성장과 효소의 생산

균주의 성장과 효소 생산성과의 관계를 조사하기 위하여 부가 탄소원으로 methyl  $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\beta$ MeXyl)를 1.0% (w/v)되도록 첨가한 2x YT 배지 250 ml을 포함한 1-liter 플라스크에 미리 2x YT 배지에서 배양된 *Paenibacillus* sp. DG-22 배양액을 1%가 되도록 접종하여 45°C에서 진탕배양하면서 매 2시간마다 10 ml씩 배양액을 채취하여 균주의 성장과 효소 생산성을 조사하였다. 이때 균주의 생장은 분광광도계 (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech., Sweden)를 사용

하여 600 nm에서 탁도(OD<sub>600</sub>)로 측정하였고, 효소 생산성은 세포 추출물에 존재하는  $\beta$ -xylosidase의 활성을 측정하여 결정하였다.

#### 전기영동 및 활성염색 (zymogram)

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)는 12% gel을 사용하여 Laemmli의 방법[7]에 따라 수행하였으며 단백질 염색은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 하였다.  $\beta$ -Xylosidase의 활성염색은 Rothe의 방법[15]을 변형하여 수행하였다. 즉, 전기영동 후 gel을 50 mM sodium acetate (pH 5.5) 완충액으로 30분간 2회 세척한 뒤 gel 위에 형광기질인 1 mM 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\beta$ MUX)와 50 mM sodium acetate (pH 5.5)가 포함된 0.8% agarose gel을 올려놓고 60°C에서 20분간 반응시킨 후 자외선 램프 하에서 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

#### 효소 생산에 미치는 탄소원의 영향

미생물이 생산하는 다당류 분해효소는 배지에 존재하는 탄소원의 종류에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많다.  $\beta$ -Xylosidase의 생산에 각종 탄소원이 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 기본배지에 각종 탄소원을 1.0% (w/v)가 되도록 각각 첨가한 후 45°C에서 18시간 진탕배양하여 세포내에 존재하는  $\beta$ -xylosidase의 활성을 조사하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 *Paenibacillus* sp. DG-22로부터 생산되는  $\beta$ -xylosidase는 cellobiose,  $\beta$ MeXyl 및 xylan에 의해서 생산이 증가되었으며, arabinose, galactose, glucose 및 mannose와 같은 단당류에 의해서는 생산이 조금 억제되었다. 탄소원이 첨가되지 않은 기본배지에서도 적은 양의  $\beta$ -xylosidase 활성이 측정되었다. Xylan의 경우 oat spelts xylan이 birchwood xylan 과 beechwood xylan보다 유도효과가 좋았는데 이는 xylan의 구조적 차이에 의한 것으로 보인다. Oat spelts xylan은 beechwood와 birchwood xylan에 비해 xylose 함량이 적다[10]. 합성 글리코사이드 (glycoside)인  $\beta$ MeXyl가  $\beta$ -xylosidase의 생산에 가장 효과적인 유도기질로 작용하였는데 이것은 부가 탄소원이 첨가되지 않은 기본배지에 비해 약 116배의 높은 유도효과를 나타내었다. Xylan들도 12-20배 정도의 유도효과를 나타내었다. 한편 glucose 등과 같은 단당류를 부가 탄소원으로 첨가하였을 경우에는 효소의 활성이 다소 억제되었으나 이들의 억제 효과는 최대 40% 이하로 비교적 낮았다(Table 1). 이상의 결과로 *Paenibacillus* sp. DG-22로부터 생산되는  $\beta$ -xylosidase는  $\beta$ MeXyl이나 xylan과 같은 유도기질이 존재할 때 강하게 유도되는 효소이며, 이 효소의 생합성은 glucose와 같이 쉽게 대사될 수 있는 탄소원이 존재할 때 감소함을 알 수 있었다. Xylobiose의 유사체인  $\beta$ MeXyl은 여

Table 1. Effect of carbon sources on the production of  $\beta$ -xylosidase by *Paenibacillus* sp. DG-22

Carbon source (1%, w/v)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)
None	1.55±0.07	4.40±0.01	2.81±0.17
Arabinose	2.86±0.26	5.07±0.10	1.78±0.14
Cellulose	1.31±0.14	18.81±0.62	14.43±1.09
Fructose	1.59±0.16	4.13±0.18	2.60±0.16
Galactose	1.43±0.15	2.53±0.04	1.79±0.21
Glucose	2.88±0.23	3.82±0.18	1.66±0.03
Glycerol	1.12±0.16	4.66±0.11	2.89±0.22
Lactose	1.83±0.38	4.60±0.13	2.58±0.44
Maltose	2.21±0.22	4.33±0.09	1.97±0.15
Mannose	2.25±0.24	3.95±0.12	1.77±0.15
$\beta$ MeXyl	1.43±0.15	466.92±18.62	327.58±21.09
Starch	2.61±0.15	5.17±0.07	1.98±0.10
Sucrose	2.63±0.04	5.76±0.02	2.19±0.03
Xylan	2.27±0.21		
beechwood	1.91±0.18	79.42±4.14	35.03±1.47
birchwood	1.35±0.11	68.05±2.23	35.71±1.47
oat spelts	2.73±0.08	76.21±2.05	56.69±3.28
Xylose		6.74±0.12	2.47±0.04

Data are the mean  $\pm$ S.D. of three different cultures grown at 45°C for 18 hr.

러 곰팡이들에서는 xylanase와  $\beta$ -xylosidase의 무상유도물질 (gratuitous inducer)로 보고된바 있으나[4,18] 박테리아에서는 아직 그 유도효과가 관찰된바 없다. 본 연구에 사용된 *Paenibacillus* sp. DG-22에서 생산되는  $\beta$ -xylosidase는  $\beta$  MeXyl에 의해 강하게 유도되는 것으로 보아 기존에 보고된 다른 박테리아들의  $\beta$ -xylosidase와는 그 생합성 특성에 있어서 차이가 있는 것으로 보인다.

**$\beta$ MeXyl의 농도에 따른 효소 생산성**

부가 탄소원들 중 효소 생산성에 대한 유도효과가 가장 큰 것으로 확인된  $\beta$ MeXyl의 농도에 따른 *Paenibacillus* sp. DG-22의  $\beta$ -xylosidase 생산성을 조사하기 위해서 기본배지인 2x YT에  $\beta$ MeXyl를 농도별로 각각 첨가하여 배양한 후 세포내의 효소 활성을 측정하였다. 그 결과 10 mg/ml의  $\beta$  MeXyl 농도에서 효소 생산성이 최대에 이르는 것으로 나타났다(Fig. 1).  $\beta$ MeXyl의 농도가 10 mg/ml 이상일 때는 오히려 효소활성이 감소하였는데 이는  $\beta$ MeXyl의 농도가 증가함에 따라 분해산물인 xylose의 농도가 함께 증가하여 효소생산을 억제하기 때문이라 생각된다.

**균주의 성장과 효소 생산성**

*Paenibacillus* sp. DG-22의 성장에 따른  $\beta$ -xylosidase의 생산성을 조사하기 위하여 효소 생산성에 가장 높은 유도효과를 나타내는 것으로 확인된 1.0% (w/v)  $\beta$ MeXyl가 첨가된 2x YT

배지에서 배양하면서 시간별로 균주의 성장과 효소 생산성을 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 *Paenibacillus* sp. DG-22의 성장은 24시간에 정지기에 달하였고  $\beta$ -xylosidase의 생합성은 균주의 성장과 함께 증가하여 16시간에 이르러 최고에 달하였으며 4시간 동안 일정한 수준을 유지하다가 생장이 정체기에 이르면서 점차 감소하였다. 이는 아마도 유도물질인  $\beta$ MeXyl가 분해되어 생긴 xylose가 효소활성을 억제하거나 protease에 의해 효소가 분해되기 때문이라 생각된다. 따라서 효율적인  $\beta$ -xylosidase의 생산을 위해서는 균주의 생장이 정체기에 이르기 전까지만 배양하여 효소의 생산성이 최고에 이르렀을 때 세포를 회수하여 정제하는 것이 바람직하다.

**Glucose와 xylose에 의한 억제**

일반적으로 미생물 유래의  $\beta$ -xylosidase 생합성은 xylan에 의해서 유도되고 glucose에 의해 catabolite repression을 받는 것은 공통된 현상이지만[1] xylose에 의한 영향은 균주마다 다른 양상을 나타낸다. *Bacillus subtilis*[11]와 *Butyrivibrio fibrisolvens*[20]는 xylose에 의해  $\beta$ -xylosidase 생산성이 유도

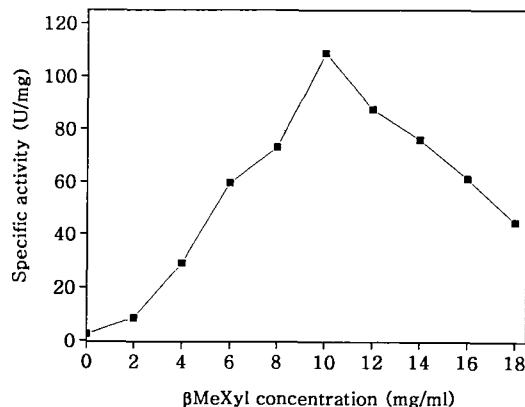


Fig. 1. Effect of methyl  $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\beta$ MeXyl) concentration on the production of  $\beta$ -xylosidase.

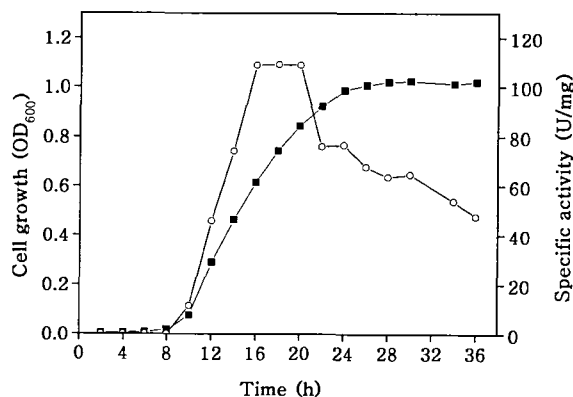


Fig. 2. Production of  $\beta$ -xylosidase during growth of *Paenibacillus* sp. DG-22 on 2x YT medium supplemented with 1% (w/v)  $\beta$ MeXyl (■, growth; ○,  $\beta$ -xylosidase activity).

되며, *Cellulomonas flavigena*[13]와 *C. uda*[14]는 xylose에 의해 효소생산이 억제된다고 보고되어 있다. 이전의 연구에서 *Paenibacillus* sp. DG-22의 xylanase 생산은 glucose에 의해 catabolite repression을 받는 것으로 조사되었다[8].  $\beta$ -Xylosidase의 생합성에 미치는 glucose와 xylose의 영향을 알아보기 위하여 oat spelts xylan과  $\beta$ MeXyl가 각각 1% (w/v) 포함된 배지에 glucose나 xylose를 1% (w/v)되게 첨가하여 배양한 뒤 효소의 생산성을 측정하였다(Table 2). Xylan에 glucose나 xylose를 첨가하였을 때  $\beta$ -xylosidase의 생산성이 급격히 감소하는 것으로 보아 본 균주는 glucose나 xylose에 의한 catabolite repression을 받는 것으로 나타났다.  $\beta$ MeXyl에 glucose나 xylose가 함께 존재할 경우에는 12-20%의 억제효과만 나타났다. 이는  $\beta$ MeXyl에 의한 유도효과가 워낙 높아서 glucose나 xylose에 의한 억제효과가 상대적으로 적게 나타났기 때문이라 사료된다. Glucose에 의해 생합성이 완전히 정지되는 xylanase와는 달리[8]  $\beta$ -xylosidase 생산성은 glucose에 의한 영향을 적게 받는 것으로 보아(Table 1) *Paenibacillus* sp. DG-22에서 생산되는  $\beta$ -xylosidase는 xylanase와는 다른 조절 기작을 받는 것으로 보인다.

**전기영동 및 활성염색 (zymogram)**

*Paenibacillus* sp. DG-22가 생산하는  $\beta$ -xylosidase에 대한  $\beta$ MeXyl의 유도효과 및 대략적인 분자량을 알아보기 위해 2x YT와 1.0%  $\beta$ MeXyl가 첨가된 2x YT 배지에서 각각 균주를 배양하였다. 배양된 세포로부터 추출된 조효소액을 SDS-PAGE한 후 형광기질인  $\beta$ MUX를 이용한 활성염색 (zymogram)을 실시하였다. 그 결과 80 kDa 크기의 단백질에서 활성이 나타났으며 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색된 gel에서도 동일한 크기의 band가  $\beta$ MeXyl로 유도된 세포에서 추출된 단백질에서 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 *Paenibacillus* sp. DG-22에서 생산되는  $\beta$ -xylosidase는  $\beta$ MeXyl에 의해 유도되며 분자량이 80 kDa인 단백질이거나 동일한 80 kDa의 여러 소단위로 구성된 단백질일 것으로 사료된다. 또한 활성염색에서 단 하나의 활성 band만 나타난 것으로

Table 2. Effects of glucose and xylose on  $\beta$ -xylosidase production by *Paenibacillus* sp. DG-22

Substrate (1%, w/v)	Protein (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)
None	0.70	5.26	7.57
$\beta$ MeXyl	0.74	391.04	531.26
$\beta$ MeXyl+Glucose	0.75	327.53	439.05
$\beta$ MeXyl+Xylose	0.74	344.38	466.57
Oat spelts xylan	0.76	41.66	54.88
Oat spelts xylan+Glucose	0.15	5.56	7.55
Oat spelts xylan+Xylose	0.74	5.97	8.08

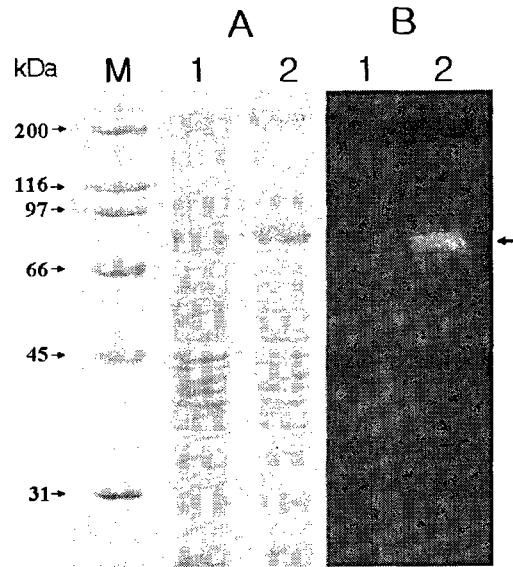


Fig. 3. SDS-PAGE (A) and zymogram (B) analysis of  $\beta$ -xylosidase activity in the cell extract of *Paenibacillus* sp. DG-22 grown on 2x YT and 2x YT+1%  $\beta$ MeXyl. Lane M, molecular mass markers; lane 1, cell extracts from 2x YT; lane 2, cell extracts from 2x YT+1%  $\beta$ MeXyl. Arrow indicates the  $\beta$ -xylosidase activity.

보아 *Paenibacillus* sp. DG-22에서는 단 한 종류의  $\beta$ -xylosidase만이 생산되는 것으로 보인다.

**요 약**

효소생산을 최적화하기 위해서 *Paenibacillus* sp. DG-22에서의  $\beta$ -xylosidase 생합성 조절을 연구하였다. *Paenibacillus* sp. DG-22의  $\beta$ -xylosidase는 배양액에 존재하는 탄소원에 의해 조절되는 것으로 관찰되었다.  $\beta$ -Xylosidase의 합성은 xylan과 methyl  $\beta$ -D-xylopyranoside ( $\beta$ MeXyl)에 의해 유도되었으나 쉽게 대사되는 단당류에 의해서는 약간 억제되었다.  $\beta$ MeXyl가  $\beta$ -xylosidase의 유도를 위한 최적의 기질임을 확인하였고 가장 효과적인 유도는 10 mg/ml의 농도에서 얻어졌다.  $\beta$ -Xylosidase의 생산은 세포의 생장과 연관된 양상을 나타내었으며, 대수기 말에 최대량이 형성되었다. Glucose와 xylose가 존재하면  $\beta$ -xylosidase의 활성 수준이 감소하는 것으로 보아 이 효소의 생합성은 catabolite repression을 받는 것으로 보인다. SDS-PAGE와 활성염색 기술을 이용하여  $\beta$ MeXyl가 이 효소의 생합성을 유도하며 약 80 kDa 크기의 하나의  $\beta$ -xylosidase가 존재함을 알 수 있었다.

**감사의 글**

본 연구는 동국대학교 논문게재장려금 지원으로 이루어 졌음.

## 참 고 문 헌

1. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**, 286-290.
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. Flores, M. E., M. Prea, O. Rodriguez, A. Malváez and C. Hultrón. 1996. Physiological studies on induction and catabolite repression of  $\beta$ -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* CH-M-1035. *J. Biotechnol.* **49**, 179-187.
4. Ghosh, M. and G. Nanda. 1994. Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG 49. *FEMS Microbiol. Lett.* **117**, 151-156.
5. Godden, B., T. Legon, P. Helvenstein and M. Penninckx. 1989. Regulation of the production of hemicellulolytic and cellulolytic enzymes by a *Streptomyces* sp. growing on lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 285-292.
6. Kristufek, D., S. Zeilinger and C. P. Kubicek. 1995. Regulation of  $\beta$ -xylosidase formation by xylose in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 713-717.
7. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685.
8. Lee, Y. E. 2003. Optimization of xylanase production from *Paenibacillus* sp. DG-22. *Kor. J. Life Sci.* **13**, 618-625.
9. Lee, Y. E. 2004. Isolation and characterization of thermostable xylanase-producing *Paenibacillus* sp. DG-22. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 22-28.
10. Li, K., P. Azadi, R. Collins, J. Tolan, J. S. Kim and K.-E. L. Eriksson. 2000. Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enz. Microb. Technol.* **27**, 89-94.
11. Lindner, C., J. Stulke and M. Hecker. 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **140**, 753-757.
12. Nanmori, T., T. Watanabe, R. Shinke, A. Kohno and Y. Kawamura. 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and  $\beta$ -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J. Bacteriol.* **172**, 6669-6672.
13. Pérez-Avalos, O., T. Ponce-Noyola, I. Magaña-Plaza and M. I. Torre. 1996. Induction of xylanase and  $\beta$ -xylosidase in *Cellulomonas flavigena* growing on different carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 405-409.
14. Rapp, P. and F. Wagner. 1986. Production and properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 746-752.
15. Rothe, G. M. 1994. Electrophoresis of enzymes: laboratory methods. Springer-Verlag, Berlin.
16. Saha, B. C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279-291.
17. Saxena, S., H. P. Fierobe, C. Gaudin, F. Guerlesquin and J. P. Belaich. 1995. Biochemical properties of a  $\beta$ -xylosidase from *Clostridium cellulolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3509-3512.
18. Simão, R. C., C. G. Souza and R. M. Peralta. 1997. Induction of xylanase in *Aspergillus tamarii* by methyl  $\beta$ -D-xyloside. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 267-271.
19. Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 39-67.
20. Williams, A. G. and S. E. Withers. 1992. The regulation of xylanolytic enzyme formation by *Butyrivibrio fibrisolvens* NCFB 2249. *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 194-198.
21. Wong, K. K. Y. and J. N. Saddler. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **12**, 413-435.