

## 내열성 Cellulase-free Xylanase를 생산하는 고온성 *Bacillus* sp.의 분리 및 효소 특성

김대준<sup>1</sup> · 신한재 · 민본홍<sup>1</sup> · 윤기홍\*

한국과학기술연구원 생명공학연구소, <sup>1</sup>건국대학교 생화학과

### Isolation of a Thermophilic *Bacillus* sp. Producing the Thermostable Cellulase-free Xylanase, and Properties of the Enzyme

Dae-Joon Kim<sup>1</sup>, Han-Jae Shin, Bon-Hong Min<sup>1</sup> and Ki-Hong Yoon\*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusung 305-600

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Kon-Kuk University, Choongju-City, 380-701 Korea

**Abstract** — A thermophilic bacterium producing the extracellular cellulase-free xylanase was isolated from soil and has been identified as *Bacillus* sp. The optimal growth temperature was 50°C and the optimal pH, 7.0. Under the optimal growth condition, maximal xylanase production was 2.2 units/ml in the flask culture. The enzyme production was induced by xylan and xylose, but was repressed by sucrose or trehalose. The partially purified xylanase was most active at 70°C. It was found that the enzyme was stable at 65°C for 10 hours with over 75% of the activity. The enzyme was most active at pH 7.0 and retained 90% of its maximum activity between pH 5.0 and pH 9.0 though *Bacillus* sp. was not grown on alkaline conditions (>pH 8.0). In addition, the activity of xylanase was over 60% at pH 10.0. At the ambient temperature, the enzyme was stable over a pH range of 5.0 to 9.0 for 10 h, indicating that the enzyme is thermostable and alkalotolerant. The activity of xylanase was completely inhibited by metal ions including Hg<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup>, while EDTA, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), β-mercaptoethanol and SDS didn't affect its activity. The enzyme was also identified to exert no activity on carboxymethylcellulose, laminarin, galactomannan, and soluble starch.

대부분의 육지식물은 cellulose, hemicellulose와 lignin으로 이루어져 있는데 이들 중 hemicellulose의 주요 구성 성분으로 알려져 있는 xylan은 기본골격이 β-1,4 결합을 하고 있는 D-xylose로 구성되어 있고 이러한 xylose 잔기에 acetyl group, L-arabinofuranose와 D-glucuronopyranose 등이 측쇄로 연결되어 존재하고 있다(1, 2). 그러므로 xylan의 분해에는 xylanase(endo-1,4-β-xylanase), β-xylosidase, α-glucuronidase, α-L-arabinofuranosidase와 acetylerase 등이 공동으로 관여하며(3-6) 이 중에서 xylanase는 xylan의 기본골격을 분해하여 xylooligosaccharides로 변환시키므로 xylan의 가수분해 과정에서 가장 중요한 역할을 한다. Xylanase는 수용성 xylan과 함께 cellulose에 결합된 불용성 xylan도 분해할 수 있으므로 pulp에 잔존하는 xylan과 이와 결합된 lignin을 제거

하는데 이용될 수 있다. 제지공업에서 chlorine을 사용하는 제지원료의 표백공정에서 독성이 높은 chlorinated compounds가 다량 방출되는데 최근 들어 이러한 화학물질을 사용하는 표백공정에 xylanase를 응용하려는 bio-bleaching(7)에 대해 관심이 높아지고 있다.

여러종류의 세균과 곰팡이들로부터 생산되는 xylanase는 대개가 중성 또는 산성조건하에서 그 활성이 높으며 약 45°C 정도가 최적 반응온도이다. 그러나 제지의 표백공정이 고온과 알칼리 조건에서 이루어지고 있다는 점에서 제지산업의 bio-bleaching 공정에 응용하기 위해서는 내열성이며 내알칼리성인 xylanase가 요구되어지고 있는데 *Bacillus* 속 세균을 중심으로 이러한 특성을 지니는 효소의 생산균이 다수 분리되었다(8-11).

Nakamura 등(12)에 의해 토양으로부터 분리된 호염기성 *Bacillus* sp. 45M-1이 생산하는 xylanase J는 pH 9.0과 50°C에서 최적 활성을 나타냄과 동시에 대

**Key words:** Thermophilic *bacillus*, cellulase-free xylanase, xylanase activity

\*Corresponding author

부분의 xylanase가 carboxymethyl cellulase(CM-Case) 활성도 지니고 있는 것과는 달리 carboxymethylcellulose(CMC)를 분해하지 않는 것으로 밝혀졌다. 이러한 특성은 제지의 기본구조 물질인 cellulose를 파괴하지 않고 불용성 xylan과 lignin을 선택적으로 제거하는데 이용될 수 있다. 또한 *Bacillus stearothermophilus* T-6는 pH 6.5와 65°C에서 최대 활성을 보이는 xylanase T-6를 생산하는 것으로 알려졌는데 이 효소는 65°C에서 10시간 이상 효소 활성이 안정하게 유지되고 CMC에 대해서는 미미한 활성을 갖는 것으로 알려졌다(13). *Bacillus*가 생산하는 xylanases 외에도 *Neocallimastix frontalis*(14), *Dictyoglomus species*(15), *Trichoderma reesei* RUT C-30(16), *Clostridium thermohydrosulfuricum*(17), *Thermomyces lanuginosus*(18)와 *Thermoascus aurantiacus* 등(19)이 생산하는 내열성 또는 내알칼리성 xylanases가 보고되어졌다.

본 연구에서는 토양으로부터 cellulase는 분비하지 않으면서 xylanase를 분비하는 고온성 *Bacillus* sp.를 분리하여 형태학적·생화학적 특성과 효소의 생산에 미치는 배양조건 및 xylanase 효소 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 내열성 cellulase-free xylanase 생산균의 분리 및 동정

내열성 xylanase를 생산하는 고온성 미생물 분리를 위해 토양 시료 1g을 0.85% NaCl 용액 10 ml에 현탁하고 현탁액의 적당량을 취하여 xylan(0.5%)를 첨가한 복합한천 배지(yeast extract, 5g; bacto-tryptone, 5g; polypeptone, 5g; beef extract, 5g; NaCl, 2g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2g; water, 1l; pH 7.0)에 도달한 후 55°C에서 배양하였다. Colony가 형성된 후 그 주위의 xylan이 분해되어 투명한 환이 나타난 균들을 다시 CMC(0.5%)를 첨가한 복합한천 배지로 옮겨 배양한 후 Congo red를 사용하여 cellulase의 생성 여부를 조사함으로써 cellulase 활성이 없는 xylanase를 생산하는 균을 선별하였다.

선별균주의 동정은 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사함으로써 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(20)에 따라서 실시하였다.

### Xylanase 활성 측정

Xylanase 활성은 xylan을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)

방법(21)으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0%(W/V) oat spelts xylan 용액 0.5 ml와 100 mM Na-phosphate 완충용액(pH 7.0) 0.4 ml를 혼합하고 65°C에 1분간 방치함으로써 반응용액의 온도를 맞춘 후 효소 용액을 0.1 ml를 첨가하여 65°C에서 20분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 xylose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 xylan으로부터 1 μmol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 효소 활성에 미치는 반응조건 분석

Xylanase의 효소 활성과 반응에 미치는 온도, pH 및 금속이온의 영향을 조사하기 위해 분리균이 생산하는 조효소액을 공극의 크기가 10,000인 membrane을 사용하여 ultrafiltration 시킴으로써 membrane을 통과하지 못한 농축된 조효소액을 얻어 원심분리한 후 DEAE-Sephadex A-50 column을 사용하여 부분 정제된 효소를 반응에 사용하였다.

최적 반응온도를 조사하기 위해 효소만을 제외한 반응혼합물(970 μl)을 분석하고자 하는 온도로 말춘 후 소량의 효소(30 μl)를 첨가하여 각각의 온도에서 반응을 시켜 그 활성을 측정하였다. 최적 반응 pH를 분석하기 위해서 반응온도는 동일하게 하였고 반응에 사용하는 완충용액의 pH를 달리하였으며 효소액도 각각의 완충용액으로 투석한 후 반응에 사용하여 그 활성을 비교하였다. 온도와 pH가 효소 안정성에 미치는 영향을 분석하기 위해서 효소액을 조사하고자 하는 온도와 pH에서 각각 일정시간 방치한 후 위에서 서술한 효소활성 측정 조건(65°C, pH 7.0)에서 반응을 수행하여 효소 활성 정도를 조사하였다. 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위해 효소액에 금속이온을 1 mM이 되도록 첨가하여 실온에서 1시간 방치한 후 잔류하는 효소 활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 내열성 cellulase-free xylanase 생산균의 분리 및 동정

CMC를 함유한 배지와 xylan을 함유한 배지를 사용하여 토양으로부터 cellulase 활성이 없는 xylanase를 생산하는 고온성 미생물을 탐색하여 xylanase

**Table 1. Morphological and biochemical properties of *Bacillus* sp.**

Characteristics	
Gram staining	+
Motility	+
Cell form	Rod
Spore	+
Growth in air	+
Gas from glucose	-
Catalase	+
Oxidase	+
OF test	-
VP test	-
Growth at 45°C	-
65°C	+
pH 5.7	+
Temp. optim.	50~65°C
Citrate utilization	-
Hydrolysis of starch	-
gelatin	-
casein	+
Urease	-
Nitrate reduction	+
Indole formation	-
Acid production from;	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannitol	+
Xylose	+
Mannose	+
Cellobiose	-
Starch	-
Maltose	+
Raffinose	+
Sorbitol	-
Lactose	-
Sucrose	+
Trehalose	+
Galactose	-
Salicin	-

+, Positive; -, Negative

활성이 높은 균을 최종적으로 분리하였다. 분리 균주는 호기성균이며 그람 양성균으로 밝혀졌고 위상차 현미경을 통하여 관찰한 결과 세포의 형태는 막대 모양으로 세포내 포자를 형성하였다. 생리와 생화학적 특성을 조사한 결과 Table 1에서 나타낸 것과 같이 *Bacillus* 속에 속하는 균으로 판별되었으며 이를 *Bacillus* sp. KK-1로 명명하였다.

**Table 2. Growth and xylanase production of *Bacillus* sp. at different temperatures and pHs of medium**

Conditions	Cell growth <sup>a</sup> (OD <sub>600</sub> )	Xylanase production <sup>b</sup> (U/ml)
Growth temperature		
Temperature 50°C	4.0	2.2
Temperature 55°C	2.9	1.4
Temperature 65°C	2.5	0.9
Initial pH of medium		
pH 6.0	4.0	2.0
pH 7.0	4.0	2.2
pH 8.0	3.6	1.8

<sup>a</sup>Values represent the maximum growth of *Bacillus* isolate.

<sup>b</sup>The supernatant of *Bacillus* sp. culture grown in flask was used to assay the activity of xylanase

#### 배양조건에 따른 균주의 성장과 효소의 생산

*Bacillus* sp. KK-1의 생육과 효소의 생산성에 미치는 온도와 초기 pH의 영향을 알아보기 위하여 여러 온도와 pH에서 균의 생육과 효소의 생성 정도를 조사하였다(Table 2). 균주 KK-1은 45°C 이하에서는 전혀 자라지 못하고 50°C와 65°C 사이에서 성장하였으며 50°C에서 배양하였을 때 성장률이 가장 높고 효소 생산성도 가장 높은 것으로 나타났다. 그리고 배지의 초기 pH가 6.0에서 8.0 사이의 중성 조건에서 성장하였는데 초기 pH 7.0에서 성장률과 효소의 생산성이 가장 높은 것으로 나타났다. 그리하여 50°C와 pH 7.0의 성장조건에서 배양할 때 strain KK-1에 의한 효소의 최대 생산량은 2.2 unit/ml이었다.

배양시간에 따른 미생물의 생육과 효소의 생산량을 분석한 결과 xylanase의 생산성이 *Bacillus* sp.의 성장과 일치하여 증가됨을 보이고 생육이 정지기에 이르면 효소의 생산량도 거의 증가되지 않는 것으로 나타났다.

#### 탄소원에 따른 분리균의 성장과 효소생산

탄소원이 *Bacillus* sp. KK-1의 xylanase 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 따로 여과 멸균한 여러종류의 탄수화물을 1.0%(W/V) 첨가한 배지를 사용하여 50°C에서 25시간 동안 배양하여 균의 생육과 세포외로 분비된 xylanase의 생성 정도를 조사하였다(Table 3). Glucose, maltose, mannose 등이 첨가된 배지에서는 균의 성장이 급격하게 저해됨과 동시에 xylanase가 거의 생성되지 못했다. Trehalose나 sucrose가 배지에 첨가되었을 때는 균의 성장은 크게

**Table 3. Effects of carbon sources on the xylanase production**

Additional carbohydrates <sup>a</sup> (1%)	Growth (OD <sub>600</sub> )	Xylanase activity <sup>b</sup> (U/ml)
No	4.0	1.50
CMC	4.0	1.90
Birchwood xylan	ND	2.90
Oat spelt xylan	ND	2.80
Maltose	1.2	0.16
Trehalose	3.1	0.12
Glucose	1.3	0.01
Sucrose	2.6	0.03
Xylose	3.8	2.10
Lactose	4.1	1.67
Galactose	4.4	2.08
Mannose	1.2	0.09

ND: not determined

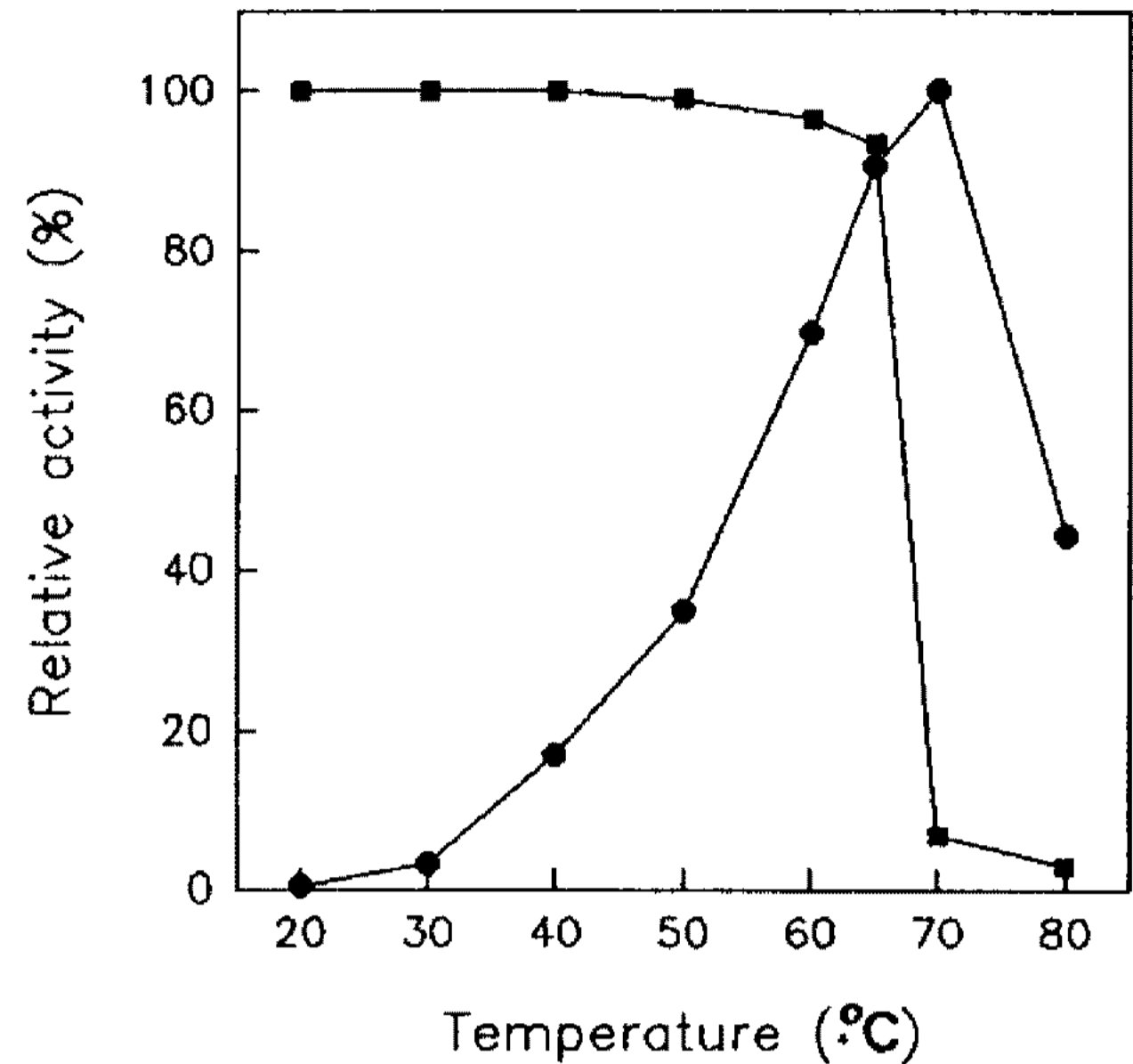
<sup>a</sup>Besides the CMC and xylan, additional carbohydrates were separately sterilized by filtration.

<sup>b</sup>The activities are for supernatants of 100 ml *Bacillus* cultures grown for 25 hr at 50°C.

저해되지 않았으나 효소는 극히 소량만이 생성되었고 lactose나 galactose를 첨가한 배지에서는 균의 생장이 증가하였으며 성장증가 정도에 해당하는 만큼 효소의 생산성도 증가되어짐이 밝혀져 trehalose나 sucrose가 xylanase 생성을 억제하는 것으로 판단된다. Xylan을 포함하는 배지에서는 효소 생산성이 증가되었는데 이러한 현상은 다른 미생물 경우에도 다수 보고되었는데 oat spelt xylan을 사용하였을 때보다 birchwood xylan을 사용하였을 때 효소 생산량 증가 정도가 더 큰 것으로 나타났다. 한편 strain KK-1의 xylanase에 의해 분해되지 않는 CMC를 배지에 첨가하였을 때 효소의 생산량이 증가하였다. 특히, 여러 미생물에서 xylanase의 생산성을 저해하는 것으로 보고된(9, 22) xylose를 배지에 첨가하였을 때 균의 생육에서는 변화가 없으나 xylanase의 생산성이 증가되었는데 이러한 현상은 고온성 *Bacillus strain* ITI 36에서도 관찰되어진 바 있다(23). 그러나 strain ITI 36은 xylose나 xylan을 포함하는 배지에서는 xylanase의 생성이 크게 증가되었지만 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서는 xylanase가 거의 생성되지 않는 것으로 밝혀져 있다. 그러나 KK-1은 탄소원을 첨가하지 않은 배지에서도 상당량의 xylanase가 생성되었다.

#### Xylanase 활성에 미치는 온도의 영향

Xylanase 반응의 최적 온도를 구하기 위해 여러온

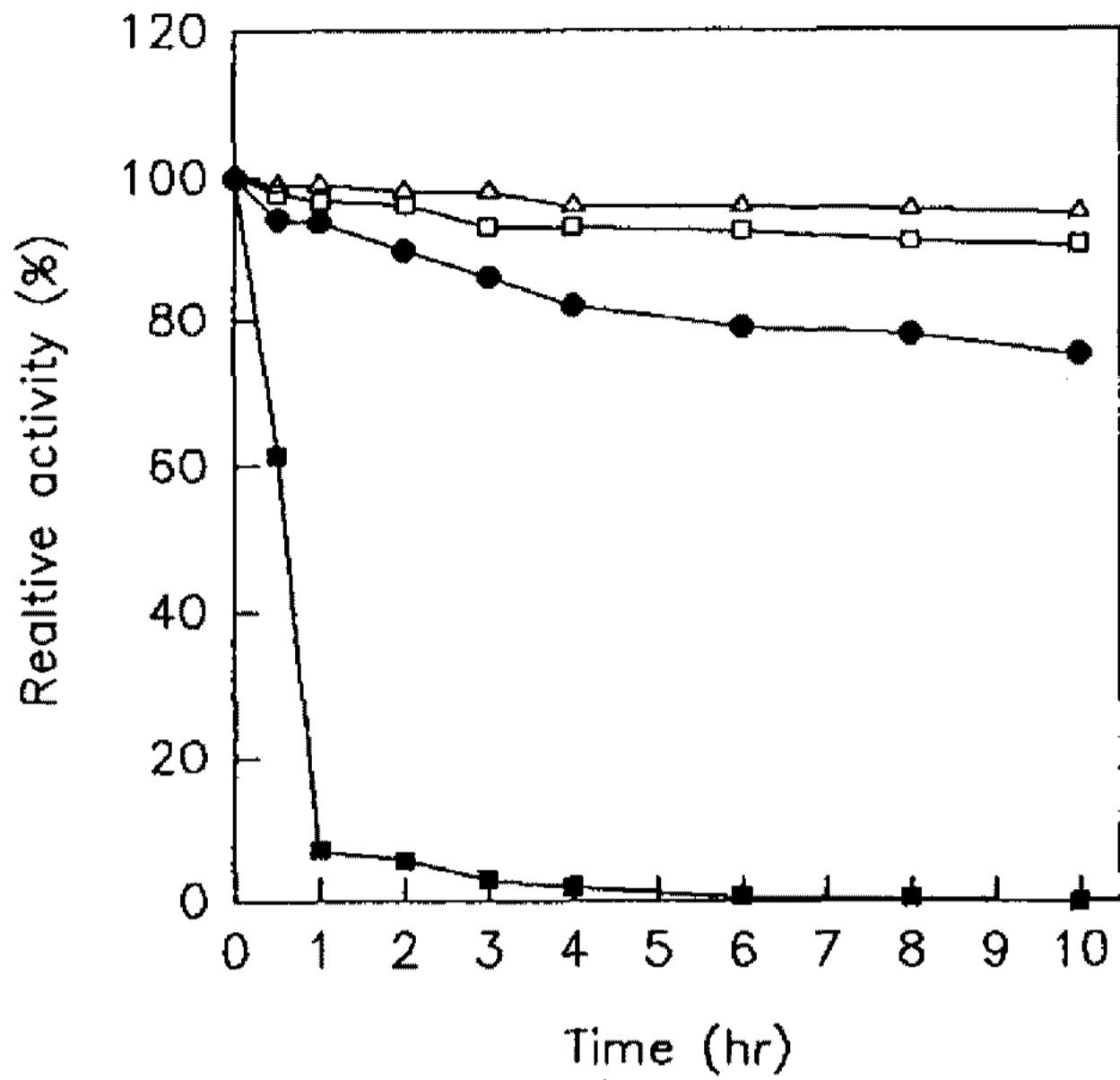


**Fig. 1. Effect of temperature on the xylanase activity.** The reaction was done at pH 7.0. Temperature profile (—●—) was obtained by measuring the activities of xylanase at different temperatures, and thermal stability (—■—) was determined by the residual activities of xylanase pre-incubated for 1 h at different temperatures.

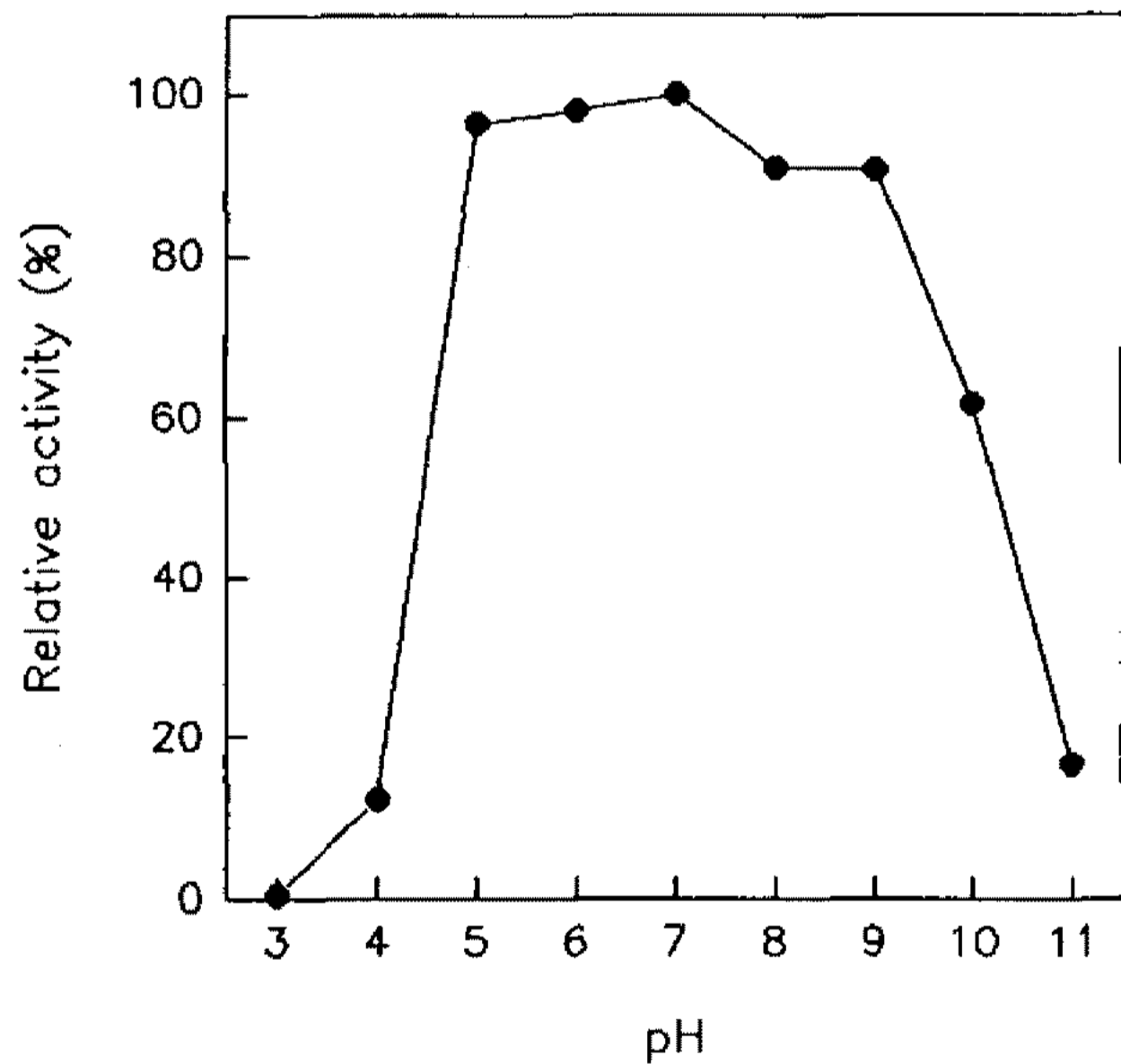
도에서 효소 반응을 실시한 후 효소 활성을 측정하는 결과 Fig. 1에서 나타낸 것과 같이 xylanase 효소 반응의 최적 온도는 70°C이며 80°C에서는 최고 활성의 40% 정도에 해당하는 활성을 나타내었으나 50°C 이하에서는 35% 이하의 활성을 보였다. Xylanase의 열 안정성을 조사하기 위해 효소액을 각 온도에서 1시간 방치한 후 남아있는 효소의 활성을 측정하는 결과 65°C 이하에서 효소 활성은 안정하게 유지되었으나 70°C에서 급격하게 효소 안정성이 감소하였다(Fig. 1). 시간에 따른 효소의 열 안정성을 조사한 결과 xylanase는 최적 활성 온도인 70°C에서는 반감기가 30분 밖에 되지 않았으나 65°C에서는 10시간 이후에도 75%의 활성을 유지하는 열 안정성을 나타내었으며 55°C 이하에서는 10시간 이후에도 90% 이상의 활성이 유지되고 있었다(Fig. 2).

#### Xylanase 활성에 미치는 pH의 영향

Xylanase 반응에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 pH 3.0~11.0 범위에서 반응시킨 효소 활성을 측정하는 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 7.0에서 최대의 효소 활성을 나타내었으며 pH 5.0과 9.0 사이에서 최대 활성의 90% 이상의 활성을 보여 넓은 범위의 pH에 걸쳐 높은 활성을 나타내었다. 특히 *Bacillus* sp.가 pH 9.0 이상에서 전혀 성장하지 않았지만



**Fig. 2. Thermostability of the xylanase.**  
The residual activity was measured at various times after incubation at 45°C (-△-), 55°C (-□-), 65°C (-●-) and 70°C (-■-) with a fixed pH (7.0).



**Fig. 3. Effect of pH on the xylanase activity.**  
The reaction was done at 65°C. The following buffer systems were used: pH 3.0 to 6.5, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate; pH 8.0 to 9.0, 50 mM Tris·HCl; pH 9.0 to 11.0, 50 mM glycine-NaOH.

xylanase는 pH 9.0에서는 물론 pH 10.0에서도 60% 이상의 활성을 지니고 있는 것으로 보아 이 효소는 내알칼리성 효소로 판단된다. 그러나 pH 4.0에서는 급격하게 효소 활성이 감소하였다. 또한 시간에 따른 pH에 대한 효소 안정성을 조사한 결과, pH 5.0, 7.0, 9.0에서 모두 8시간 이상까지 방치하여도 효소 활성

**Table 4. Effects of metal ions on the xylanase activity**

Chemicals	Relative activity (%)
None	100
CaCl <sub>2</sub>	50
NaCl	114
ZnCl <sub>2</sub>	90
AlCl <sub>3</sub>	121
MnCl <sub>2</sub>	20
CuSO <sub>4</sub>	25
HgCl <sub>2</sub>	0
BaCl <sub>2</sub>	106
KCl	112
MgCl <sub>2</sub>	104
FeSO <sub>4</sub>	0
NiSO <sub>4</sub>	26
EDTA	110
SDS	92
β-mercaptoethanol	110
PMSF	107

**Table 5. Substrate specificity of xylanase**

Substrate	Relative activity (%)
Oat spelt xylan	100
Birchwood xylan	76
CMC	0
Laminarin	0
Galactomannan	0
Soluble starch	0

에 영향이 없는 것으로 나타났다(data not shown).

**효소 활성에 미치는 금속이온과 화학물질의 영향**  
금속이온과 chemical이 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 4에 나타난 것과 같이 xylanase는 K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup> 등에 의해서는 영향을 받지 않았으나 Ca<sup>2+</sup>에 의해서 50% 정도의 활성이 저해되었고, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> 등에 의해서 80% 정도의 활성이 저해되었고 Hg<sup>2+</sup>와 Fe<sup>2+</sup>에 의해서는 활성이 완전히 저해되었다. 그러나 EDTA, SDS, β-mercaptoethanol과 PMSF 등은 활성에 영향을 주지 않는 것으로 밝혀졌다(Table 4).

**효소의 기질 특이성**

효소의 기질 특이성을 조사하기 위해 xylan 외에 CMC, laminarin, soluble starch와 galactomannan을 기질로 하여 효소 반응을 실시하여 유리된 환원당을

조사함으로써 효소 활성을 측정하였는데 xylan 외의 다른 다당류는 전혀 분해하지 못하는 것으로 나타났다(Table 5).

## 요 약

토양으로부터 cellulase-free xylanase를 세포외로 분비 생산하는 고온성 *Bacillus* sp. KK-1을 분리하였다. *Bacillus* sp.의 최적 배양조건은 50°C와 배지의 초기 pH 7.0이었으며 탄소원을 따로 첨가하지 않은 배지에서 최대 효소 생산량은 2.2 unit/ml이었다. Strain KK-1을 배양할 때 배지에 trehalose나 sucrose가 존재하면 효소 생성이 저해되었고 xylan과 xylose에 의해서는 효소의 생성이 증가되었다. *Bacillus* sp.로부터 생산된 부분정제된 xylanase는 70°C, pH 7.0에서 최대 활성을 보였고 65°C에서는 10시간 동안 방치한 경우에 75% 이상의 활성을 유지하였다. 그리고 pH 5.0~9.0에서 효소 반응 활성이 최적조건인 pH 7.0에서의 효소 활성의 90% 이상을 보이고 pH 10.0에서도 60% 이상의 활성을 지니는 내알칼리적 특성을 나타내었다. 또한 pH 5.0~9.0에서 8시간 이상 효소 활성이 안정하게 유지되었다. Xylanase 활성이 금속이온에 의해 감소되는 경우가 많았는데 특히  $Hg^{2+}$ 와  $Fe^{2+}$ 에 의해서는 효소 활성이 완전히 상실되었으나 EDTA, phenylmethylsulfonyl fluoride,  $\beta$ -mercaptoethanol과 SDS에 의해서는 영향을 받지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한 효소 기질 특이성을 조사한 결과 carboxymethylcellulose, laminarin, soluble starch과 galactomannan 등을 전혀 분해하지 못했다.

## 감사의 말

본 연구는 1994년 과학기술처 선도기술개발 과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
2. Thomson, J.A. 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 65-82.
3. Bachmann, S.L. and A.J. McCarthy. 1991. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading system of *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2121-2130.
4. Greve, L.C., J.M. Labavitch, and R.E. Hungate.

1984.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1135-1140.
5. Lee, H., R.J.B. To, R.K. Latta, P. Biely, and H. Schneider. 1987. Some properties of extracellular acetylxylan esterase produced by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2831-2834.
6. Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan, and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.
7. Ragauskas, A.J., K.M. Poll, and A.J. Cesternino. 1994. Effects of xylanase pretreatment procedures on nonchlorine bleaching. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 492-495.
8. Berenger, J.F., C. Frixon, J. Bigliardi, and N. Creuzet. 1985. Production, purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium*. *Can. J. Microbiol.* **31**: 635-643.
9. Dey, D., J. Hinge, A. Shendye, and M. Rao. 1992. Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Can. J. Microbiol.* **38**: 436-442.
10. Morales, P.A., Madarro, J., A. Perez-Gonzalez, J.M. Sendra, F. Pinaga, and A. Flors. 1993. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1376-1382.
11. Okazaki, W., T. Akiba, K. Horikoshi, and R. Akahoshi. 1985. Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 2033-2039.
12. Nakamura, S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono, and K. Horikoshi. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2311-2316.
13. Khasin, A., I. Alchanati, and Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1725-1730.
14. Mountfort, D.O. and R.A. Asher. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1016-1022.
15. Mathrani, I.M. and B.K. Ahring. 1992. Thermophilic and alkalophilic xylanases from several *Dictyoglomus* isolates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 23-27.
16. Gamerith, G., R. Groicher, S. Zeilinger, P. Herzog, and C.P. Kubicek. 1992. Cellulase-poor xylanases produced by *Trichoderma reesei* RUT C-30 on hemicellulose substrates. *Appl. Microbiol. Bio-*

- technol.* **38**: 315-322.
17. Sonne-Hansen, J., I.M. Mathrani, and B.K. Ah-ring. 1993. Xylanolytic anaerobic thermophiles from icelandic hot-springs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 537-541.
  18. Purkarthofer, H., M. Sinner, and W. Steiner. 1993. Cellulase-free xylanase from *Thermomyces lanuginosus*: optimization of production in submerged and soild-state culture. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 677-682.
  19. Alam, M., I. Gomes, G. Mohiuddin, and M.M. Hoq. 1994. Production and characterization of *thermostable xylanases* by *Thermomyces lanuginosus* and *Thermoascus aurantiacus* grown on lignocel-luloses. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 298-302.
  20. Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Genus *Ba-cillus* Cohn 1872, 174. In P.H.A. Sneath (ed.), *Ber-gey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Pp. 1105-1139. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
  21. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid rea-gent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
  22. Milagres, A.M.F. and R.A. Prade. 1994. Produc-tion of xylanases from *Penicillium janthinellum* and its use in the recovery of cellulosic textile fibers. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 627-632.
  23. Perttula, M., M. Ratto, M. Kondradsdottir, J.K. Kristjansson, and L. Viikari. 1993. Xylanases of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 592-595.

(Received 28 December 1994)