

## 재조합 *Bacillus subtilis*로부터 endoxylanase의 과발현 및 분비생산

김종현 · 남수완\*

동의대학교 미생물학과

### Overexpression and Secretory Production of Endoxylanase from Recombinant *Bacillus subtilis*

Jong-Hyun Kim and Soo-Wan Nam\*

Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

#### Abstract

To overproduce endoxylanase from a recombinant *Bacillus subtilis* harboring the pJHKJ4 plasmid, the effects of carbon and nitrogen sources on the cell growth and expression level of endoxylanase were investigated in the flask cultures. Among the various carbon and nitrogen sources tested, glucose and maltose as carbon source and yeast extract as nitrogen source were found to be the most effective for the cell growth and the endoxylanase expression. When the concentration of glucose was increased from 0.5% to 5%, the highest activity of extracellular endoxylanase, 166 unit/ml, was observed at 2% glucose. In case of maltose, the endoxylanase was stably produced at the level of 180 unit/ml, regardless of the concentration of maltose. The higher the concentration of yeast extract, the greater cell growth and endoxylanase expression were obtained. However, the highest endoxylanase activity per unit cell mass was observed with 1% yeast extract. With the optimized medium (2% glucose, 1% yeast extract, etc), about 630 unit/ml of endoxylanase was expressed through the batch fermentation in a fermentor, which expression level corresponded to about 0.7 g-endoxylanase protein/l. It was also found that the plasmid was stably maintained above 70% level, and more than 90% of endoxylanase activity was detected in the extracellular medium.

**Key words** – *Bacillus* endoxylanase, constitutive P<sub>JH</sub> promoter, plasmid stability, secretion

#### 서 론

Xylan은 hemicellulose의 주성분으로 농산 폐기물 또는 목재 성분의 약 30%를 차지하여 cellulose 다음으로 자연계에 풍부한 자원물질이다. Xylan은 xylose의  $\beta$ -D-1,4 사슬 결합으로 이루어진 고분자 물질로서 이를 적절한 미생물 효

소로 분해할 경우, 산업적으로 응용가치가 높은 물질인 xylose와 xylose 당화합물인 xylo-oligosaccharide (xylobiose, xylotriose, xylo-tetraose) 등을 얻을 수 있다. 이들은 알콜 및 acetone-butanol 생산의 기질, 새로운 감미료 소재 개발에 이용되고 있다[1,19].

Xylan의 가수분해에는 endo- $\beta$ -1,4-xylanase (EC. 3.2.1.8; endo-xylanase),  $\beta$ -D-xylosidase (EC. 3.2.1.37; exo-xylanase),  $\alpha$ -arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase 등 여러 효소들의 상호작용이 필요하다 [1, 16]. Xylan을 탄소원으로 이

\*To whom all correspondence should be addressed  
Phone : 82-51-890-1537, Fax : 82-51-891-7740  
E-mail: swnam@hyomin.dongeu.ac.kr

용하는 많은 세균과 곰팡이가 자연계에서 분리·보고되고 있으며, 이러한 미생물이 생산하는 xylanases는 제지산업에서의 표백작용(biobleaching) 또는 폐지의 deinking[13,15, 18], 식품소재 감미료(xylitol 또는 xylo-oligosaccharides) 생산[5,14] 및 제빵산업에서 기능성(향과 texture 개선, 저장중 빵의 firmness 감소 등) 빵효모의 생산[9,11], 곡류사료의 소화 흡수를 제고를 위한 가축사료 첨가제(probiotics) [17] 생산 등으로 활용 범위가 확대되면서 효소학적 특성 연구 및 대량생산 연구가 최근 다시 활발해지고 있다.

그러나, 아직까지 천연자원인 xylan의 활용은 본격화되지 못하고 있으며, xylose 및 xylose 유래 당화합물 등의 산물을 대량생산하려는 복합적인 연구도 미비한 실정이다. 특히, xylan을 분해하는 화학적 분해법은 고온, 고압 또는 강산, 강알칼리 조건하에서 이루어지기 때문에 효소적 분해법에 비해 경제성이 떨어지며, 부반응에 따른 부산물의 생산 및 부산물 제거문제, 분해 반응 후의 폐기물 양산에 따른 환경 오염문제 등 많은 문제점을 가지고 있다. 따라서, 이러한 문제를 해결하고 농산 부산물인 biomass (xylan)를 고부가가치 유용물질로의 전환, 심각해지는 자원난의 해결책 등으로 효소적 분해법의 개발이 필요하며 결과적으로 xylan 분해 효소들의 과발현 및 대량생산 연구가 절실히 요구된다.

Xylanase 효소의 과발현 및 대량생산을 위해서는 단백질 분비능이 뛰어난 *Bacillus*를 숙주세포로 사용함이 바람직하며, 유전자 과발현에 활용할 수 있는 *Bacillus* 유래의 강력한 구성적 (constitutive)  $P_{JH}$  promoter가 최근 보고되었다 [8]. 이에 본 논문에서는 최근 cloning된 *Bacillus*. sp. 유래 endoxylanase 유전자[4]를  $P_{JH}$  promoter 하류에 subcloning하여 재조합 *Bacillus*에서 endoxylanase의 과발현·생산을 위한 배지 최적화와 회분배양에서의 발현특성을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

사용균주, Plasmid 및 형질전환법

본 연구에서는 *B. subtilis* DB104 (*hisH nprR2 nprE18 aprE*)[7]를 숙주세포로 사용하였고, plasmid는 구성적  $P_{JH}$  promoter와 endoxylanase 자체 promoter인  $P_B$  promoter 하류에 endoxylanase 유전자 (ORF는 639 bp)가 연결된

pJHKJ4 (Fig. 1)를 사용하였다[5]. *B. subtilis* DB104의 형질 전환은 Contente와 Dubnau 등의 방법[2]으로 하였으며 형질 전환 균주의 선별 및 보존은 kanamycin 함유 (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) LB 평판배지에서 하였다.

### 배지 및 배양조건

*B. subtilis* DB104 숙주세포 및 재조합 균주 (DB104/pJHKJ4)의 기본 배양을 위하여 LB (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)를 사용하였으며, 탄소원과 질소원의 영향을 조사하기 위해서는 반합성 배지 (Semi-synthetic medium; SSM) (per 1.0 l, yeast extract 1 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, 1 ml 미량원소액)에 탄소원과 질소원을 첨가하여 사용하였다. 미량원소액의 조성은 다음과 같다: per 100 ml 0.1N HCl,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1.51 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.17 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.13 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.025 g,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.0125 g,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0125 g,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.023 g,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0.25 g.

25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 kanamycin을 함유한 10 ml LB 배지에서 일정한 세포농도( $\text{OD}_{660}$  값이 약 1.0)까지 전배양 후 플라스크에 접종하여 진탕배양하였다. 플라스크 배양은 배지 50 ml을 함유하는 500 ml baffled-flask로 180 rpm에서 수행하였으며, 발효조 (Korea Fermentor Co., Korea)에서의 회분배양은 다음의 조건으로 수행하였다: working volume, 1.0

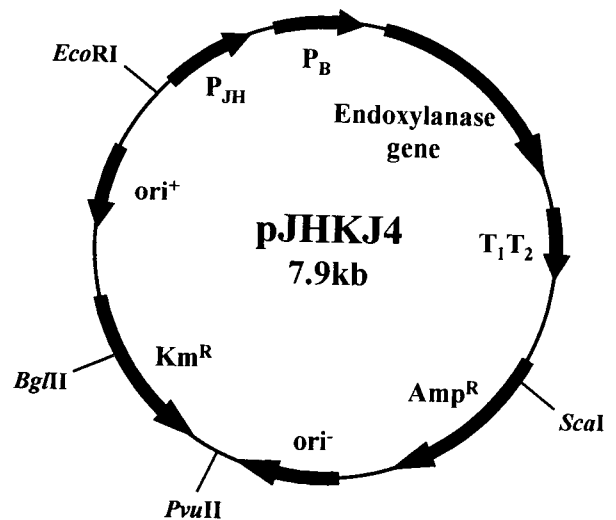


Fig. 1. Schematic diagram of the pJHKJ4 plasmid.

l; 온도, 37°C; pH, 7.0; 교반속도, 300~800 rpm; 통기속도, 1~2 vvm.

#### 균체농도 및 잔존 환원당농도 측정

균체농도의 측정은 660 nm에서의 탁도 (OD<sub>660</sub>)로 하였으며, 잔존 환원당농도는 3,5-dinitrosalicylic acid법 [10]으로 측정하였다.

#### Endoxylanase의 활성측정

Endoxylanase의 활성은 환원당 측정법 [10]을 이용하여 1% xylan으로부터 생성되는 환원당의 양으로 측정하였다. 즉, pH 6.6 (0.1 M 인산완충액), 60°C에서 분당 1 μmol의 환원당 (xylose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

#### 균체 파쇄

*B. subtilis* 세포내 endoxylanase 활성 측정을 위해 Neu와 Heppel의 방법 [12]에 따라 균체를 파쇄하였다. 즉, 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 TE 완충액 (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.0)으로 2~3회 세척 후, 0.1% (w/v) lysozyme 1 ml과 20 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride 10 μl에 균체를 현탁하였다. 이를 37°C에서 1시간 진탕한 다음 -80°C에서 20분간 급속동결 후 37°C에서 다시 30분간 진탕하여 해동시켰다. 이 현탁액을 원심분리하여 얻은 상등액을 균체분획으로 사용하여 세포내 endoxylanase 활성을 측정하였다.

#### Plasmid 안정성

배양액을 적당히 희석하여 LB 평판배지에 도말한 후 생성된 100~200개의 colony를 선별배지인 kanamycin 함유 LB 배지로 옮긴 다음 형성된 colony 수의 비 (백분율)로 측정하였다.

#### 전기영동 분석

세포외 endoxylanase의 생성 양상과 분자량 분석은 SDS-PAGE (12% gel)를 통해 행하였으며[6], 대조구로 사용한 endoxylanase는 배양상등액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 침전, 한외여과 및 CM52 cation-exchange chromatography를 통해 정제한 것이다. 전기영동한 gel 또는 사진은 Image Analyzer (Image

Master VDS, Pharmacia Biotech., USA)로 scanning하였다.

## 결과 및 고찰

#### 탄소원 및 질소원의 결정

탄소원의 종류에 따른 균체증식과 endoxylanase 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해서 SSM 배지에 각종 탄소원 (glucose, cellobiose, maltose, starch, sucrose, xylose, lactose)을 2% 농도 (starch의 경우 1%)로 첨가하여 24시간 배양하였다. 그 결과 균체증식은 glucose, cellobiose, maltose, sucrose에서 높게 나타났고, endoxylanase 발현은 glucose, cellobiose, maltose, xylose의 경우 다른 탄소원에 비해 약 2배 정도 높게 나타났다 (data not shown). 따라서, 경제적인 endoxylanase 생산을 위한 탄소원으로 glucose와 maltose를 선정하였다.

질소원의 영향은 yeast extract와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 뺀 SSM 배지에 무기 및 유기 질소원을 1%씩 첨가하여 조사하였다. 유기 질소원이 무기 질소원에 비해 4~6배 정도 높은 균체증식을 보이며, 유기 질소원 중에서 casamino acid보다 yeast extract가 endoxylanase 발현에 약 2배 정도 더 효과적이었다 (data not shown). 따라서 질소원으로는 yeast extract를 최종 선정하였다.

#### 탄소원과 질소원의 최적 농도 결정

포도당과 maltose 및 yeast extract의 최적 농도 결정은 LB 배지 (yeast extract 1%)를 기본배지로 사용하여 결정하였다. 먼저 glucose의 첨가 농도에 따른 균체증식과 xylanase 발현을 조사한 결과 (Table 1), glucose 농도가 높을수록 균체농도 (OD<sub>660</sub>)는 7.5에서 4.7로 감소하는 경향을 보였고, endoxylanase 활성도 202 unit/ml에서 137 unit/ml로 감소하였다. 단위 균체농도당 endoxylanase 활성 (비활성, unit/ml/OD<sub>660</sub>)은 2% glucose에서 가장 높은 30.7의 값을 보여 최적 glucose의 농도는 2%로 결정하였다. 높은 glucose 농도에서의 낮은 균체증식과 endoxylanase 발현은 기질저해 및 catabolite repression에 의한 것으로 추정된다.

Maltose의 경우, maltose 농도에 관계없이 균체농도와 endoxylanase 활성은 7.2~7.5 OD<sub>660</sub>와 181~186 unit/ml로 일정한 수준을 보였으며 비활성은 2%에서 가장 높은 25.3 unit/ml/OD<sub>660</sub> 값을 보여 최적 maltose 농도는 2%로 결정

Table 1. Effect of glucose concentration on the cell growth and endoxylanase expression in recombinant *B. subtilis* DB104 harboring pJHKJ4 plasmid. The cell was cultivated on LB (1% yeast extract) medium for 24 hr.

Glucose Concentration (%)	Cell Concentration (OD <sub>660</sub> )	Endoxylanase Activity (unit/ml)	Specific Activity (unit/ml/OD <sub>660</sub> )
0.5	7.6	202	26.6
1	6.4	161	25.2
2	5.4	166	30.7
3	5.3	149	28.1
4	4.8	146	30.4
5	4.7	137	29.1

하였다 (Table 2).

최적 질소원인 yeast extract의 첨가 농도 (0.5%에서 3%)에 따른 균체증식 및 endoxylanase 발현 양상을 조사하였다. 이때 탄소원으로 maltose를 2% 첨가하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 yeast extract 농도에 비례하여 균체농도와 endoxylanase 발현량이 증가하였으며, 비활성이 29.8 unit/ml/OD<sub>660</sub>로 가장 높은 1%를 최적농도로 정하였다.

이상의 플라스크 배양에서 잔존 glucose와 maltose 농도를 측정된 결과, 소모된 양이 2~6 g/l 수준으로 나타나 숙주세포인 *B. subtilis* DB104의 탄소원 소모능이 매우 저조함을 알 수 있었다. 이러한 요인으로 제한인자의 존재 가능성을 조사하기 위해 각종 염 (인산염, 마그네슘염, 칼

Table 2. Effect of maltose concentration on the cell growth and endoxylanase expression in recombinant *B. subtilis* DB104 harboring pJHKJ4 plasmid. The cell was cultivated on LB (1% yeast extract) medium for 24 hr.

Maltose Concentration (%)	Cell Concentration (OD <sub>660</sub> )	Endoxylanase Activity (unit/ml)	Specific Activity (unit/ml/OD <sub>660</sub> )
0.5	7.4	182	24.6
1	7.5	181	24.1
2	7.3	185	25.3
3	7.4	186	25.1
4	7.5	185	24.7
5	7.2	181	25.1

Table 3. Effect of yeast extract concentration on the cell growth and endoxylanase expression in recombinant *B. subtilis* DB104 harboring pJHKJ4 plasmid. The cell was cultivated on LB + maltose (2%) medium for 24 hr.

Yeast Extract Concentration (%)	Cell Concentration (OD <sub>660</sub> )	Endoxylanase Activity (unit/ml)	Specific Activity (unit/ml/OD <sub>660</sub> )
0.5	4.8	112	23.3
1	6.2	185	29.8
2	8.7	253	29.1
3	11.9	288	24.2

슘염 등), 아미노산 (알라닌, 글루타민산, 아스파라긴산 등), vitamin (B1, B2, 판토텐산 등) 등을 과량 첨가하여 균체 증식 효과를 조사하였으나 탄소원 소모에는 큰 변화가 없었다 (data not shown).

발효조 회분 배양을 통한 Endoxylanase 발현

탄소원으로 glucose를 2%, 질소원으로 yeast extract를 1% 첨가한 LB 배지로 발효조 회분배양을 실시하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 균체증식은 배양 8시간까지 대수기를 보이다가 이후 정지기에 들어가며, 정지기에 약간의 증식이 있었다. Endoxylanase 발현은 배양 말기까지

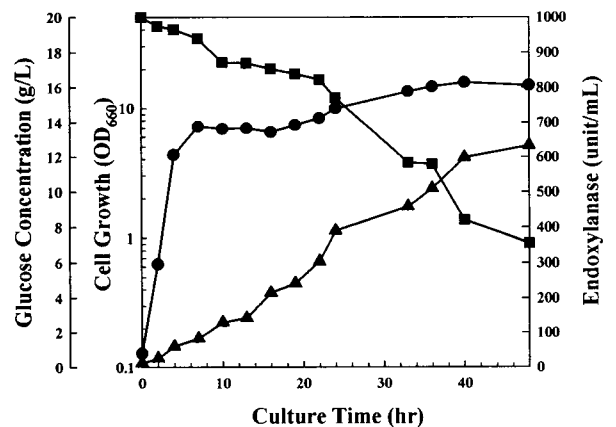


Fig. 2. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and endoxylanase expression by batch fermentation of *B. subtilis* DB104/pJHKJ4 cell on LB + 2% glucose medium.

Symbols : (●), cell growth; (■), residual glucose concentration; (▲) extracellular endoxylanase activity

계속되었다. 플라스크 배양과 마찬가지로 발효조 배양에서도 glucose는 완전히 이용되지 못하였다. 발효조 회분배양으로 최대 균체농도는 15 OD<sub>660</sub>, 최대 endoxylanase 발현량은 630 unit/ml에 달하였으며, 배양 말기까지 plasmid stability는 70% 이상으로 높게 유지되었고, 세포내 endoxylanase 활성은 33 unit/ml 수준에 달해 총발현된 endoxylanase의 95% 이상이 세포외 배지로 분비·생산됨을 알 수 있었다.

회분배양 결과를 플라스크 배양 결과 (Table 1의 2% glucose 경우, 균체농도는 5.4 OD<sub>660</sub>, endoxylanase 활성은 166 unit/ml)와 비교해 보면 균체농도는 2.8배, endoxylanase 발현량은 3.8배 증가하였다. 탄소원이 포함되지 않은 LB 배지에서의 발현량 (105 unit/ml)[5]에 비해서는 발효조 배양이 약 6배 증가한 발현량을 보였다. 이 발현량은 재조합 endoxylanase의 비활성 (859 unit/mg-protein)[5]으로 계산했을 때, 최대 약 0.7 g-protein/l 에 해당되어 발효조 회분배양에서 endoxylanase 단백질이 균체외로 과발현·분비 생산됨을 알 수 있었다.

#### 재조합 Endoxylanase의 SDS-PAGE 분석

상기 회분배양의 상등액 6 μl를 배양 시간별로 SDS-PAGE (12% gel)로 분석한 결과 (Fig. 3), 배양시간 (균체증식)에 따라 약 20.4 kDa의 endoxylanase 단백질이 계속 과

발현·분비·생산됨을 알 수 있고, band들의 image 분석 결과 세포의 단백질의 65% 정도를 차지하는 주된 단백질을 알 수 있었다. 이는 배양 상등액 중의 총단백질량 (약 2 g/l)을 고려하면 재조합 endoxylanase 단백질이 약 1.3 g/l 수준으로 생산됨을 의미한다. 배양시간에 따라 분자량이 큰 단백질들 (25.5, 42.2, 61.7 kDa의 bands)도 소수의 band들로 보이지만 (Fig. 3) gel의 활성염색 결과, endoxylanase 활성을 보이지 않아 숙주세포 (또는 재조합 세포)가 생산하는 세포외 미지 단백질들로 추정되었다.

결론적으로, 구성적 발현에 따른 문제들 (plasmid 불안정성, 재조합 단백질의 생산성 저하 등) 때문에 유도성 promoter 발현계나 염색체 삽입 발현계를 많이 활용하고 있음 [3, 20]을 감안하면, 본 연구에 사용한 P<sub>JH</sub> promoter는 이들 발현계를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 기존의 강력한 구성적 promoter인 P43 promoter [20]보다 월등히 우수한 promoter로 판단된다. 또한 본 연구에서 사용한 DB104 숙주세포보다 탄소원 이용능이 뛰어난 숙주세포를 선택하여 고농도 유가배양을 한다면, 재조합 endoxylanase의 생산성을 크게 향상시킬 것으로 사료된다.

## 결론

재조합 *B. subtilis* DB104/pJHKJ4 균주를 이용하여 여러 종류의 탄소원과 질소원에 대하여 균체증식 및 endoxylanase 발현에 미치는 영향을 조사하여 최적 탄소원으로 glucose와 maltose를, 최적 질소원으로 yeast extract를 선정하였다. 또한 이들의 최적 농도를 균체농도당 endoxylanase 발현량 관점에서 조사한 결과, glucose 또는 maltose의 경우 2%, yeast extract의 경우 1%가 최적 농도로 결정되었다. 최적 배지로 발효조 회분 배양한 결과, 최대 균체농도는 15 OD<sub>660</sub>, 최대 endoxylanase 발현량은 630 unit/ml에 달하였으며, 배양 말기까지 plasmid stability는 70% 이상으로 높게 유지되었고, 총발현된 endoxylanase의 95% 이상이 세포외 배지로 분비·생산됨을 알 수 있었다. 회분배양 결과를 플라스크배양 결과와 비교하면 균체농도는 2.8배, endoxylanase 발현량은 3.8배 증가하였다. 또한, 회분 배양의 상등액을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 20.4 kDa의 endoxylanase band가 세포의 단백질의 65%를 차지하는 주된 단백질이었으며, 재조합 endoxylanase의 비활성과 세포외 총

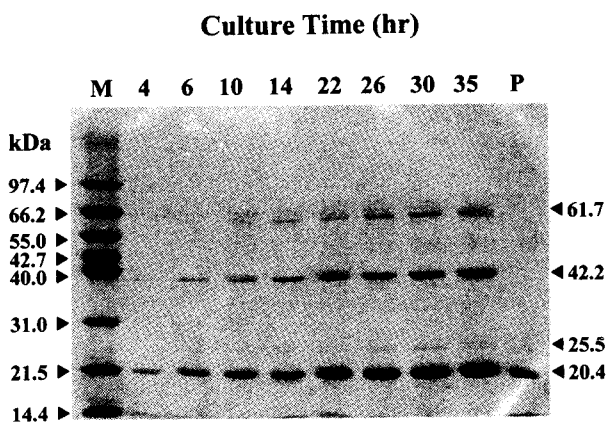


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of the culture supernatant. 6 μl of the supernatant at each culture times were loaded on the 12% gel.

Lane M, protein molecular weight marker; lane P, purified endoxylanase.

단백질량 등을 고려하면 배양 상등액 리티당 endoxylanase 단백질이 0.7~1.3 g 정도로 대량생산됨을 시사하였다.

### 참 고 문 헌

1. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**, 286-290.
2. Contente, S. and D. Dubnau. 1979. Characterization of plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: kinetic properties and the effect of DNA conformation. *Mol. Gen. Genet.* **167**, 251-258.
3. Henner, D. J., S. F. J. Le Grice, and V. Nagarajan. 1990. Expression in *Bacillus*, pp. 199-228, In Goeddel D. V. (ed.), *Methods in Enzymology*, Vol. **185**, Academic Press Inc., New York.
4. Jeong, K. J., P. C. Lee, I. Y. Park, M. S. Kim, and S. C. Kim. 1998. Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 599-605.
5. Jeong, K. J., I. Y. Park, M. S. Kim, and S. C. Kim. 1998. High-level expression of an endoxylanase gene from *Bacillus* sp. in *Bacillus subtilis* DB104 for the production of xylobiose from xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 113-118.
6. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680-685.
7. Kawamura, F. and R. H. Doi. 1984. Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral protease. *J. Bacteriol.* **160**, 442-444.
8. Kim, J. H. and M. Y. Pack. 1993. Overproduction of extracellular endoglucanase by genetically engineered *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.* **15**, 133-138.
9. Maat, J., M. Roza, J. Verbakel, H. Stam, M.J. Santos da Silva, M. Bosse, M.R. Egmond, M.L.D. Hagemans, R.F.M.V. Gorcom, J.G.M. Hessing, C.A.M.J.J. van der Hondel, and C.V. Rotterdam. 1992. Xylanases and their application in bakery, pp. 349-360, In Visser, J., G. Beldman, M.A. Kusters-van Someren, and A.G.J. Voragen (eds.), *Xylans and xylanases*, Elsevier Science, Amsterdam.
10. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
11. Monfort, A., A. Blasco, J. A. Prieto, and P. Sanz. 1996. Combined expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase in industrial baker's yeasts and their use in bread making. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3712-3715.
12. Neu, H. C. and L. A. Heppel. 1965. The release of enzymes from *E. coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplast. *J. Biol. Chem.* **240**, 3685-3692.
13. Nevalainen, H., A. Harkki, M. Penttila, M. Saloheimo, T. T. Teeri, and J. K. C. Knowles. 1990. *Trichoderma reesei* as a production organism for enzymes for the pulp and paper industry, pp. 593-599, In Kirk, T. K. and H. M. Chand (eds.), *Biotechnology in pulp and paper manufacture*, Butterworth-Heinemann, Boston.
14. Parajo, J. C., H. Dominguez, and J. M. Dominguez. 1996. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: effect of the initial cell concentration. *Biotechnol. Lett.* **18**, 593-598.
15. Tenkanen, M., J. Buchert, J. Puls, K. Poutanen, and L. Viikari. 1992. Two main xylanases of *Trichoderma reesei* and their use in pulp processing, pp. 547-550, In Visser, J., G. Beldman, M. A. Kusters-van Someren, and A. G. J. Voragen (eds.), *Xylans and xylanases*, Elsevier Science, Amsterdam.
16. Thomson, J. A. 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**, 65-82.
17. Van Paridon, P. A., J. C. P. Boonman, G. C. M. Selten, C. Geerse, D. Barug, P. H. M. De Bot, and G. Hemke. 1992. The application of fungal xylanase in poultry diets, pp. 371-378, In Visser, J., G. Beldman, M. A. Kusters-van Someren, and A. G. J. Voragen (eds.), *Xylans and xylanases*, Elsevier Science, Amsterdam.
18. Wong, K. K. Y., S. L. Nelson, and J. N. Saddler. 1996. Xylanase treatment for the peroxide bleaching of oxygen delignified kraft pulps derived from three softwood species. *J. Biotechnol.* **48**, 137-145.
19. Wong, K. K. Y., U. L. Larry, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**, 305-317.
20. Ye, R., J. H. Kim, B. G. Kim, S. Szarka, E. Sihota, and S. L. Wong. 1999. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 87-96.