

Bacillus subtilis에서 발현된 재조합 Endoxylanase 농축과 안정화 공정의 최적화

최영록 · 박정하 · 남수완¹ · 김영만² · 권현주 · 김병우*
동의대학교 미생물학과, ¹생명공학과, ²식품영양학과 및 (주)오리엔탈바이오텍

Process Optimization for Concentration and Stabilization of Recombinant Endoxylanase Expressed in *Bacillus subtilis*. Choi, Young-Rok, Jung-Ha Park, Soo-Wan Nam¹, Young-Man Kim², Hyun-Ju Kwon, and Byung-Woo Kim*. Department of Microbiology, ¹Department of Biotechnology and Bioengineering, ²Department of Food and Nutrition, Oriental Biotech. Co., Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – A strong constitutive P_{JH} promoter from *Bacillus* sp. was applied to overexpress the endoxylanase gene (639 bp) in *Bacillus subtilis*. The expression plasmid, pJHKJ4, was designed to contain the P_{JH} promoter and open reading frame of endoxylanase including its own promoter. The plasmid was introduced into *B. subtilis* DB431 and the resulting transformant was grown on LB glucose medium. At the end of cultivation, the endoxylanase activity in the culture supernatant reached about 140 U/ml. The enzyme in the supernatant was concentrated by ultrafiltration (MW cut-off 10 kDa and 30 kDa) and ammonium sulfate precipitation. For the concentration of the enzyme, ultrafiltration was more efficient than 70% ammonium sulfate precipitation. The stabilization of concentrated enzyme solution at 50°C was examined with various stabilizers such as NaCl, glycerol, polyethylene glycol, sorbitol, and CaCl₂. The most effective stabilizers were found to be NaCl and CaCl₂.

Key words: *Bacillus subtilis*, endoxylanase, constitutive P_{JH} promoter, concentration, stabilization

Xylan은 hemicellulose의 주성분으로 농산 폐기물 또는 목재 성분의 약 30%를 차지하여 cellulose 다음으로 자연계에 풍부한 자원물질이다. Xylan은 xylose의 β-D-1,4 사슬결합으로 이루어진 고분자 물질로서 xylan의 가수분해에는 endo-β-1,4-xylanase, β-D-xylosidase, α-glucuronidase, α-L-arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase 등 여러 효소들의 상호작용이 필요하다[5, 25, 23]. Xylan은 용도 개발에 따라서는 앞으로 이용성이 매우 높은 물질이다. 따라서 xylan 분해효소인 xylanase 역시 산업적 수요가 매우 증가할 것으로 예측된다. 이 효소의 중요성은 지구상에서 가장 풍부한 태양에너지에 의해 합성되는 xylan과 같은 식물성 섬유질을 분해·당화하여 에너지 자원화하는 것인데 이는 향후 더 많은 연구가 있어야만 실용화가 가능한 분야이다. 현재 이 효소가 실용화되고 있는 분야는 고급용지의 생산(biobleaching)[20, 22] 및 폐지재생[2, 15, 24], 과일음료 및 맥주의 혼탁물 제거, 커피와 식물성 기름 및 전분의 추출 등이다. 최근에는 사료첨가용 효소와 자일로올리고당 생산효소로서 xylanase의 산업적 수요가 증대되고 있다. 그러나 xylanase를 이용하여 xylan으로부터 자일로올리고당을 생산하기 위해서는 효소의 대량생산 공정을 포함한 생물반응공

정 개발 등 다양하고도 유기적인 복합 연구가 필요하다. Xylan 분해법은 크게 화학적 분해법과 효소적 분해법 두가지로 나눌 수 있다. 화학적 분해법은 고온, 고압 또는 강산, 강알칼리 조건 하에서 이루어지기 때문에 xylanase를 이용하는 효소적 분해법에 비해 경제성이 떨어지며, 부반응에 의한 부산물의 생산 및 그에 따른 부산물 제거 문제, 분해 반응 후의 폐기물 양산에 따른 환경 오염문제 등 많은 문제점을 가지고 있다. 따라서, 이러한 문제를 해결하고 농산 부산물인 xylan을 고부가가치의 유용물질로의 전환시키기 위해서는 효소적 분해법의 개발이 필요하다.

Xylanase는 수용성 xylan과 함께 cellulose에 결합된 불용성 xylan도 분해할 수 있으므로 pulp에 잔존하는 xylan과 이와 결합된 lignin을 제거하는데 이용될 수 있다. 제지공업에서 chlorine을 사용하는 제지원료의 표백공정에서 독성이 높은 chlorinated compounds가 다량 방출되는데 최근 들어 이러한 화학물질을 사용하는 표백공정에 xylanase를 응용하려는 biobleaching[17]에 대한 관심이 높아지고 있다. 따라서 이러한 제지의 표백공정이 고온과 알칼리 조건에서 이루어지고 있다는 점에서 제지산업의 biobleaching 공정에 응용하기 위해서 그리고 장기간 사용을 위한 조건으로 내열성이며 내알칼리성 xylanase가 요구된다. 그러나 xylanase를 이용하는 biopulping 및 alcohol 발효 기술 등은 아직 초보적인 단계이고, 유전자 재조합 기술에 의한 xylanase 생산 *Bacillus* 균주가 개발되어 있기는 하나 이 균주로부터 효

*Corresponding author
Tel: 82-51-890-1536, Fax: 82-51-890-1532
E-mail: bwkim@deu.ac.kr

소의 대량 생산 공정이나 이 효소를 이용한 xylan 분해 및 xylooligosaccharide 생산 공정에 관한 연구는 거의 진행되어 있지 않다. 효소생산을 위한 고역가 재조합 균주의 개발이나 발효 최적화에 대한 연구는 최근 많이 보고 되고 있으나 아직까지 국내에서 xylanase의 산업적 효소 생산에 적용한 예는 없어 이 효소의 과발현 대량생산 및 고도 농축과 안정화 연구가 절실히 요구된다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용한 숙주세포는 *B. subtilis* DB431(*trpC apr npr epr bpr*) 균주를 사용하였으며, plasmid 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5 α [*sup44 Δlac U169(ΦlacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 Tri-1 relA1*]를 사용하였다. Endoxylanase 발현을 위한 pJHKJ4 plasmid[6]는 P_{JH} promoter와 endoxylanase 자체 promoter가 함유되어 있다.

배지 및 배양조건

본 연구에서 숙주세포인 *B. subtilis* DB431 보존은 kanamycin 함유(25 μg/ml) LB 평판배지를 사용하였다. *B. subtilis* DB431 숙주세포 및 재조합 균주(DB431/pJHKJ4)의 전배양에는 LB glucose(1% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% glucose)를 사용하였으며, 25 μg/ml의 kanamycin함유한 10 ml LB glucose 배지에서 일정한 세포농도(OD₆₀₀ = 1.0)까지 전배양 후 플라스크에 접종하여 본배양하였다. 플라스크배양은 배지 50 ml를 함유하는 500 ml baffled-flask로 200 rpm, 37°C에서 진탕 배양하였다. 재조합 *Bacillus*의 발효조 회분배양은 LB 배지(1% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% Tryptone)에 2% maltose를 첨가한 LBM을 사용하였다. 재조합 *Bacillus* 균주의 전배양은 LB 배지로 하였으며 플라스크 배양 및 발효조 배양시 접종량은 1~5%(v/v)로 하였다. 플라스크 배양은 500 ml baffled flask(working volume: 50 ml)로 37°C, 200 rpm에서 수행하였으며, 발효조(KoBiotech Co., Korea) 회분배양은 LBM배지에서 working volume, 2.0L; 온도, 37°C; 초기 pH, 7.0, 교반속도, 300~800 rpm; 통기속도, 2~4 vvm의 조건에서 배양하였다.

균체농도, 잔존환원당 측정

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도로서 측정하였다. 잔존환원당 농도는 배양액을 3,000×g에서 5분 동안 원심분리한 후 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid 방법[13]으로 측정하였다.

Endoxylanase의 활성 측정

Endoxylanase 활성측정은 균체 침전물을 lysozyme을 사

용하여 세포분획을 얻은후 이 분획과 배양 상등액을 사용하여 활성을 측정하였다[14]. Endoxylanase의 활성은 1% oat spelts xylan을 기질로 사용하여 pH 6.5(20 mM 인산 완충액), 60°C에서 분당 1 μmol의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

세포내외 endoxylanase의 생성 양상과 분자량 분석은 SDS-PAGE를 통해 행하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다[11].

조효소액의 조제

조효소액의 조제는 재조합 *B. subtilis* DB431/pJHKJ4를 2.5 L 발효조에서 1000 ml의 working volume으로 회분배양하고 배양액을 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 하였다. 효소의 제품화를 위한 부분 정제와 농축 공정으로서는 염석법과 ultrafiltration법 두 가지로 실시하였다. 염석법은 조효소액을 70% ammonium sulfate로 염석하고 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전시켰다. 침전물은 적당량의 20 mM 인산 완충액(pH 6.5)에 녹이고 다시 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 불용성 침전을 제거한 다음 20 mM 인산 완충액(pH 6.5)로 4°C에서 24시간 투석하였다. Ultrafiltration법은 조효소액을 ultrafiltration membrane(MW cut-off = 10,000, Millipore, Bedford, MA, U.S.A)을 이용하여 10 kDa 이하의 저분자 물질을 제거하고 농축액을 다시 ultrafiltration membrane(MW cut-off = 30,000)을 이용하여 30 kDa 이상의 단백질을 제거하고 농축시켰다.

단백질 정량

단백질량 측정은 Smith 등의 방법을 이용한 BCA(bicinchoninic acid) 단백질 정량법[19]을 이용하여 측정하였다. 단백질 표준물질은 bovine serum albumin을 사용하였다.

결과 및 고찰

재조합 endoxylanase의 과발현 생산

구성적 P_{JH} promoter를 유전자의 발현에 활용할 경우 포도당과 같은 값싼 배지를 사용할 수 있고 유가배양과 같은 오랜 시간의 배양에서도 효소를 대량생산할 수 있다. 본 연구진은 endoxylanase를 구성적 P_{JH} promoter를 이용하여 630 U/ml로 대량 발현 시켜 생산한 바 있다[9]. 따라서, 본 연구에서는 농산 부산물을 산업적으로 활용하기 위해서 endoxylanase 생산능이 우수한 재조합 균주를 이용해 효소의 대량생산 제품화 공정과 효소의 안정성을 검토 하는데 있다. 먼저 조효소액의 생산을 위해서 재조합 *B. subtilis* DB431/pJHKJ4 균주를 플라스크 배양하여 균체증식과

endoxylanase 생산량을 조사하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 균체 증식은 3시간 이후로 급격한 성장을 보인 후 6시간 이후부터는 정지기에 도달하였다. 사용한 P_{JH} promoter가 구성적 promoter이기 때문에 균체증식과 관련되어 endoxylanase가 과발현 생산(growth-associated expression)된다. 배양 결과 배양 3시간 후부터 효소가 생산되어 배양 18시간에 최대가 되어 최대 140 U/ml이 배양상등액으로 분비되었다. 생산된 효소의 분포는 총 효소의 98%가 배양상등액으로 분비되어 재조합 균 *B. subtilis* DB431/pJHKJ4는 endoxylanase를 산업적으로 생산하는데 매우 유용한 균주였다.

Bacillus 유래의 endoxylanase 유전자를 *E. coli*에서 발현시켰을 경우 발현량은 야생형 보다 낮았으며, 발현된 단백질이 봉입체(inclusion body)형성에 의한 생산성이 저하되었다[4, 16, 18]. 특정 유전자의 과발현을 위해 *Bacillus*에서 가장 많이 이용되는 promoter로는 P43(구성적 promoter), PamyE(균체 증식에서 정지기 에서만 작동하는 promoter), PsacB(sucrose 유도성 promoter) 등이 있다[26]. 이 중 β -galactosidase 발현에는 P43 > PamyE > PsacB 순으로 promoter의 전사 강도가 감소하고, staphylokinase 발현생산에는 PsacB와 P43 promoter가 훨씬 우수한 것으로 보고되어 있다[4, 16, 18]. Staphylokinase의 경우 P43 promoter에서

약 225 mg/l, PsacB promoter의 경우 유가배양(sucrose 공급)에서 337 mg/l 수준으로 발현시킬 수 있는 것으로 보고 되어있다[4, 16, 18].

Endoxylanase의 고도 농축

과발현 생산된 endoxylanase의 안정화 공정을 개발하기 위해 배양액을 ultrafiltration으로 농축하였다. Endoxylanase 조효소액 1,000 ml(total protein 2,780 mg, total activity 169,800 U, specific activity 61 U/mg)을 10 kDa ultrafiltration membrane을 사용하여 10 kDa 이하 저분자량 단백질을 제거하고 5배정도 농축시켰다. 그 결과 농축액 200 ml은 specific activity가 78.8 U/mg으로 1.3배 정제도와 75.3%의 회수율을 보였다. 10 kDa 이상의 농축액을 다시 30 kDa membrane을 이용하여 분자량 30 kDa 이상을 제거하고 농축한 결과 specific activity가 219.8 U/mg으로 3.6배 정제도와 55.6%의 회수율을 보였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 10 kDa과 30 kDa로 두 종류의 membrane으로 ultrafiltration 함으로써 거의 정제된 효소액을 얻을 수 있는 것으로 확인 되었다. 한편 염석법에 의한 농축 효율을 비교 검토하기 위해서 배양상등액을 ammonium sulfate 70%로 염석하고 투석한 결과 specific activity가 73.2 U/mg으로 1.2배 정제도와 40.3%의 회수율을 보였다. 본 효소의 농축에 있어서 염석과 투석법에 의한 정제의 시간과 비용을 고려하면

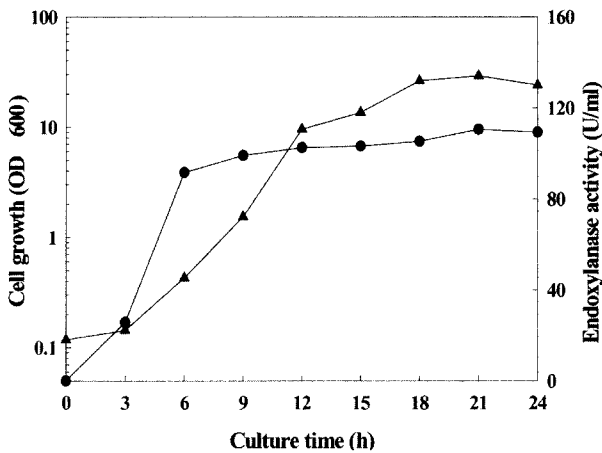


Fig. 1. Time profiles of cell growth and endoxylanase production in the flask culture of *B. subtilis* DB431/pJHKJ4 on LB glucose medium. Symbols : ●, cell growth; ▲, extracellular endoxylanase activity.

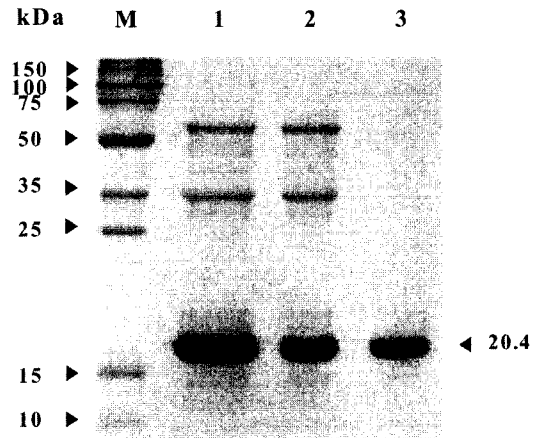


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of endoxylanase. lane M: Protein molecular weight markers, lane 1: Culture supernatant, lane 2: Ultrafiltration (10K>), lane 3: Ultrafiltration (10K<, <30K).

Table 1. Comparison of ultrafiltration and ammonium sulfate precipitation for endoxylanase concentration

Method	Step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Start	Supernatant	1,000	2,780	169,800	61.0	1	100
Ultrafiltration	Ultrafiltration (cut-off 10K<)	200	1,620	127,800	78.8	1.3	75.3
	Ultrafiltration (cut-off 30K>)	170	430	94,500	219.8	3.6	55.6
Precipitation	Ammonium sulfate 70%	35	936	68,590	73.2	1.2	40.3

었다. 이들 두 공정 사이의 농축 효율은 Table 1에 비교하여 나타내었다.

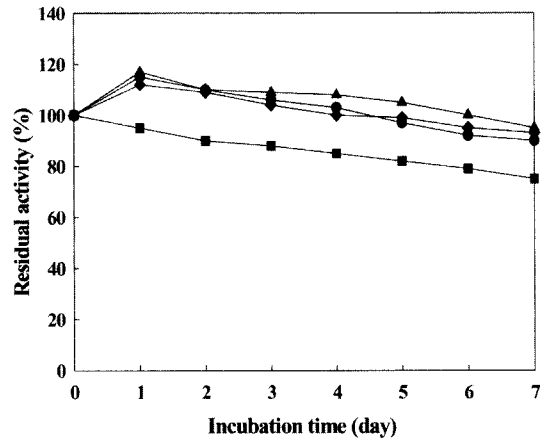
한편, Sung 등[21]은 *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생성된 xylanase II를 분리·정제하여 조사한 결과 각 단계별 specific activity는 조효소에서 8.8 U/mg protein, ammonium sulfate 침전법 10.4 U/mg protein, Sephadex G-100 17.4 U/mg protein, 및 DEAE-Sephacel 38.2 U/mg protein으로 각각 1.2, 2.0, 4.3배 정제도와 55.5, 48.4, 6.7%의 회수율을 보고하였고, Bae 등[3]은 알칼리성 용액에서 높은 효소활성을 나타내는 *Bacillus stearotherophilus*의 specific activity가 17.68 U/mg으로 27.63배의 정제도와 0.85%의 회수율을, Li 등[12]은 *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1의 specific activity가 2,440 U/mg으로 5.8 배의 정제도를 보고한 바 있다. 그러나 이들 연구결과들은 효소의 공업적 생산보다는 학술 연구의 목적으로 순수분리를 위한 정제 방법인데 반해 본 연구는 공업적 생산을 위한 정제 방법임에도 불구하고 비교적 고순도로 정제되었고 회수율 역시 매우 뛰어나다.

효소의 안정화

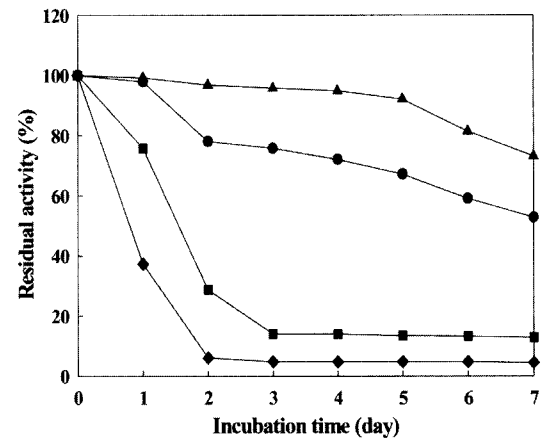
효소를 제품화 하는데 있어서는 분말 보다는 액상이 훨씬 경제성이 있다. 그러나 액상효소로 제품화하는 경우, 유통이나 보관 및 효소의 반응 시에 효소의 실활 등 안정성에 문제가 있어 통상적으로 안정제를 첨가하게 된다. 본 효소의 경우에도 안정제로 어떠한 안정제가 효과적인지를 선별하기 위하여 액상효소에 각종 안정제를 첨가하여 안정제 효과를 온도별로 검토하여 보았다(Fig. 3). 20°C~40°C에서는 안정제의 효과를 확인할 수 없었다(data not shown). 60°C의 경우에는 안정제를 첨가하여도 1일 후에는 거의 모든 효소가 실활되었다. 그 중에서 50°C에서 확인한 활성의 차이가 있어 보관 온도 50°C에서의 농도별 안정제의 효과를 검토하였다.

대조군으로는 액상효소에 아무런 첨가제를 넣지 않고, 안정성을 증가시키기 위한 첨가제로는 NaCl(2%, 5%, 10%), Glycerol(2%, 5%, 10%), Sorbitol(2 mM, 5 mM, 10 mM), CaCl₂(2 mM, 5 mM, 10 mM) 등의 농도로 첨가하여 온도 안정성을 검토하였다(Fig. 4). 첨가제의 효과는 NaCl과 CaCl₂가 효과적인 첨가제임을 알 수 있었다. NaCl의 경우 농도가 높을수록 효과가 있었고 10%의 농도에서 8일간 보존하여도 약 80%의 잔존활성을 가지고 있어 가장 효과가 좋았다. CaCl₂의 경우 마찬가지로 농도가 증가할수록 효과적이었으며 10 mM의 농도에서 7일간 보존하여도 약 80% 잔존활성을 가지고 있었다. 10% NaCl, 10 mM CaCl₂의 half time은 각각 14일, 11일이었다. Glycerol의 경우에는는 10%의 농도에서는 어느 정도 안정 효과를 확인할 수 있었지만 그 이하의 농도에서는 효과가 없었다.

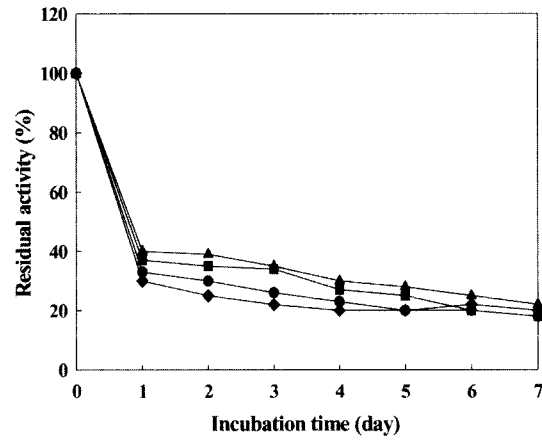
효소의 활성의 유지 여부는 산업적 적용에 매우 중요한



(A) 40°C



(B) 50°C



(C) 60°C

Fig. 3. Effect of stabilizers on stabilization of concentrated endoxylanase solution at different storage temperatures (40°C, 50°C, and 60°C). (A), 40°C; (B), 50°C; (C), 60°C. Symbols : ■, No stabilizer; ▲, 10% NaCl; ◆, 2% Tween-80; ●, 10% Glycerol.

요소인데 특히 온도의 변화는 효소 활성 유지에 많은 영향을 미치므로 열안정성과 온도에 따른 안정성에 영향을 줄 수 있는 여러 가지 첨가제를 이용하는 연구가 이루어지고

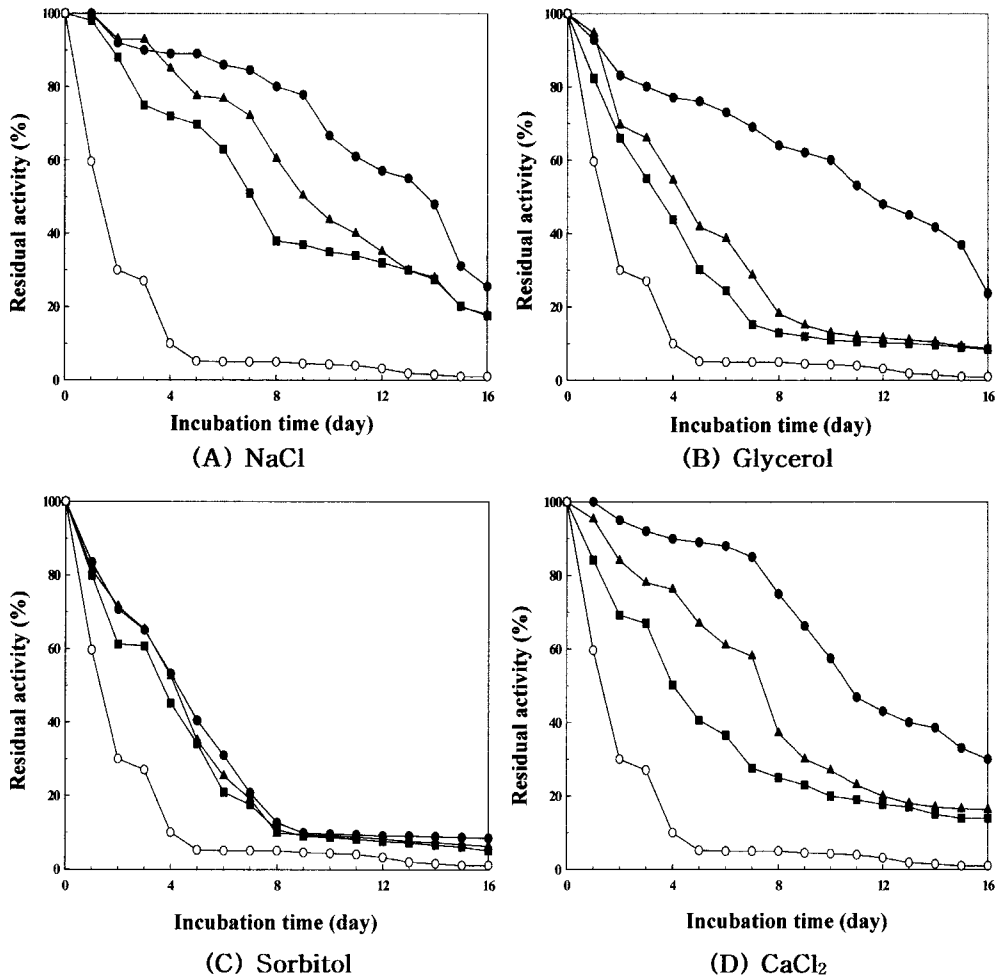


Fig. 4. Effect of stabilizers on stabilization of concentrated endoxylanase solution at 50°C storage temperature. (A) NaCl: ○, 0%; ■, 2%; ▲, 5%; ●, 10%. (B) Glycerol: ○, 0%; ■, 2%; ▲, 5%; ●, 10%. (C) Sorbitol: ○, 0 mM; ■, 2 mM; ▲, 5 mM; ●, 10 mM. (D) CaCl₂: ○, 0 mM; ■, 2 mM; ▲, 5 mM; ●, 10 mM.

있다. 예를 들어, 효소의 기질, 산물, 또는 효소저해제 등이 효소의 열안정성을 높여줄 수 있다[7]. Sugars, polyhydric alcohols과 organic solvent 등의 첨가물이 효소의 열안정성에 영향을 미친다는 보고도 있다[1]. Kim 등[10]은 CaCl₂, NaCl, glycerol 등이 혈전용해효소의 열안정성에 미치는 영향을 조사하였는데, 그 중에서 효과가 우수한 3종의 첨가물을 선발하여 농도별로 조효소액에 첨가하고 60°C에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. NaCl과 glycerol에 의해 열안정성이 증가되었으며, 첨가제의 농도가 증가할수록 열안정성도 증가하였다. 첨가제를 병용하였을 때 glycerol이 효소의 안정성에 큰 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 첨가제가 효소의 안정성을 높여주는 이유는 안정제처럼 단백질분자 내부의 수소성 상호작용을 증가시켜 단백질의 구조를 안정화시키기 때문으로 추측된다[8]. 효소의 안정성은 효소의 수소성, 친수성 특성과 첨가제 종류별 상호작용의 정도에 따라 다른 것으로 추측된다.

요 약

구성적 promoter인 P_{JH} promoter 하류에 연결된 *Bacillus* sp. 유래의 endoxylanase를 *B. subtilis*에서 과발현 하였다. 발현된 plasmid, pJHKJ4는 자체 promoter(P_B)와 *Bacillus*의 강력한 promoter(P_{JH})가 tandem으로 위치하여 transcription 되었다. *B. subtilis* DB431에 형질전환된 균주를 glucose가 함유된 LB 배지에서 배양 후 총활성 및 분비효율은 140 U/ml로 나타났다. 배양상등액은 ultrafiltration(MW cut-off 10 kDa and 30 kDa)과 염석법으로 농축하였다. 효소의 농축에서 ultrafiltration이 70% ammonium sulfate precipitation보다 효과적이었다. 50°C에서 농축된 효소액의 안정화는 NaCl, glycerol, sorbitol, and CaCl₂ 등의 다양한 안정제를 농도별로 첨가하여 안정제의 효과를 검토한 결과, 가장 효과적인 안정제는 NaCl과 CaCl₂이었다.

감사의 글

본 연구는 2003년 중소기업 기술혁신개발사업의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, J. H., J. B. Hwang, and S. H. Kim. 1991. Effect of various additives and solvents on thermostability of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 368-371.
- Bajpai, P. (1999) Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.* **15**: 147-157.
- Bae, S. H. and Y. J. Choi. 1991. Purification and characterization of extracellular xylanase of *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 592-597.
- Bernier R. J., H. Driguez, and M. Desrochers. 1983. Molecular cloning of a *Bacillus subtilis* xylanase gene in *Escherichia coli*. *Gene* **26**: 59-65.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
- Chun, Y. C., K. H. Jung, J. C. Lee, S. H. Park, H. K. Chung, and K. H. Yoon. 1998. Molecular cloning and the nucleotide sequence of a *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 28-33.
- Citri, N. 1973. Conformational adaptability in enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **37**: 397-648.
- George S. P., A. Ahmad, and M. B. 2001. A novel thermostable xylanase from *Thermomonospora* sp.: influence of additives on thermostability. *Bioresour. Technol.* **78**: 221-224.
- Kim, J. H., J. H. Kim, S. C. Kim, and S. W. Nam. 2000. Constitutive overexpression of endoxyylanase gene in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 551-553.
- Kim, S. S., J. H. Lee, Y. S. Ahn, J. H. Kim, and D. K. Kim. 2003. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 isolated from Chungkook-Jang; its characterization and influence of additives on thermostability. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 271-276.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Li, X. L., Z. Q. Zhang, F. D. D. Jeffery, L. E. Karl-Erick and G. L. Lars. 1993. Purification and characterization of a new xylanase (APX-II) from the fungus *Aureobasidium pullulans* Y-2311-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3212-3218.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- 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.
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kahler, and G. Antranikian. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 711-729.
- Panbangred W., T. Kondo., S. Negoro., A. Shimmyo, and H. Okada. 1983. Molecular cloning of the genes for xylan degradation of *Bacillus pumilus* and their expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 335-341.
- Ragauskas, A. J., K. M. Poll, and A. J. Cestermimo. 1994. Effects of xylanase pretreatment procedures on nonchlorine bleaching. *Enzyme Microb. Technol.* **16**: 492-495.
- Shendye A. and M. Rao. 1993. Molecular cloning and expression of xylanases from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* (NCIM 59) in *Bacillus subtilis* A8. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 343-347.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson. A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, and D. C. Klenk, 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**: 76-85.
- Srinivasan, M. C. and M. V. Rele. 1999. Microbial xylanases for paper industry. *Curr. Sci.* **77**: 137-142.
- Sung, C. K., S. W. Lee, S. K. Park, and B. S. Shon. 1996. Purification and characterization of xylanase II from *Aspergillus niger* SFN-416. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24** : 687-692.
- Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sandquist. and M. Linco. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 338-350.
- Whistler, R. L. and E. L. Richard. 1970. Hemicellulose, pp. 447-469. In Pigman W, Horton D (eds.), *The Carbohydrates*, Academic Press, New York.
- 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.
- Wong, K. K. Y., U. L. Larry. and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganism: Functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.
- Ye, R., J. H. Kim., B. G. Kim., S. Szarka., E. Sihota, and S. L. Wong. 1998. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **62**: 87-96.

(Received Oct. 29, 2004/Accepted Nov. 25, 2004)