

***Bacillus stearothermophilus*로부터 Endo-xylanase 유전자의 클로닝 및 *Escherichia coli*에서의 발현**

조쌍구 · 박성수 · 박영인 · 최용진*
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Molecular Cloning and Expression of an Endo-xylanase Gene from *Bacillus stearothermophilus* into *Escherichia coli*

Cho, Ssang-Goo, Sung-Soo Park, Young-In Park and Yong-Jin Choi

*Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources
Korea University, Seoul 136-701, Korea*

Abstract — Genomic DNA of *Bacillus stearothermophilus*, which expressed alkalophilic and thermophilic xylanases, was partially digested with *Hind*III, cloned into pBR322, and subsequently transferred into the *Escherichia coli* HB101 cells. Three among 5,000 transformants screened formed clear zones around their colonies. From the functional clones, three recombinant plasmids (pMG11, pMG12 and pMG13) had been isolated, and they were identified to carry the same 4 kb *Hind*III fragment originated from *B. stearothermophilus* which was responsible for the xylanase activity. pMG13, however, had the foreign DNA of opposite orientation compared to the other two recombinant plasmids. This recombinant plasmid gave much lower xylanase activity. *B. stearothermophilus* was observed to produce at least three xylanase activities as evidenced by the PAGE-xylan zymogram. The xylanase from *E. coli* HB101/pMG12 was judged to correspond to the largest among the three *B. stearothermophilus* xylanases observed in the zymogram. The enzyme hydrolyzed xylo-oligosaccharides larger than xylotriase and degraded xylan to produce xylobiose and xylotriase as major products. The xylanase was considered to have trans-xylosidase activity, too.

Xylan은 그 분포량 또는 생화학적 분해 특성면에서 볼 때 cellulose 못지 않는 중요 biomass 자원의 하나이다(1).

이와같은 xylan의 효과적 활용을 위해서는 xylan의 가수분해법 특히 미생물을 이용한 효율적인 생물학적 분해법의 개발이 무엇보다 앞서 해결되어야 할 과제라고 판단된다.

본 연구실에서는 내열성인 동시에 내알칼리성을 나타내는 몇가지 xylan 분해계 효소를 세포외로 다량 생산하는 균주를 토양으로부터 분리, *Bacillus stearothermophilus*로 동정하고 최적 효소생산조건을 검토하였으며(2), 대표적 endo-xylanase를 분리 정제, 그 특성도 조사하였다(3). 또한, 두가지 서로 다른 β -xy-

losidase 유전자를 분리, *E. coli*에 클로닝하고 클로닝한 β -D-xylosidase 유전자의 특성을 조사 그 결과도 이미 보고하였다(4). 본 연구에서는 *B. stearothermophilus*의 endo-xylanase 활성과 관계된 DNA 단편을 *E. coli*에 클로닝하고 몇가지 일반 성질을 검토하여 그 결과의 일부를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

Endo-xylanase 유전자의 공여균주로는 Choi 등(2)이 토양으로부터 분리한 *Bacillus stearothermophilus*를 사용하였고, *E. coli* HB101(F⁻, *hds*S20, *rec*A13, *ara*14, *pro*A2, *lac*Y1, *gal*L20, *xy*15, *mt*11, *sup*E44)(5)를 숙주세포로, 그리고 plasmid vector로는 pBR322(6), 또는 pUC18(5)를 사용하였다.

Key words: Cloning, endo-xylanase, *B. stearothermophilus*, zymogram, tran-xylosidase activity

*Corresponding author

배지 및 성장조건

B. stearothermophilus 배양은 본 실험실에서 확립한 효소생산 최적 배지(2)를 사용, 45°C에서 진탕배양하였으며 *E. coli*는 LB배지를 사용, 37°C에서 진탕배양하였다. 항생물질은 필요에 따라 ampicillin은 50 µg/ml, tetracycline은 15 µg/ml의 최종농도로 첨가하였다.

사용시약 및 효소

Lysozyme, agarose, RNase, xylose, oat spelt xylan 및 birchwood xylan 등은 Sigma Co., T4 DNA ligase와 각종 제한효소들은 한국제철화학(KOSCO) 또는 New England Biolab(NEB), calf intestinal alkaline phosphatase(CIP) 및 Dig DNA Labelling & Detection Kit는 Boehringer Mannheim(BM), 그리고 Nylon membrane은 Amersham 제품인 Hybond-N⁺를 구입 사용하였으며 기타 일반 시약류는 시판 일급 이상의 분석용을 사용하였다.

또 xylanase의 기질로 사용한 각종 xylo-oligosaccharides는 Mitsush 등의 방법(7)에 따라 xylan를 산 가수분해, Dowex 1×8(Cl form)과 Bio-gel P-2 column chromatography 등의 과정을 거쳐 본 실험실에서 분리 정제한 것을 사용하였다.

Chromosomal DNA와 plasmid의 분리 및 형질전환

Chromosomal DNA는 전보(4)에 상술한 Doi의 방법(8)에 따라 분리 사용하였으며, plasmid는 실험에 따라 CsCl-EtBr equilibrium centrifugation법, PEG 침전방법, 또는 rapid alkaline lysis법 등(9)을 이용하여 분리 정제하였다. 또한 형질전환 실험은 Simanis가 확립한 과정(10)에 따라 실시하였다.

Xylanase clone의 선별

형질전환체의 현탁액을 ampicillin(50 µg/ml)과 oat spelt xylan(0.5%)를 첨가한 LB 한천평판배지(LBX 배지)에 도말하고 37°C에서 18시간 동안 배양하여 직경이 약 1.5 mm 크기의 colony을 얻은 다음, periplasm 효소 분비 증대 내지는 용균을 위해 4°C에서 12시간 동안 cold shock을 주었다가 다시 37°C에서 3시간 배양시키는 과정을 3회 반복 실시하여 xylan 분해에 의한 투명환 형성을 유도하여 선별하였다.

Agarose gel electrophoresis

Gel electrophoresis는 TAE buffer(0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0)를 사용하여 Maniatis 등이 사용한 방법(9)에 따라 실시하였으며, agarose gel상의 DNA 절편은 electro-elution 방법(9), 또는 Gene Clean kit를 사용하여 추출 회수하였다.

Southern blotting

Agarose gel상의 DNA 단편은 capillary blot transfer법(11)에 따라 Hybond-N⁺ membrane으로 옮겼으며 DNA hybridization은 전보(4)에 상술한 과정에 따라 실시하였다. DNA labelling과 detection은 Non-radioactive Dig kit를 이용한 digoxigenin-anti-digoxigenin ELISA 방법(12)에 따랐다.

효소액 조제

형질전환체를 50 ml LBX 배지(ampicillin 첨가)에서 37°C, 24시간 진탕 배양한 후, 28 KHz에서 2분 30초간 초음파 처리(SUH ILL ultrasonic Co. type KLK 150)한 다음, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리(Beckman J2-21, JA20 Rotor)하여 얻은 상등액을 효소활성 측정을 위한 효소액으로 사용하였다(13). 또한, 형질전환체를 100 ml의 동일배지에서 37°C, 13시간 배양한 후, Neu와 Heppel의 방법(14)에 따라 osmotic shock을 가해 얻은 periplasmic 분획을 xylo-oligosaccharide 및 xylan 가수분해용 효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정 및 단백질 정량

2% xylan 인산 완충용액(0.1 M ; pH 7.0)을 약 30초간 vortex mixer에 의하여 혼합한 다음 4°C에서 24시간 방치한 후 12,000 rpm에서 30분 원심분리하여 얻은 상등액을 효소반응의 기질로 사용하였다.

기질용액 0.5 ml을 55°C에서 5분간 예열한 후, 인산 완충용액(0.05 ; pH 7.0)으로 희석한 효소액 0.5 ml을 가하고 30분간 반응시켰다. Xylan 가수분해에 의해 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(15)에 따라 비색정량하였으며, 55°C에서 1분간에 1 µmol의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준단백질로 사용한 Lowry법(16)을 이용하였다.

Zymogram

*B. stearothermophilus*는 45°C, 500 ml의 효소생산 최적 배지에서, *E. coli* HB101 균주는 37°C, 500 ml의

LBX 배지에서 24시간 진탕배양한 다음, 5,000 rpm에서 20분 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 이 상등액을 Amicon YM10 membrane(molecular weight cut-off : 10,000)을 이용, 25배 농축하여 효소단백질 시료로 사용하였다.

상기 단백질 시료를, 2% birchwood xylan 수용액을 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 증류수 대신 사용하여 조제한 5% nondenaturing polyacrylamide gel을 사용 100 V에서 80분 동안 전기영동하여 분리하였다. 전기영동에는 동일한 두 gel을 사용하였으며, 한 gel은 Coomassie blue 염색법(17)으로 단백질 분리에 사용하였고 다른 한 gel은 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)으로 2회 세척한 다음 37°C, 동일 완충용액 중에서 10시간 동안 방치, 효소반응을 진행시켰다. 반응 후, 0.1% Congo red 용액으로 15분간 염색하고 1 M NaCl로 충분히 세척한 후, 5% acetic acid 처리를 하여 효소 활성대를 관찰(18), 단백질대와 비교분석하였다.

Xylo-oligosaccharide 및 xylan 분해생성물의 분석
가수분해 산물은 high-performance liquid chromatography(HPLC)을 이용, 분석하였다. HPLC는 Waters사 제품(Pump ; Model 510, Integrator ; Model 741, Column ; Carbohydrate Analysis Column(3.9×300 mm), Detector ; Differential Refractometer R 401)을 이용하였고, acetonitrile과 water 혼합물(75 : 25 ; v/v)을 mobile phase로 사용, 1.5 ml/min의 속도로 용출시켜 분석하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 유전자의 클로닝

B. stearothermophilus chromosomal DNA를 *Hind*III로 부분 절단하여 분리회수한 3~9 kb의 DNA 단편과, *Hind*III로 완전 절단한 후 CIP 처리한 pBR322 DNA를 ligation시킨 다음, *E. coli* HB101을 형질전환시켜 약 5천개의 형질전환체를 얻었다. 재료 및 방법 항에 상술한 과정에 따라 상기 형질전환체로부터 xylanase clone을 선별한 결과 주위에 뚜렷한 투명환을 형성하는 3개의 colony를 분리할 수 있었다(Fig. 1).

종래 대부분의 연구자들이, 용균을 위해 chloroform vapor와 lysozyme을 처리하거나(19, 20), xylanase에 의한 투명환 관찰을 위해 Congo red로 염색하는(21)



Fig. 1. Clear zone formation by *Bacillus stearothermophilus* and three transformants.

Incubation at 45°C for 7 hours after preincubation at 37°C for 24 hours on LBX medium.

1; *E. coli* HB101/pMG11, 2; *E. coli* HB101/pMG12, 3; *E. coli* HB101/pMG13, B; *Bacillus stearothermophilus*, E; *E. coli* HB101/pBR322

xylanase clone 선별법 등을 이용하였으나, 본 실험에서의 선별법은 다소 긴 시간을 요하나 상기 방법들보다 훨씬 간편하면서도 비교적 정확한 방법인 것으로 평가되었다.

한편, 투명환을 형성한 세 형질전환체로부터 분리한 plasmid(각각 pMG11, pMG12, pMG13라 명명)를 *Hind*III로 절단하여 본 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 세 plasmid 모두가 약 4 kb의 외래 DNA를 가지고 있음을 알 수 있었다. 그러나 pMG11의 경우 pBR322의 band보다 외래 DNA가 훨씬 강한 band를 형성, 보충실험을 해본 결과 pMG11에는 중간부분에 *Hind*III 인식 부위를 지니는 약 8 kb의 외래 DNA가 삽입되어 있다는 것을 확인하였다.

또한, 상기 세 형질전환체가 생산하는 xylanase의 활성은 pMG11과 pMG12를 가지고 있는 균주가 각각 0.938 U/mg과 0.878 U/mg의 비슷한 비활성을 나타내는데 비해 pMG13 균주는 0.503 U/mg의 훨씬 낮은 비활성을 나타내고 있어 pMG11과 pMG12 유전자와는 다른 별개의 xylanase 유전자가 클로닝된 것으로 추측되었으나, 다음 항의 DNA 분석결과로 동일 유전자가 클로닝되어 있음이 밝혀졌다.

재조합 plasmid에 삽입된 외래 DNA의 분석

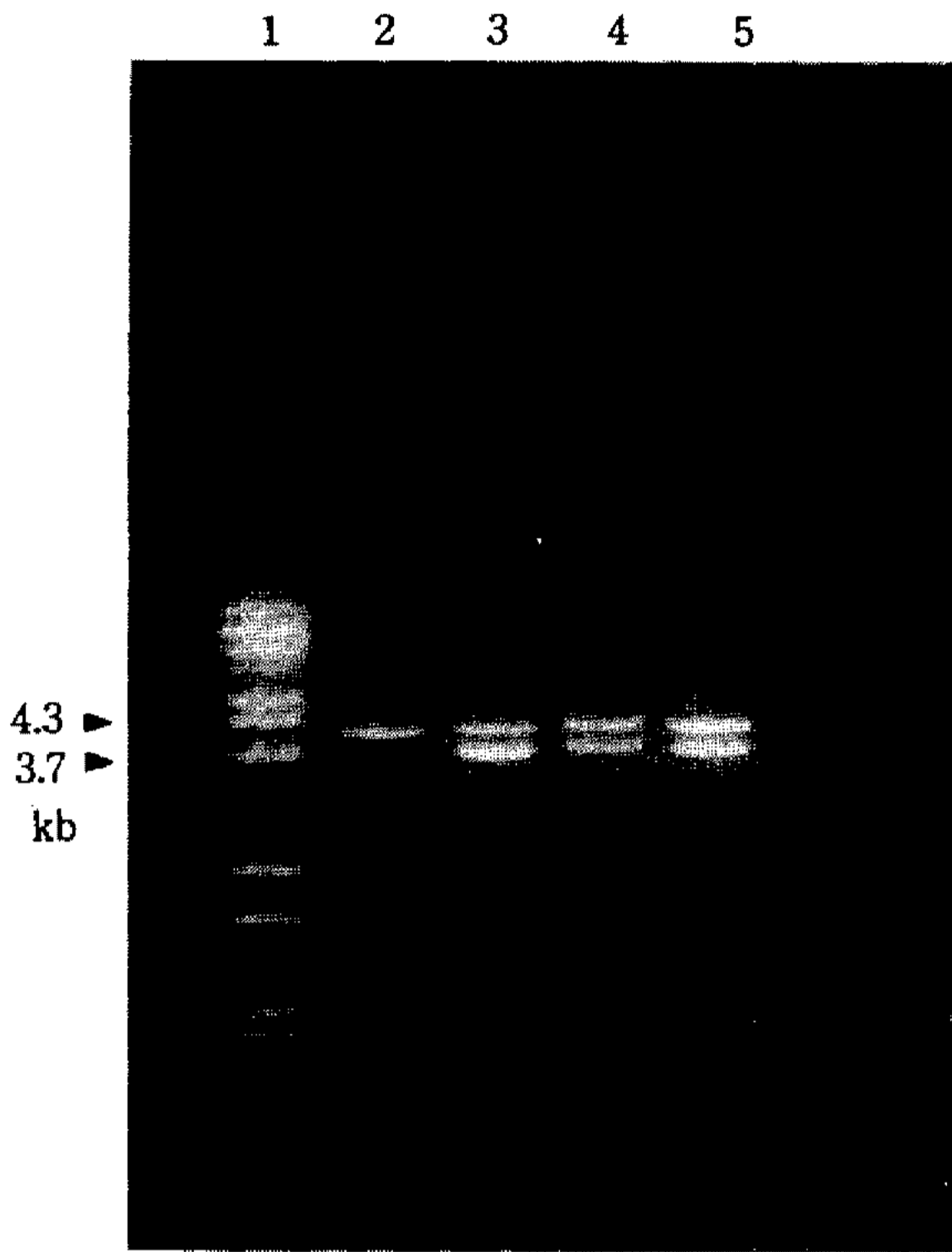


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic pattern of three *HindIII* digests of recombinant plasmids.

Lane 1; *BstEII* digest of λ DNA, lane 2; *HindIII* digest of pBR322, lane 3; *HindIII* digest of pMG11, lane 4; *HindIII* digest of pMG12, lane 5; *HindIII* digest of pMG13

재조합 plasmid의 외래 DNA를 분리 *BamHI*과 *EcoRI*으로 절단한 결과, pMG12와 pMG13 외래 DNA는 두 효소 어느 것으로도 절단되지 않았으나 pMG11 외래 DNA는 두 효소에 의해 4 kb band와 몇개의 보다 작은 크기의 DNA 단편으로 절단됨을 알 수 있었다(Fig. 3(A)).

따라서, 각 재조합 plasmid에서 분리된 상기 4 kb DNA 단편들이 동일한 DNA 단편인지를 확인하기 위해, pMG12에 삽입된 4 kb DNA 단편을 Diglabeling하여 만든 probe와 상기 DNA 단편들을 hybridization시켜 본 결과, 세 plasmid 유래의 4 kb DNA 단편 모두가 다같이 hybridization band를 형성하였다 (Fig. 3(B)). 그러므로 pMG11, pMG12 및 pMG13은 모두 동일한 4 kb 외래 DNA를 함유하고 있으나, pMG11은 상기 4 kb DNA 단편과 xylanase 활성과는 상관없는 크기가 비슷한 DNA 단편을 포함한 전체 약 8 kb의 외래 DNA 단편을 가지고 있는 것으로 확인되었다.

재조합 plasmid의 제한효소 지도

pMG12의 4 kb 외래 DNA는 한개의 *HincII*와 세 개의 *AvaI* 인식부위를 가지고 있으나(Fig. 4) *BamHI*, *Clal*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *Sall*, *SmaI*, *XbaI*,

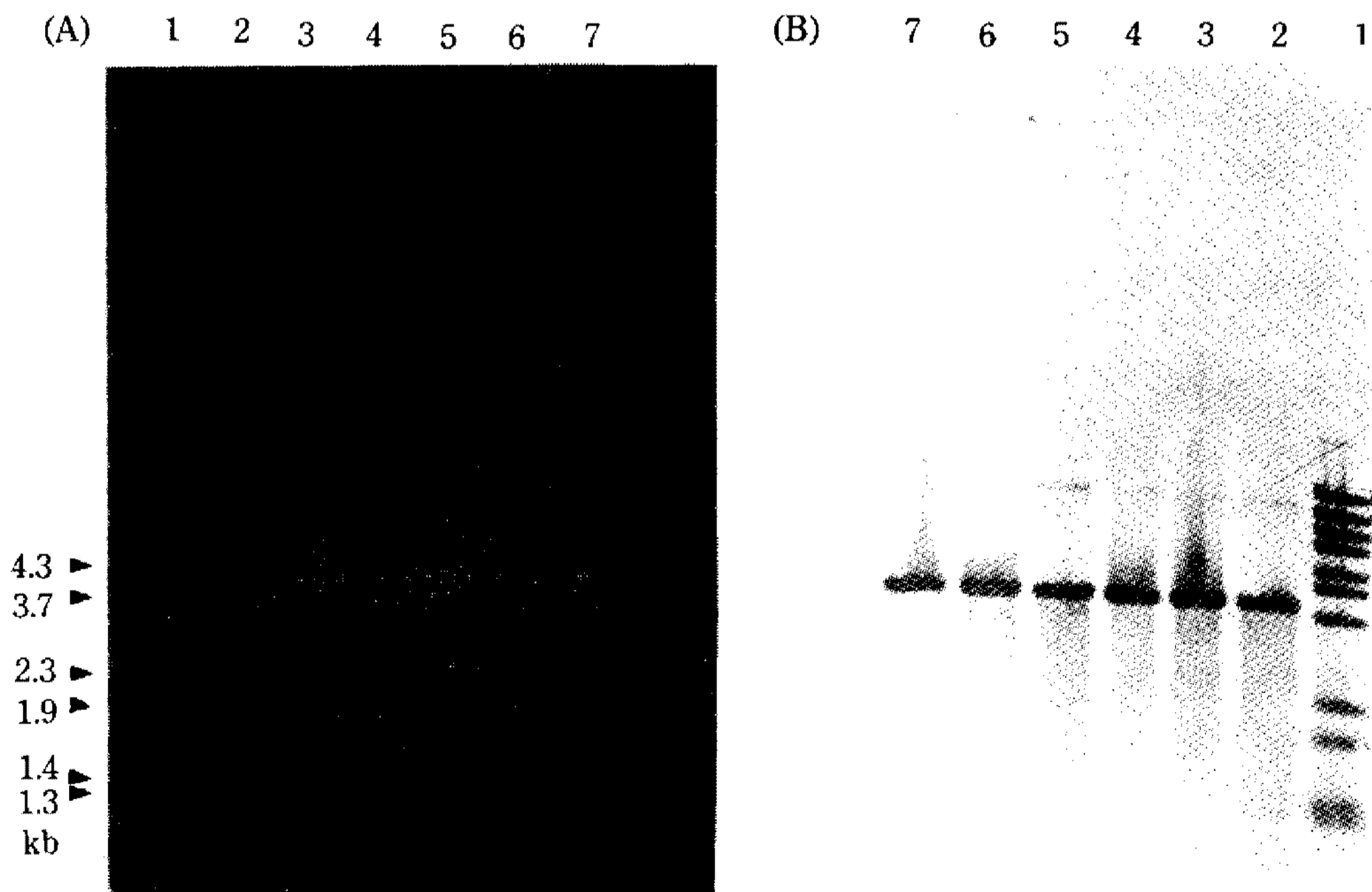


Fig. 3. Southern hybridization of *BamHI* and *EcoRI* digests of pMG11, pMG12 and pMG13 foreign DNAs with random-primed DNA synthesized from the pMG12 foreign DNA.

Lane 1; *BstEII* digest of λ DNA, lane 2; *BamHI* digest of pMG11 foreign DNA, lane 3; *BamHI* digest of pMG12 foreign DNA, lane 4; *BamHI* digest of pMG13 foreign DNA, lane 5; *EcoRI* digest of pMG11 foreign DNA, lane 6; *EcoRI* digest of pMG12 foreign DNA, lane 7; *EcoRI* digest of pMG13 foreign DNA

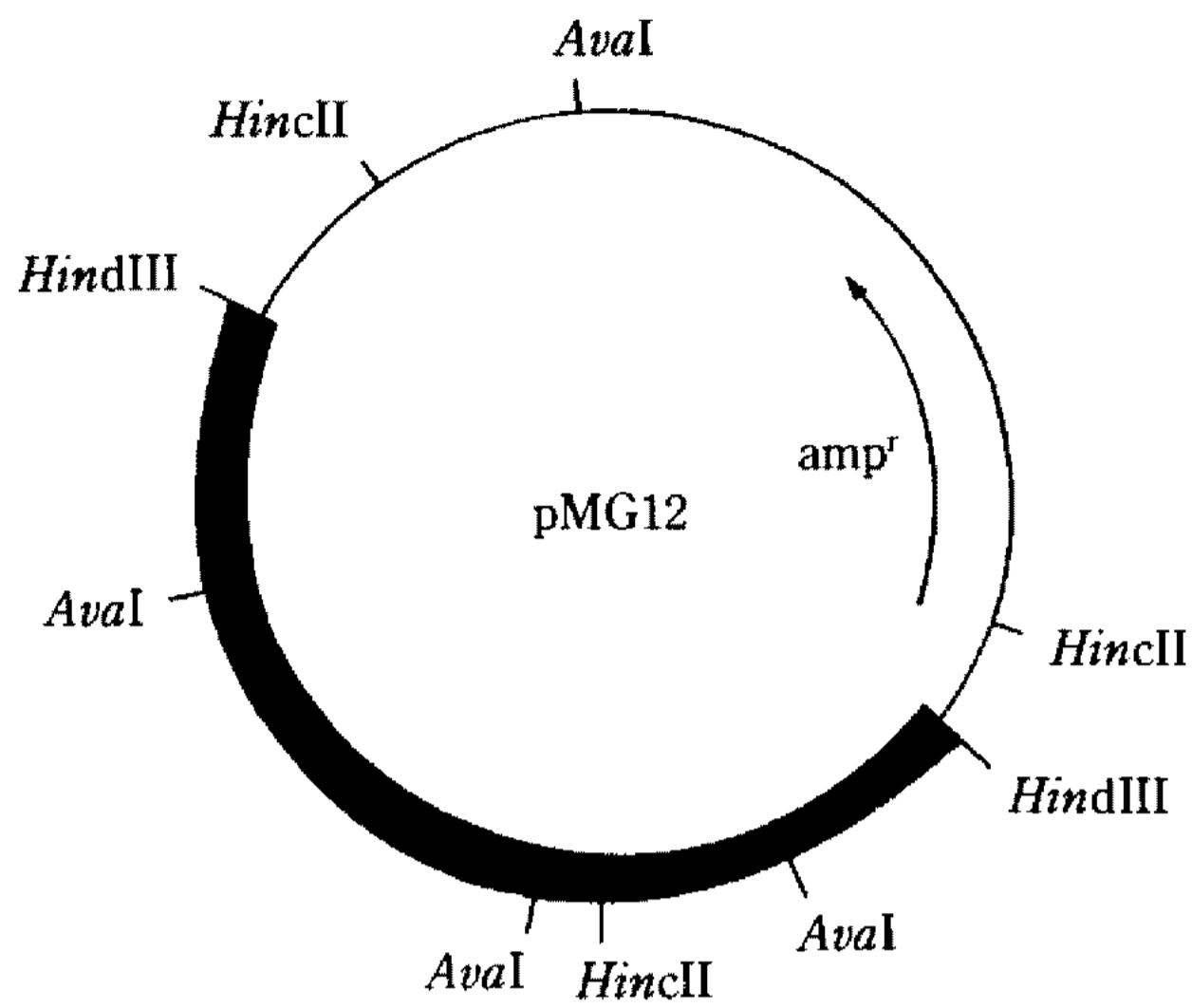


Fig. 4. Restriction map of pMG12.
The thick line represents 4 kb foreign DNA and the thin line indicates pBR322.

*Bgl*II, *Hae*II 등의 6개의 염기로 구성된 인식부위를 가지는 많은 다른 제한효소의 인식부위는 가지고 있지 않는 특이한 염기서열을 가지고 있었다.

또한 pMG12와 pMG13을 *Ava*I, *Hinc*II 및 *Hind*III 등으로 절단, Fig. 5와 같은 결과를 얻었으며, 이 결과로부터 두 plasmid에 삽입된 외래 DNA가 서로 삽입 방향이 반대라는 결론을 얻을 수 있었다. 따라서, 앞에서 언급한 pMG12와 pMG13에 삽입된 xylanase 유전자 발현의 큰 차이는 단지 삽입 방향의 차이에서 유래되었음을 알 수 있었으며 구체적인 원인은 앞으로 계속적인 연구에 의해 밝혀질 예정이다.

Xylanase 유전자의 유래

pMG12에 클로닝된 xylanase 유전자가 *Bacillus stearothermophilus*의 genomic DNA로부터 유래되었는지를 확인하기 위하여 pMG12에 삽입된 4 kb 외래 DNA 단편을 Dig-labeling하여 만든 probe DNA와, *Hind*III로 완전 절단한 *Bacillus stearothermophilus* chromosomal DNA를 hybridization하여 Fig. 6과 같은 결과를 얻었다.

상기 probe DNA는 control로 사용한 pBR322 DNA 단편과는 hybridization하지 않았으나 pMG12와 chromosomal DNA 단편과는 probe와 같은 크기의 위치에 있는 한개의 DNA 단편과 hybridization함을 관찰하였다. 따라서 pMG12에 삽입된 xylanase 활성과 관계된 4 kb의 외래 DNA는 *B. stearothermophilus* genomic DNA 유래 단편임을 확인할 수 있었다.

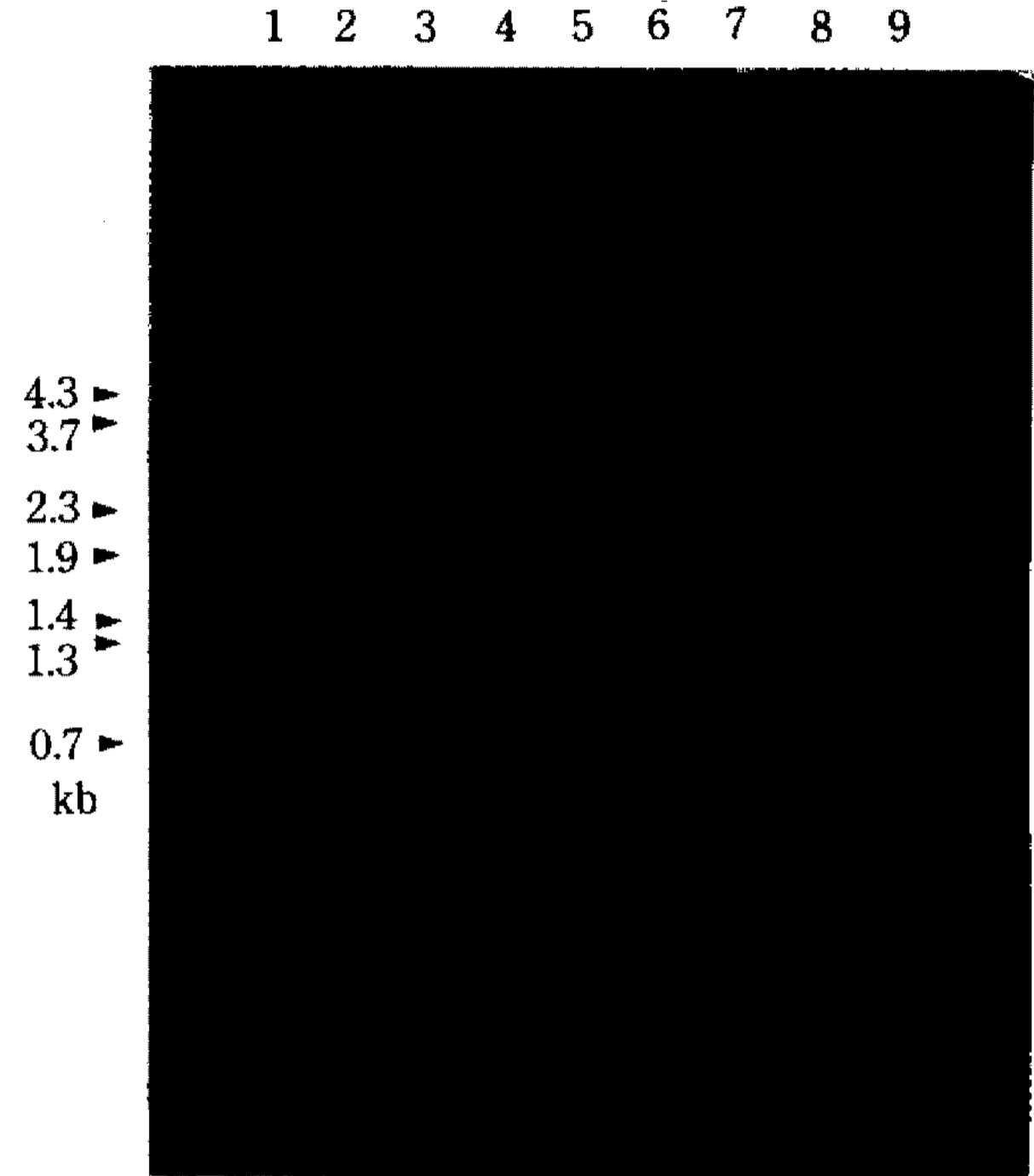


Fig. 5. Agarose gel electrophoretic pattern of *Ava*I and *Hinc*II digests of pMG12 and pMG13.

Lane 1; *Bst*EII digest of λ DNA, lane 2; *Ava*I digest of pMG12, lane 3; *Ava*I digest of pMG13, lane 4; *Ava*I+*Hind*III digest of pMG12, lane 5; *Ava*I+*Hind*III digest of pMG13, lane 6; *Hanc*II digest of pMG12, lane 7; *Hinc*II digest of pMG13, lane 8; *Hinc*II+*Hind*III digest of pMG12, lane 9; *Hinc*II+*Hind*III digest of pMG13

한편, lane 3과 4의 약 4.3 kb 위치에 있는 약한 DNA band는 probe 제작시 불순물 형태로 극소량 혼입, labelling된 pBR322 DNA 단편에 기인되는 것으로 추측된다.

Xylanase 활성대의 분석

*B. stearothermophilus*와 *E. coli* HB101/pMG12 균주가 생산하는 단백질을 nondenaturing polyacrylamide gel을 이용 분리하고(Fig. 7(A)) 이들 분리 단백질의 xylanase 활성을 조사해본 결과(Fig. 7(B)), 대조 균주로 사용한 *E. coli* HB101/pBR322 단백질에서는 xylanase 활성대를 관찰할 수 없었으나 *B. stearothermophilus*에서는 높은 활성의 세 활성대를 관찰할 수 있었으며, *E. coli* HB101/pMG12 균주의 경우는 상기 *B. stearothermophilus*의 세 활성대 중 분자량이 가장 큰 활성대와 거의 같은 위치에서 한개의 xylanase 활성대를 나타내었다. 그러나, 본 실험에서는 두 균주 공히 xylanase 활성과 관계된 gel상의 단백질 분리대의 정확한 위치는 확인할 수

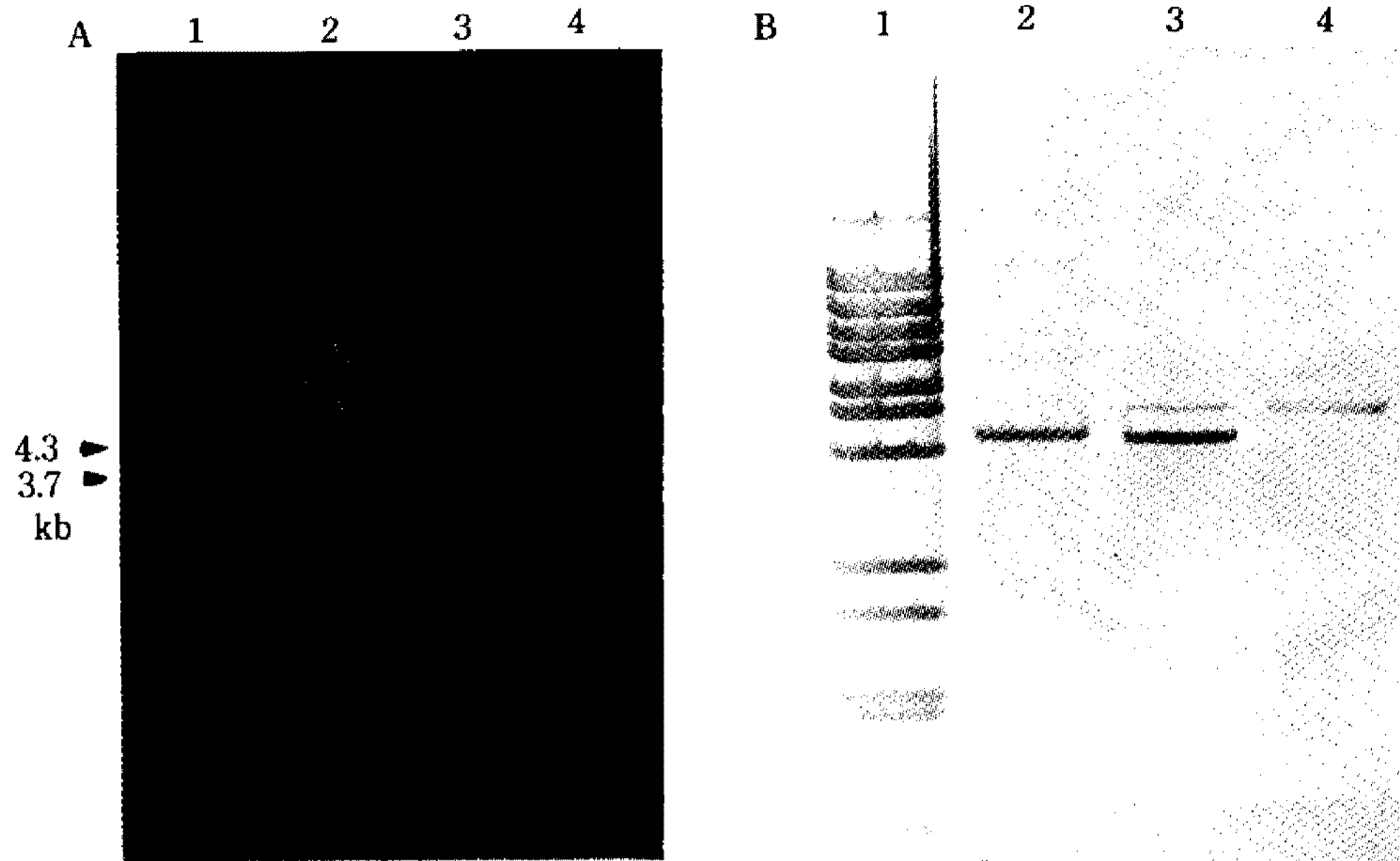


Fig. 6. Southern hybridization of *Hind*III-digested *Bacillus stearothermophilus* chromosomal DNA with the pMG12 foreign DNA. A) agarose gel electrophoresis, B) Southern hybridization.

Lane 1; *Bst*EII digest of λ DNA, lane 2; *Hind*III digest of chromosomal DNA, lane 3; *Hind*III digest of pMG12, lane 4; *Hind*III digest of pBR322

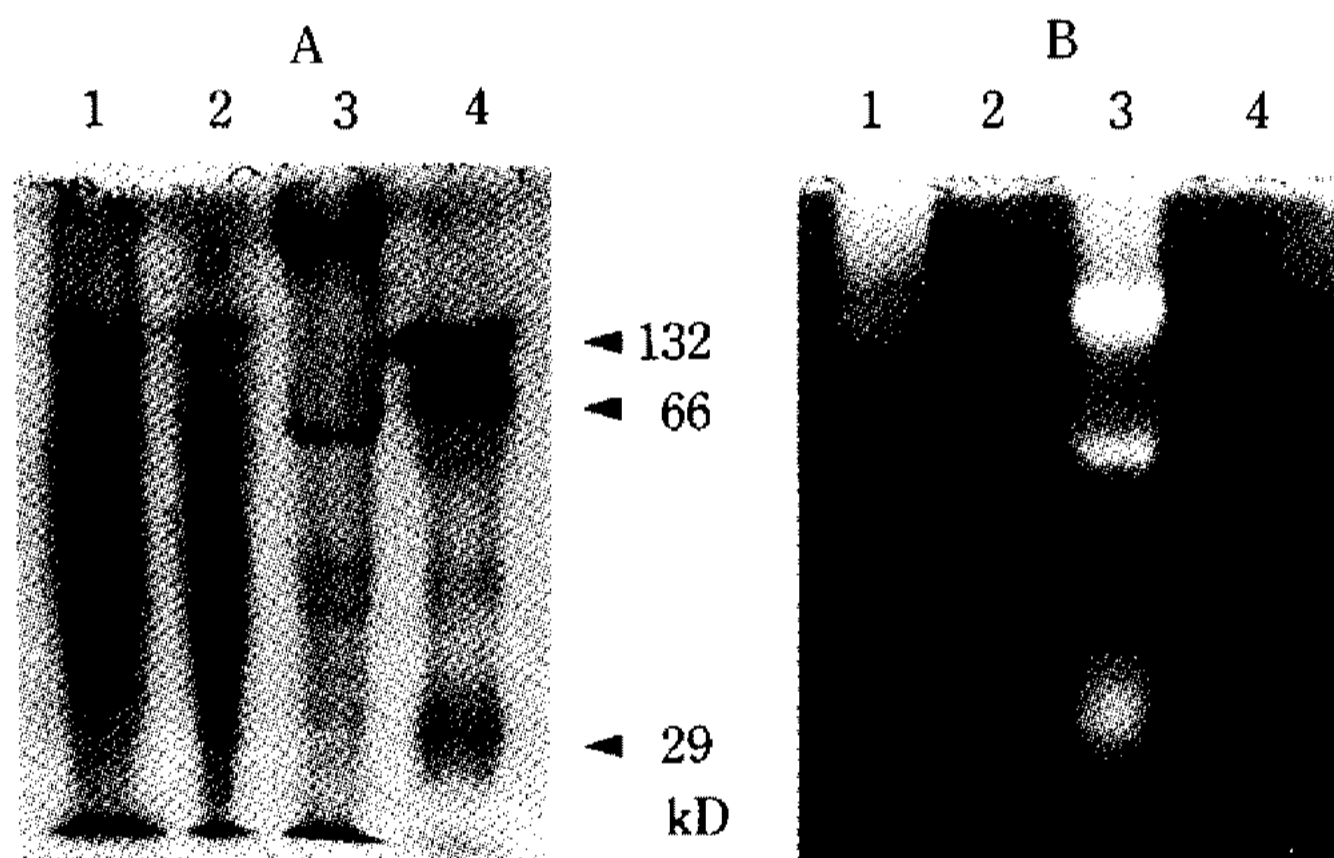


Fig. 7. Zymogram of xylanase from *Bacillus stearothermophilus* and *E. coli* HB101/pMG12. A) protein bands (Coomassie blue staining), B) activity bands (Congo red staining).

Lane 1; *E. coli* HB101/pMG12, lane 2; *E. coli* HB101/pBR322, lane 3; *Bacillus stearothermophilus*, lane 4; nondenaturing MW markers (Sigma), carbonic anhydrase (29 KD), albumin, bovine (monomer; 66 KD, dimer; 132 KD)

없었다.

이상의 *B. stearothermophilus*와 같은 multiple xylanase 현상의 원인은 서로 다른 여러 개의 xylanase 유전자의 존재 혹은 동일 유전자 산물의 posttranslational modification 등으로 설명되고 있다(22-25). 또한 동일 xylanase subunit간, 혹은 xylanase, β -xylosidase 및 α -arabinosidase 등의 서로 다른 효소간의

aggregation에 의해서도 다른 활성대 형성이 가능하리라 생각된다.

그러나, 지금까지의 보고에 의하면 많은 종류의 xylanase 생산 미생물이 서로 다른 여러 종류의 xylan 분해 효소를 생산, 다양한 구조를 지니고 있는 xylan을 효과적으로 분해, 이용하는 것으로 알려져 있으며(23), *B. stearothermophilus* 역시 세개 이상의 xylanase, 두개 이상의 β -xylosidase(4) 등을 생산 xylan을 효과적으로 분해하고 있는 것으로 추측된다.

Xylanase의 기질분해 특성

E. coli HB101/pMG12 xylanase를 사용, *B. stearothermophilus* xylanase의 기질분해 특성을 조사, Fig. 8과 같은 결과를 얻었다. 즉, 본 효소는 xylotriiose보다 중합도가 큰 oligosaccharide 및 xylan에 작용하여 최종 산물로서 xylobiose와 xylotriiose를 생산하며 xylose는 전혀 생산하지 않는 것으로 관찰되었다.

따라서, 본 *B. stearothermophilus* 유래 xylanase는 endo-acting xylanase로 분류할 수 있고, 특히 xylo-tetraose에 작용, 분해산물로서 xylobiose와 xylotriiose를 생산하고 있어 trans-xylosidase 활성도 동시에 가지고 있는 것으로 간주되며, 정확한 작용 기작 규명을 위해 앞으로 계속 연구할 계획이다.

이와같은 trans-xylosidase 활성은 fungi(26), yeast(27), *Bacillus*(28), *Aeromonas*(29) 속의 여러 미생

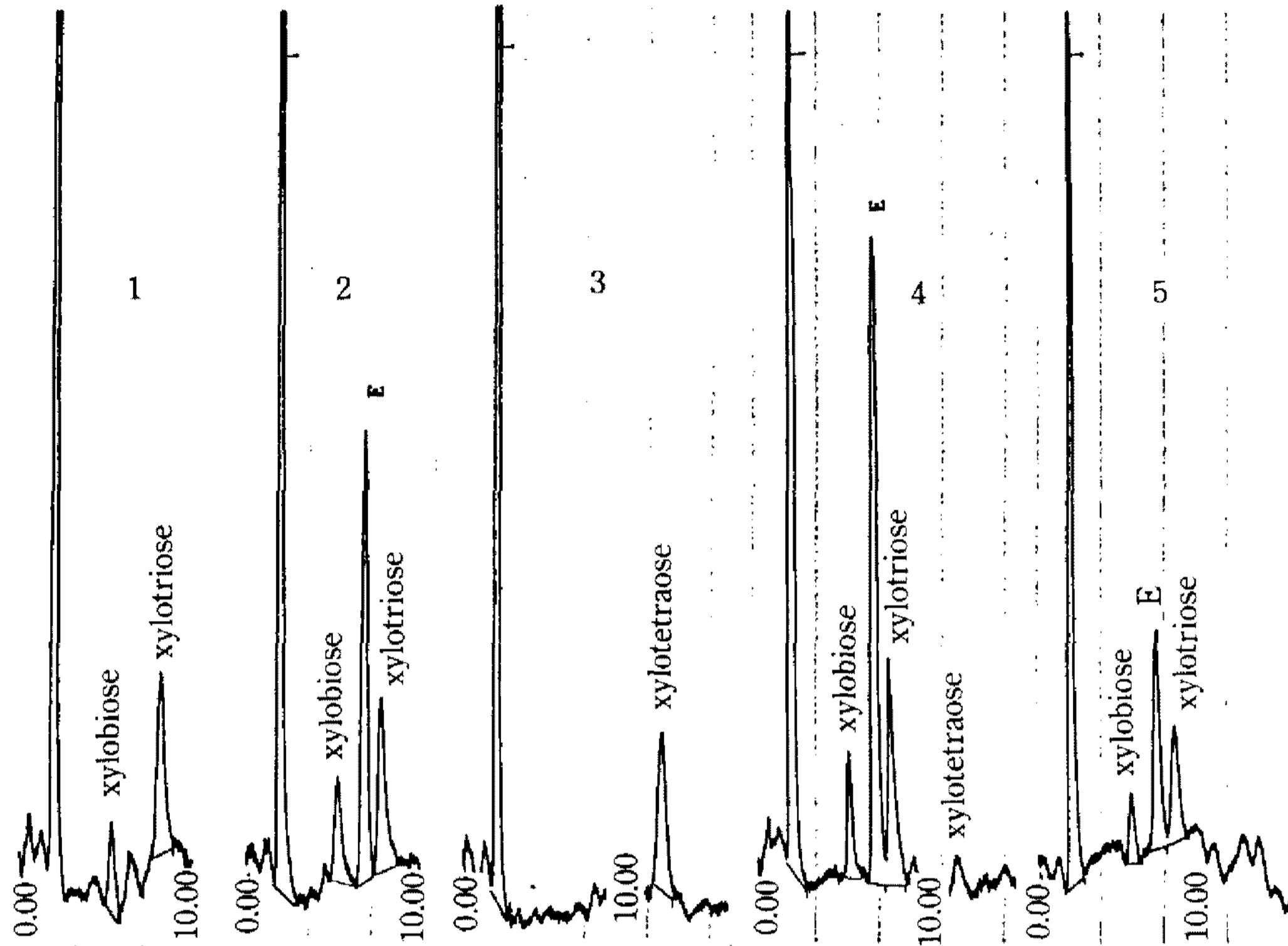


Fig. 8. HPLC Chromatograms of the hydrolysis products of xylo-oligosaccharides and oat spelt xylan. About 10 μ M xylooligosaccharides and 2% oat spelt xylan in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) were hydrolyzed at 37°C for 24 hrs with 10 mU periplasmic xylanase from *E. coli* HB101/pMG12 in total volume 35 μ l. 1. sample 1 (xylobiose + xylotriose), 2. hydrolysate of sample 1, 3. sample 2 (xylo-tetraose), 4. hydrolysate of sample 2, 5. hydrolysate of oat spelt xylan, E. unknown substance in the periplasmic enzyme fraction

물에서도 이미 보고되고 있는 현상이며, 본 실험의 xylanase는 *Aeromonas caviae* xylanase와 유사한 trans-xylosidation 양상을 보이는 것으로 판단되었다. 또한 본 효소는 지금까지 보고되고 있는 많은 다른 xylanase(7, 30-32)와 같이 최종산물로서 xylobiose와 xylotriose만을 생산하므로 β -xylosidase와 함께 사용하면 xylan을 효과적으로 분해, 다량의 xylose를 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

내알카리성 및 내열성 xylanase를 생산하는 토양 분리균인 *Bacillus stearothermophilus*의 chromosomal DNA와 pBR322 plasmid DNA의 *Hind*III 절단 DNA 단편을 ligation시켜 *E. coli* HB101을 형질전환, 약 5천개의 형질전환체를 얻었으며 이들 중에서 세개의 xylanase 양성 형질전환체를 분리하였다. 상기 세 xylanase 양성 형질전환체로부터 분리한 제조합 plasmid(pMG11, pMG12 및 pMG13)는 다같이 xylanase 활성과 관계되는 *B. stearothermophilus* 유래의 동일 4 kb 외래 DNA를 가지고 있었으나, pMG13은 외래

DNA의 삽입 방향만이 다름을 확인하였다.

B. stearothermophilus 균주는 최소한 세개 이상의 xylanase 활성단백질을 생산하는 것으로 관찰되었으며, xylanase 양성 형질전환체는 그 중 분자량이 가장 큰 효소단백질을 생산하는 것으로 판단되었다. 한편, 형질전환체 xylanase는 xylo-tetraose 이상의 xylo-oligosaccharide와 xylan 기질에 작용하여 최종 산물로서 xylobiose와 xylotriose을 생산하는 endo-acting 효소로서, trans-xylosidase 활성도 가지고 있는 것으로 추측되었다.

감사의 말

본 연구는 동력자원부 에너지 관리 공단의 대체에너지 기술개발 사업비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Dekker, R.F.H., and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases, their occurrence, purification, proper-

- ties and applications. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 277-352.
2. Song, H.S., and Y.J. Choi. 1987. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
 3. 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.
 4. Oh, S.W., S.S. Park, Y.I. Park and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus stearothermophilus* β -D-xylosidase gene in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* submitted for publication. **20**: 136-142.
 5. Bolivar, F., and K. Backman. 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* **68**: 245-280.
 6. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 77-81.
 7. Mitsuishi, M., T. Yamanabe, and M. Yagisawa. 1988. The modes of action of three xylanases from mesophilic fungus strain Y-94 on xylooligosaccharides. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 921-927.
 8. Rodriguez, R.L., and R.C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques, An Introduction*. Addison-Wesley Pub.
 9. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 10. Hanahan, D. 1985. Techniques for Transformation of *E. coli*, pp. 109-135. In D.M. Glover (ed.), *DNA Cloning*, Vol. 1, IRL Press, Oxford.
 11. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
 12. Anthony, C.F., and L.M. James. 1985. Non-radioactive hybridization probe prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucl. Acids Res.* **13**: 745-761.
 13. Luthi, E., N.B. Jasmat and P.L. Bergquist. 1990. Xylanase from the extremely thermophilic bacterium *Caldocellum saccharolyticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2677-2683.
 14. Neu, H.C. and L.A. Heppel. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* **240**: 3685-3692.
 15. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 16. Lowry, O.H., N.J. Rasebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 18. Morag, E., E.A. Bayer and R. Lamed. 1990. Relationship of cellulosomal and noncellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose-degrading enzymes. *J. Bacteriol.* **172**: 6098-6105.
 19. Sakka, K., Y. Kojima and K. Yoshikama. 1990. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Clostridium stercorarium* strain F-9 genes related to xylan hydrolysis. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 337-342.
 20. Bernier, R.J., H. Driquez and M. Desrochers. 1983. Molecular cloning of a *Bacillus subtilis* xylanase gene in *Escherichia coli*. *Gene* **26**: 59-65.
 21. Zappe, H., D.T. Jones and D.R. Woods. 1987. Cloning and expression of a xylanase gene from *Clostridium acetobutylicum* P262 in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 57-63.
 22. Dekker, R.F.H. 1985. Biodegradation of the hemicelluloses, pp. 503-533. In T. Higuchi (ed.) *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Academic Press, Orlando.
 23. Wong, K.K.Y., T. Lul and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanases in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.
 24. Gilbert, H.J., Sullivan, D.A., Jenkins, G., Kellet, L.E., Mionton, N.P. and Hall, J. 1988. Molecular cloning of multiple xylanase genes from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 3239-3247.
 25. Yang, R.C.A., C.R. MacKenzie, D. Bilous and S.A. Narang. 1989. Identification of two distinct *Bacillus ciruculans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 568-572.
 26. Gorbacheva, I.V. and N.A. Radionova. 1977. Studies on xylan degrading enzymes. I. Purification and characterization of xylanase from *Aspergillus niger* str. 14 on xylan. *Biochim. Biophys. Acta.* **484**: 79-93.
 27. Nakanishi, K., H. Arai and T. Yasui. 1984. Purification and some properties of xylanase from *Cryptococcus flavus*. *J. Ferment. Technol.* **62**: 361-369.
 28. Panbangred, W., A. Shinmyo, S. Kinoshita and H. Okada. 1983. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 957-963.
 29. Viet, D.N., Y. Kamio, N. Ave, J. Kaneko and K. Izaki. 1991. Purification and Properties of β -1,4-

- xylanase from *Aeromonas caviae* W-61. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 445-449.
30. Nanmori, T., T. Watanabe, R. Shinke, A. Kohno and Y. Kawamura. 1990. Purification and properties of thermostable xylanase and β -xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J. Bacteriol.* **172**: 6669-6672.
31. Berenger, J.f., C. Frixon, J. Bigliardi and N. Creuzet. 1985. Production, purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium sterco-rarium*. *Can. J. Microbiol.* **31**: 635-643.
32. Kitpreechavanich, V., M. Hayashi and S. Nagai. 1984. Purification and properties of endo-1,4- β -xylanase from *Humicola lanuginosa*. *J. Ferment. Technol.* **62**: 415-420.

(Received February 15, 1992)