

대장균 *xylA* 유전자의 구성적 변이주의 분리

소재현 · 노동현 · 이인구

경북대학교 농화학과

Isolation of Constitutive Mutant of *xylA* Gene in *Escherichia coli*

Jae Hyun SOH · Dong Hyun ROH · In Koo RHEE

Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University

Abstracts

In order to isolate a mutant which was constitutively expressed in *xylA* gene, *Pxyl-cat-xylA* fusion gene was constructed by the insertion of *cat* gene between *xylA* promoter and *xylA* structural gene in pEX13 contained *xylA* gene. The expression of *cat* and *xylA* gene from transformants of *xylA* mutant DH77 with plasmid pEXC131 containing *Pxyl-cat-xylA* fusion gene was induced by the addition of 0.4% xylose to media. This results indicated that *cat* and *xylA* gene were expressed under control of *xylA* promoter in the presence of *xylR* gene. We have also isolated constitutive mutant plasmid pEXC131-39 from pEXC131 by treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG). *cat* and *xylA* gene from pEXC131-39 were constitutively expressed without induction of xylose regardless of *xylR* gene. Transformants of *xylR* mutant DH60 with pEXC131-39 also expressed chloramphenicol resistances and xylose isomerase without induction of xylose. This result shows that mutation in region of *xylA* promoter might make it possible to be constitutively expressed.

서 론

목재와 농업폐기물에서 얻어지는 헤미셀룰로스의 가수분해에 의해 생성되는 중요한 당인 xylose(Wilkie, 1979)는 많은 미생물들에 의해 이용되고 있다(Rosenberg, 1980). *Salmonella typhimurium*와 유사한 xylose의 대사경로(Shamanna와 Sanderson, 1979b)를 가지는 대장균은 세포외의 xylose가 xylose permease(*xylT*)에 의해 세포내로 이동된다. 이동된 xy-

lose는 xylose isomerase(*xylA*)에 의해 xylulose로 이성화된 후 xylulokinase(*xylB*)에 의해 xylulose-5-phosphate로 인산화된 다음 오탄당 인산경로를 거쳐서 대사 되어진다.

*S. typhimurium*에서 xylose의 대사에 관여하는 효소 단백질을 코딩하는 *xylT*, *xylA*, *xylB* 유전자 및 이들의 발현을 조절하는 *xylR*(regulatory element)유전자는 염색체 지도상의 78분 위치에 존재하며(Shamanna와 Sanderson, 1979b), 대장균에서는 80분 위치의 *glyS*(glycine-tRNA

synthetase) 유전자에 인접해 있고 하나의 오페론으로 구성되어 있다(Bachmann, 1990).

Shamanna와 Sanderson(1979b)은 *S. typhimurium*의 *xyl* 변이주군을 분리하여 F'*xyl* 플라스미드를 이용한 complementation 실험으로부터 *xylA*, *xylB* 및 *xylT* 유전자가 *xylR* 유전자 산물에 의해 양의 조절(positive regulation)을 받는다는 사실을 보고한 바 있으며, Maleszka(1982)등에 의해 대장균 *xylA* 유전자를 *S. typhimurium*의 *xyl* 변이주에 conjugation 시켜 상보성을 확인함으로써 대장균이 *S. typhimurium*과 같은 양의 조절을 받을 것으로 추측하였다.

xylR 유전자 산물인 조절인자의 작용은 xylose가 존재할 때에는 activator로써 작용하여 *xylR* 유전자 산물이 *xylA*, *xylB*와 *xylT* 유전자의 프로모터 부위에 결합하여 전사를 개시하나, xylose가 없을 때에는 repressor로써 작용할 것으로 추정되고 있다(Shamanna와 Sanderson, 1979b). 대장균에서는 Rosenfeld(1984)가 *S. typhimurium*과 비슷한 양상으로 조절될 것이라고 추정을 하였을 뿐 상세한 연구가 이루어져 있지 않다.

xylR 유전자의 지배하에 양의 조절을 받고 있다면 *xylR* 유전자의 변이는 다상유전자변이(pleiotrophic mutation)이므로 *xylA*, *xylB* 및

xylT 유전자의 변이가 일어나지 않더라도 이들 유전자는 발현되지 않게된다. *Bacillus*와 같이 음의 조절(negative regulation)을 받는 경우에는 repressor를 코드하는 유전자의 변이에 의해 쉽게 구성적 변이주를 얻을 수 있으나 대장균과 같이 양의 조절을 받는 경우 구성적 변이주를 얻는 것은 대단히 어렵게 된다.

그래서 본 연구에서는 대장균에서 *xylA* 유전자의 발현조절 연구의 일환으로 *xylA* 유전자의 프로모터와 구조유전자 사이에 리포터 유전자로 *cat* 구조 유전자를 삽입시킨 융합 유전자를 제작하고 이에 NTG를 처리하여 *xylA* 유전자의 구성적 변이주의 분리를 시도하였다.

材料 및 方法

1. 균주 및 플라스미드

본 실험에 사용된 균주 및 플라스미드는 표 1과 같다. 형질전환 숙주로 대장균 JM109에 NTG를 처리하여 얻은 *xylA* 변이주 DH77 및 *xylR* 변이주 DH60을 사용하였으며 플라스미드는 *xylA* 유전자를 함유한 pEX13, *xylA*의 프로모터에 *cat* 구조 유전자를 융합시킨 pEXC131과 pEXC131에 NTG를 처리하여 얻은 pEXC131-39를 사용하였다.

Table 1. Strains and plasmids used

Strains & plasmids	Relevant properties	Reference
Strains		
<i>E. coli</i>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F[traD36 proAB⁺ lac⁺ lacZ ΔM15]</i>	Yanisch-Perron et al., (1985)
DH 60	<i>xylR</i> ; NTG mutant from JM109	Roh(1992)
DH 77	<i>xylA</i> ; NTG mutant from JM109	Roh(1992)
Plasmids		
pEX13	Ap ^r , Tc ^r , <i>xylA</i>	Rhee(1986)
pEXC131	Ap ^r , Tc ^r , <i>P_{xyl}-cat-xylA</i> fusion gene	This study
pEXC131-39	Ap ^r , Tc ^r , <i>xylA</i> *	This study
pING1622	Ap ^r , Tc ^r , <i>lacZ</i> , <i>cat(ΔP)</i>	Jin(1985)

*xylA** : constitutive mutation in *xylA* gene

2. 배지 및 배양

대장균의 배양은 완전배지인 Luria-broth 배지(이하 LB 배지라 칭함; Bertani and Weigle, 1953)를 사용하였으며, 효소활성측정을 위해서는 LB 배지에 0.4% xylose를 첨가하여 사용하였다.

형질전환주의 선별과 *xylA* 유전자의 구성적 변이주를 선별을 위해서는 LB 평판배지와 MacConkey agar base에 0.2% xylose를 첨가하여 사용하였으며 항생제로는 100 μ g/ml의 ampicillin과 200 μ g/ml의 chloramphenicol을 필요에 따라 첨가하여 사용하였다.

대장균의 배양은 LB 배지에서 18시간 이상 배양한 종배양액을 2% (v/v)되게 접종한 후 37°C에서 160rpm의 속도로 회전 진탕하면서 각 조건에 상응하는 시간동안 배양 하였다. 균의 생육도는 광전비색계(Hitach U-2000)을 사용하여 600nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

3. 플라스미드 DNA의 분리 및 DNA 조작

플라스미드 DNA의 추출은 Birnboim의 방법(1979)에 준하여 행하였으며, 대장균의 형질전환은 Mandel과 Higa의 방법(1970)에 따라 행하였다.

플라스미드 제작을 위한 DNA의 절단은 KOSCO 바이오텍으로 부터 구입한 각 제한효소 및 그에 따른 완충액을 사용하여 1~2 μ g의 DNA를 함유한 20 μ l 반응용액을 최적온도에서 2~3시간 반응시켰다. T₄ DNA polymerase 처리는 제한효소 절단 반응액에 dNTP(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)를 100 μ M되게 첨가하고 T₄ DNA polymerase를 1 μ l(10U) 가하여 12°C에서 20분간 반응시켰다. DNA 단편의 연결은 반응액 10 μ l내에 절단한 벡터 DNA와 삽입 DNA 단편을 1:3의 비로 섞고 5mM ATP 1 μ l와 T₄ DNA ligase 1 μ l(200U)를 잘 혼합하여 22°C에서 16시간 반응시켰다.

4. *xylA* 유전자의 구성적 변이주의 분리

돌연변이체의 처리는 Aldelberg(1965)와

Miller(1972)의 방법을 참고하여 다음과 같이 행하였다. 종배양액을 LB 배지에 1% 되게 접종한 후 37°C에서 중기대수증식기까지인 3시간동안 진탕배양한 다음 원심집균하여 100mM citrate 완충액(pH 5.5)로 2회 세척하고 동일 완충액에 현탁시켰다. 이 균체현탁액에 NTG를 최종농도가 100 μ g/ml되게 첨가하여 37°C에서 20분간 처리한 후 원심분리하여 100mM 인산 완충액(pH 7.0)로 2회 세척한 다음 0.5%의 glucose를 첨가한 DM 배지에 현탁시켜 37°C에서 2시간 진탕배양 하였다. 이것을 다시 원심집균하여 100mM 인산 완충액(pH 7.0)로 세척한 다음 동일 완충액에 현탁시켜 200 μ g/ml의 chloramphenicol이 들어있는 LB 평판배지에 도말하여 37°C에서 20시간 배양하여 형성된 콜로니를 *xylA* 유전자의 구성적 변이주로 분리하였다.

5. Xylose isomerase의 활성측정

Xylose isomerase 활성측정을 위하여 0.4% xylose를 첨가한 LB 배지에 종배양액을 1%되게 접종하여 37°C에서 각 조건에 알맞은 시간동안 배양한 후 배양액 1ml을 원심집균하여 100mM Tris-maleate 완충액(pH 7.5)으로 2회 세척하여 동일 완충액에 현탁시켜놓고, 배양액의 흡광도를 600nm에서 측정해 두었다. 이 균체현탁액에 40 μ l/ml의 농도로 toluene을 가한 후 25초간 vortex mixer로 진탕한 것을 toluene 처리균체로 하여 xylose isomerase활성의 측정에 사용하였다.

효소활성측정은 50 μ mol Tris-maleate 완충액(pH 7.5), 1 μ mol MnCl₂, 10 μ mol xylose 및 1 μ mol MgCl₂을 함유한 0.7ml의 반응액에 상기의 toluene 처리균체현탁액 0.5ml을 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 100 μ l를 다른 시험관에 옮겨 Dische(1951)의 cysteine-carbazole 법으로 생성된 xylulose를 흡광도 540nm에서 정량하였다. 효소의 활성단위(unit)은 건조균체 1mg이 1분간에 1 μ mol의 xylose를 xylulose로 이성화 시킬 수 있는 효소량으로 나타내었다.

결과 및 고찰

1. *Pxyl-cat-xylA* 융합 유전자의 제작

xylA 유전자가 구성적으로 발현하는지를 확인하여 분리하기 위해 *xylA* 프로모터 하류에 리포터 유전자로 *cat* 구조 유전자를 융합한 플라스미드 pEXC131를 다음과 같이 제작하였다. pEX13의 *xylA* 유전자내 Shine-Dalgarno 서열 앞 부위에 있는 Sst II 부위를 절단하여 T₄

DNA polymerase를 처리하여 평활말단으로 만든 후, self-ligation을 방지하기 위해 alkaline phosphatase 처리로 인산기를 제거하였다. 한편 플라스미드 pINJ1622(Jin, 1985)의 Shine-Dalgrano 서열을 포함하는 *cat* 구조 유전자부위를 Sma I으로 처리하여 분리한 후 앞서 조제한 pEX13의 Sst II 단편내 *xylA* 구조 유전자와 전사방향이 일치하도록 삽입하여 제작하였다(그림 1).

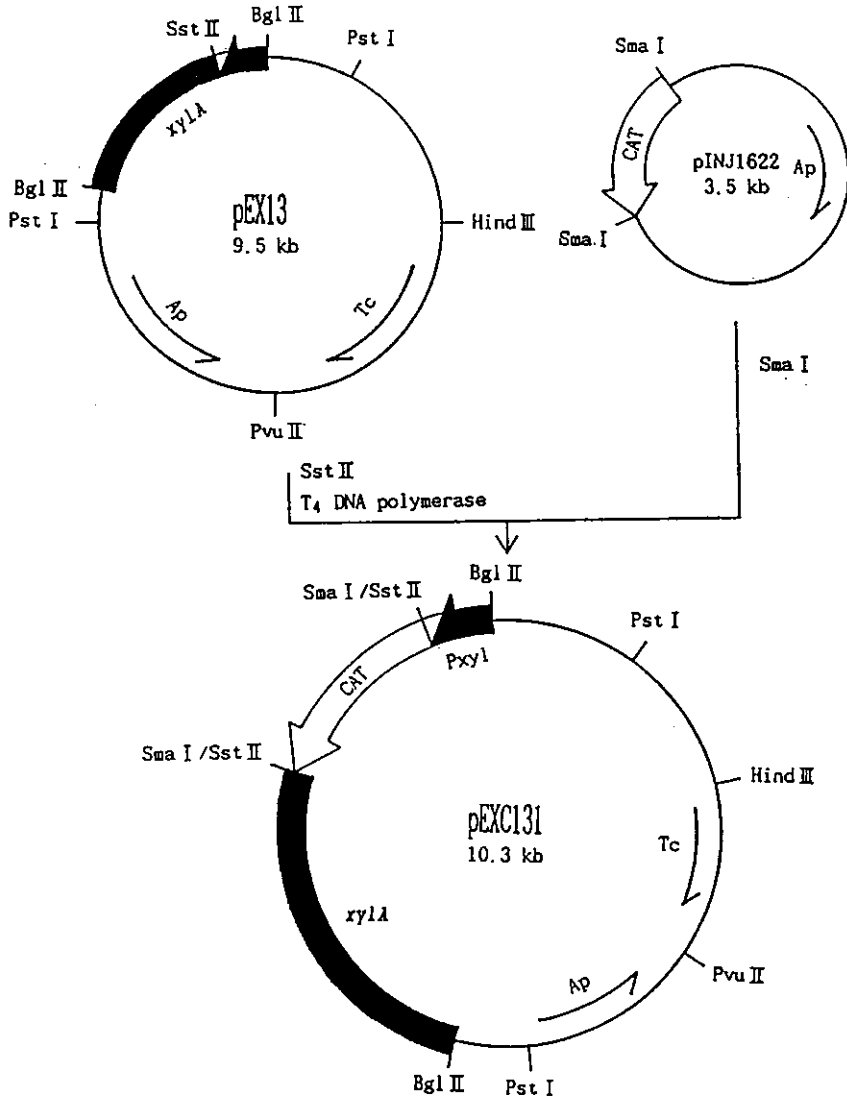


Fig. 1. Construction and physical map of plasmid pEXC131

2. *Pxyl-cat-xylA* 융합 유전자에서 CAT의 발현

xylA 변이주인 DH77에 pEXC131을 형질전환시킨 pEXC131/DH77에서 xylose로 유도시켜 chloramphenicol(Cm)에 대한 내성이 증가하는지를 조사하였다. Cm을 ml당 50 μ g에서 500 μ g의 농도별로 첨가한 LB 배지에 0.4% xylose를 넣은 것과 넣지않은 각 조건하에서 pEXC131/DH77를 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 배양한 후 균의 생육도를 조사하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 xylose를 가하지 않은 배지에서 Cm의 농도가 높아질수록 균의 생육이 낮아 졌으나 xylose를 첨가한 경우에는 500 μ g/ml농도에서도 균의 생육이 저해를 받지 않았다. 이러한 결과는 *xylA* 프로모터 하류에 연결된 *cat* 유전자가 xylose에 의해 유도발현된 것으로 생각되며 이때 *cat* 유전자의 발현은 *xylA* 프로모터에서 조절을 받게되는 것으로 생각된다.

3. *Pxyl-cat-xylA* 융합 유전자에서 xylose isomerase의 발현

플라스미드 pEXC131은 *xylA* 프로모터와 구조 유전자 사이에 *cat* 구조 유전자가 삽입되어 있고 *xylA* 프로모터에 의해 CAT(chloramphenicol acetyltransferase)가 발현되었다. pEXC131/DH77에서 *cat* 유전자 하류에 위치하는 *xylA* 구조 유전자가 xylose의 유도하에서 발현되는지 알아보기 위하여 LB 배지에 0.4% xylose를 첨가하여 xylose isomerase활성을 조사한 결과 표 3과 같았다. 즉 xylose 유도에 의해 xylose isomerase가 발현되었으며 *xylA* 변이주 DH77에서는 유도 발현되지 않았다. 이러한 결과는 *Pxyl-cat-xylA* 융합 유전자에서 *xylA* 유전자의 프로모터와 구조 유전자 사이에 *cat* 구조 유전자의 삽입으로 *xylA* 구조 유전자가 불활성화 되지 않았으며 *cat* 유전자와 같이 *xylA* 프로모터의 지배하에 있다는 것을 나타낸다.

Table 2. Expression of CAT in LB media supplemented with or without xylose from *E. coli* DH77(*xylA* mutant) transformed with plasmid pEXC131

Conc. of chloramphenicol (μ g/ml)	Growth(A_{600nm})* in LB supplemented	
	without 0.4% xylose	with 0.4% xylose
0	1.56	1.57
50	1.28	1.53
100	1.04	1.52
200	0.80	1.61
300	0.63	1.45
500	0.24	1.58

* Bacteria were grown at 37 $^{\circ}$ C for 3 hour.

Table 3. Expression of *xylA* gene by the induction with xylose from *E. coli* DH77(*xylA* mutant) transformed with plasmid pEXC131

Strains*	Xylose isomerase (μ mol/mg)	
	Uniduced	Induced
DH77	0.06	0.02
pEXC131/DH77	0.13	2.56

* After bacteria were grown in LB media for 1.5 hours, 0.4% xylose were added to culture broth. The culture broth was incubated at 37 $^{\circ}$ C for additional 1.5 hours.

4. *xylA* 유전자의 구성적 변이주의 분리

1) pEXC131/DH77의 chloramphenicol 내성도

pEXC131/DH77형질전환주에서 *xylA* 유전자의 구성적 변이주 분리를 위한 Cm의 최적 농도조건을 찾기 위하여 xylose를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 Cm을 농도별로 넣어서 40시간 배양하여 내성을 나타내는 콜로니 수를 헤아린 결과 표 4와 같았다. Xylose를 첨가하여 유도시켰을 때는 500 μ g/ml 농도의 Cm에서도 콜로니를 형성하였다. 이에 반하여 xylose로 유도하지 않아도 150 μ g/ml 농도의 Cm이 함유된 배지에서 20시간 배양후에는 콜로니가 형성되었다. 그러나 200 μ g/ml이상의 Cm이 함유된 배지에서는 전혀 콜로니가 형성되지 않았으므로 이후의 변이주 분리에는 200 μ g/ml의 Cm이 함유된 배지를 사용하였다.

2) NTG 처리에 의한 *xylA* 유전자의 구성적 변이주의 분리

pEXC131/DH77에 NTG를 처리한 후 xylose를 첨가 유도하지 않은 200 μ g/ml의 Cm이 함유된 LB 평판배지에서 콜로니를 형성하는 변이주를 분리하였다. 이렇게 분리된 여러 변이주들을 다시 xylose가 첨가되지 않고 200 μ g/ml Cm이 함유된 LB 평판배지에 희석을 그어 생육이 왕성한 변이주를 취하여 이들 변이주들

의 xylose isomerase 활성도를 xylose로 유도와 비유도 조건에서 측정한 결과 표 5와 같았다. 이중 유도와 비유도 조건에서 xylose isomerase 활성이 높을 뿐만 아니라 효소활성이 가장 비슷한 플라스미드 pEXC131-39/DH77를 *xylA*의 구성적인 변이주로 선발하였다. 이 변이주의 플라스미드를 분리하여 제한효소를 처리하여 확인한 결과 pEXC131과 같은 크기의 단편이었다.

3) *xylA* 유전자의 구성적 변이주의 변이부위의 추정

xylA 유전자의 구성적 변이는 두가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째는 조절인자인 *xylR* 유전자의 변이에 의해 *xylR* 유전자의 산물이 변형되어 xylose의 유도와 관계없이 변형된 산물이 *xylA* 유전자의 activator로 작용하는 경우이다. 둘째는 *xylA* 유전자의 프로모터 부위의 변형으로 인하여 조절인자인 *xylR* 유전자의 산물에 관계없이 항상 발현되는 경우를 생각할 수 있다.

이 두 경우중 어디에 속하는지를 알아보기 위하여 플라스미드 pEXC131-39를 추출하여 DH77으로 재형질전환시켜 xylose isomerase 활성을 측정한 결과 표 6에서 보는 바와 같이 pEXC131-39으로 DH77를 재형질전환시킨 균주에서도 역시 xylose isomerase의 활성이

Table 4. Chloramphenicol resistance of *E. coli* DH77(*xylA* mutant) transformed with plasmid pEXC131 on LB agar plate supplemented with or without xylose

Conc. of Cm (μ g/ml)	Number of colony on LB plates supplemented*	
	without	with 0.2% Xylose
0	1000	TM**
50	800	570
100	100	570
150	100	630
200	None**	660
300	None	320
400	None	160
500	None	90

* The colonies were counted after bacteria were grown at 37°C for 40 hours.

** TM and None represent too many colonies and no detectable Cm resistance colonies, respectively.

Table 5. Expression of *xylA* gene in *xylA* constitutive mutants.

Strains*	xylose isomerase ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	
	uninduced	induced
DH77	0.01	0.01
pEXC131/DH77	0.73	2.01
pEXC131-3/DH77	0.91	2.42
pEXC131-9/DH77	1.75	3.23
pEXC131-28/DH77	0.79	0.96
pEXC131-39/DH77	2.35	2.58
pEXC131-40/DH77	1.33	3.26

* After bacteria were grown in LB media for 1.5 hours, 0.4% xylose were added to culture broth. The culture broth was incubated at 37°C for additional 1.5 hours.

Table 6. Expression of *xylA* gene in *E. coli* DH77(*xylA* mutant) retransformed with plasmid pEXC131-39

Strains*	xylose isomerase ($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	
	uninduced	induced
DH77	0.01	0.01
DH60	0.01	0.01
pEXC131/DH77	0.41	1.82
pEXC131-39/DH77	2.53	2.52
pEXC131-39/DH60	2.27	2.46

* After bacteria were grown in LB media for 1.5 hours, 0.4% xylose were added to culture broth. The culture broth was incubated at 37°C for additional 1.5 hours.

xylose의 유도 없이도 구성적으로 나타난 반면 pEXC131로 형질전환시킨 균주에서는 유도를 시켰을 경우에만 xylose isomerase 활성이 나타났다. pEXC131-39의 형질전환 숙주세포로 *xylR* 변이주인 DH60을 사용했을 경우 (pEXC131-39/DH60)에도 전자와 마찬가지로 구성적으로 발현하였다(표 6).

pEXC131/DH77와 pEXC131-39/DH77 및 *xylR* 유전자의 손상으로 인해 *xylR* 유전자의 산물을 만들어 낼 수 없는 *xylR* 변이주인 DH60에 pEXC131-39를 형질전환시킨 pEXC131-39/DH60을 LB 배지에서의 Cm 내성을 조사한 결과 표 7과 같았다. 그 결과 pEXC131/DH77은

xylose유도시에만 Cm 내성을 나타낸 반면 pEXC131-39/DH77은 xylose의 유도와 관계없이 Cm 내성을 나타내었다. pEXC131/DH60 역시 xylose에 의한 유도에 관계없이 Cm의 내성을 나타냈다. 이러한 사실은 *xylR* 유전자 산물이 *xylA* 프로모터에 상호작용을 하지 못하는데도 불구하고 *cat* 유전자와 *xylA* 유전자가 구성적으로 발현되는 것을 의미하는 것으로, 플라스미드 pEXC131-39에서는 *xylA* 유전자의 프로모터부위의 변형으로 인하여 조절인자인 *xylR* 유전자의 산물에 관계없이 항상 발현되는 것으로 생각되어 진다. 변형된 *xylA* 프로모터의 염기배열에 대한 분석은 계속 연구중에 있다.

Table 7. Expression of CAT in LB media supplemented with or without xylose from *E. coli* DH77(*xyIA* mutant) and DH60(*xyIR* mutant) transformed with plasmid pEXC131 and pEXC131-39

Strains	Growth(A_{600nm})* in Cm media	
	uninduced	induced
DH60	0.004	0.006
pEXC131/DH77	0.000	1.509
pEXC131-39/DH60	1.530	1.591
pEXC131-39/DH77	1.532	1.613

* After bacteria were grown in LB media at 37°C for 4 hours, 0.4% xylose were added to culture broth, which contained 200µg/ml chloramphenicol.

적 요

xyIA 유전자의 발현에 관한 *xyIR* 유전자의 조절 메커니즘을 밝히기 위한 연구의 일환으로 *xyIA* 프로모터 하류에 *cat* 유전자를 삽입시켜 *P_{xyI}-cat-xyIA* 융합 플라스미드인 pEXC131을 제작하였고 이 플라스미드를 *xyIA* 변이주인 DH77로 형질전환시킨 결과 xylose의 유도시에만 Cm 내성과 xylose isomerase활성이 나타났다.

pEXC131/DH77에 NTG를 처리하여 xylose 유도없이도 Cm 내성과 xylose isomerase의 활성을 나타내는 *xyIA* 유전자의 구성적 변이주인 pEXC131-39/DH77을 분리하였으며, 이 플라스미드 pEXC131-39를 *xyIR* 변이주인 DH60으로 형질전환시킨 균주가 xylose에 의한 유도와 무관하게 Cm 내성 및 xylose isomerase 활성을 가지는 것으로 보아 *xyIA* 유전자의 프로모터 부위의 변이에 의한 구성적 변이주임을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Adelberg, E. A., M. Mandel, and G. C. C. Chen. 1965. Optimal condition for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *E. coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18:788-795.
2. Bachmann, B. J. 1990. Linkage map of *E. coli* K-12, 8ed. *Microbiol. Rev.*, 54:130-197.
3. Bertani, G., and J. J. Weigle. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J.*

Bacteriol., 65:113.

4. Birnboim, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acid Res.*, 7:1513-1523. 1979.
5. Dische, Z., and E. Borenfreund. 1951. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.* 192:583-587.
6. Jin, I. N. 1985. Gene expression in *E. coli*: Various modification and application of the Tn-9 derived *cat* gene in *E. coli*. A thesis for the degree of doctor of Agriculture at Tokyo University.
7. Maleszka, T., P. Y. T. Wang, and H. Schneider. 1982. A ColE1 hybrid plasmid containing *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. *Can. J. Biochem.*, 60:144-151.
8. Mandel, M., and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, 53:159-162.
9. Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., pp. 125-129.
10. Rhee, I. K., H. D. Park, S. C. Bae, W. C. Park, J. K. Jo, and J. H. Seu. 1986. Recent progress in molecular biology and genetics engineering of Korea. The Institute for Molecular Biology & Genetics. Seoul National University, Seoul. p. 139.
11. Roh, D. H. and I. K. Rhee. 1992. Isolation

- and characterization of *xylR/T* mutants in *Escherichia coli*. Agric. Res. Bull. Kyungpook Natl. Univ. 10:125-135.
12. Rosenberg, S. L. 1980. Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. Enzyme Microbiol. Technol., 2:185-193.
 13. Rosenfeld, S. A., P. E. Stevis and N. W. Y. Ho. 1984. Cloning and characterization of the *xyl* genes from *E. coli*. Mol. Gen. Genet., 194: 410-415.
 14. Shamanna, D. K., and K. E. Sanderson. 1979b. Genetics and regulation of D-xylose utilization in *S. typhimurium* LT2. J. Bacteriol., 139:71-79.
 15. Wilkie, K. C. B. 1979. The hemicellulose of grasses and cereals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 36:215-264.
 16. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains; Nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33: 103-119.