

고온 알칼리성 *Bacillus* sp. F204의 Cellulase 유전자의 *Escherichia coli* 및 *Bacillus subtilis*에의 Cloning 및 발현

정영철 · 김양우 · 강신권 · 노종수 · 박재현 · 성낙계
경상대학교 식품공학과

Cloning of Thermophilic Alkalophilic *Bacillus* sp. F204 Cellulase Gene and Its Expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Young-Chul Chung, Yang-Woo Kim, Shin-Kwon Kang,
Jong-Su Rho, Jae-Hyeon Park and Nack-Kie Sung

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

Abstract

Cellulase genes from thermophilic alkalophilic *Bacillus* sp. F204 a potent cellulase complex-producing bacterium, were cloned in *Escherichia coli* with pUC 19. Plasmids pBC191 and pBC192, isolated from transformants forming yellow zone around colony on the LB agar plate containing 0.5% carboxymethyl cellulose and ampicillin, contained 4.6 Kb and 5.8 Kb *Hind*III fragments, respectively. The 4.6 Kb insert of pBC191 had single sites for *Bam*HI *Eco*RI, *Kpn*I and *Pvu*II. DNA hybridization and immunodiffusion studies showed that pBC191-encoded cellulase gene was homologous with that of host strain. pKC231, constructed by inserting 4.6 Kb insert of pBC191 at the *Hind*III site of pKK223-3, *E. coli* expression vector, and pGC711, constructed by inserting 4.6 Kb insert of pBC191 at the *Hind*III site of pGR71, *E. coli* and *B. subtilis* shuttle vector, had 3.2 times and 2.8 times as much cellulase activity as pBC191, respectively. Substrate specificity analysis showed that cellulases cloned were CMCase.

Key words : *Bacillus* sp., cellulase gene, cloning, expression

서 론

Cellulase는 섬유성 물질의 효소분해산물인 glucose, xylose 또는 oligosaccharide로부터 유용성 물질의 생산을 위한 산업적인면 이외에도 3개의 효소로 구성된 복합적효소이며 또한 그 작용양식의 특이성 때문에 학문적으로도 중요한 의미를 갖고 있다. Cellulase는 복합효소 체계로서 이들의 상호 상승작용에 의하여 cellulose가 가수분해 된다고 일반적으로 알려져 있으며, 이들 복합효소 중 endo- β -1, 4-glucanase(EC 3. 2. 1. 4)가 endo- β -1, 4-glucosidic linkage에 무작위로 작용하여 비환원 말단을 가진 저분자의 cellulose chain을 생성하면 exo- β -1, 4-glucanase(C1, EC 3. 2. 1. 91)가 작용하여 cellulose chain의 비환원 말단으로부터 주로 cellobiose와 glucose unit로 분해하고 최종적으로 β -1, 4-glucosidase(EC 3. 2. 1. 21)에 의하여 cellobiose 또는 short chain oligosaccharide를 glucose unit로 전환시킨다⁽¹⁾.

Cellulase 유전자의 cloning에 관한 보고는 *Cellulomonas* 속⁽²⁾, *Bacillus* 속^(3,4), *Clostridium thermocellum*⁽⁵⁾,

Ruminococcus 속⁽⁶⁾, *Trichoderma reesei* 등^(7,8)에서 shotgun 방법과 cDNA를 합성하여 진행되어 왔으나 효소의 생산성 향상에는 크게 기여하지 못하고 있으며, 최근에는 Murphy 등⁽⁹⁾, Beguin 등⁽¹⁰⁾ 및 Penttila 등⁽¹¹⁾에 의해 cellulase gene의 염기배열을 밝혀 분자수준에서의 정보를 제공하였다. 최근에 본 연구자는 cellulase complex와 xylanase를 세포외로 분비하는 세균^(12,13), 곰팡이^(14,15) 및 방선균⁽¹⁶⁾을 분리하여, 배양학적 특성과 catabolite repression 조절하에 있는 cellulase 생합성을 변이에 의해 해제시켜 효소 분비능이 증가된 균주와 원형질체 융합으로 cellulase와 xylanase 분해효소를 동시에 생산하는 균주를 개발하였다. 분리, 동정된 균주들 중 *Bacillus* sp. F204⁽¹⁶⁾는 균주식, cellulase 및 xylanase 생성이 50°C pH 10.2에서 최대로 나타났고, pH의 효소활성 범위도 6.0~9.5로 비교적 넓었다. 당화공정 과정에서 전처리시의 중화냉각 공정의 삭제, 당화공정시 부산물의 효율적 이용 등의 측면을 고려할 때 고온, 알칼리성에서 생육하는 미생물이 생산하는 효소는 섬유소의 생물전환 공정에 큰 잇점이 있다. 따라서 본 실험은 고온, 알칼리성 *Bacillus* sp. F204의 cellulase gene의 특성과 cloned cellulase 유전자를 발현 vector에 연결시켜 효소활성이 증가된 결과를 보고하는 바이다.

Corresponding author : Nack-Kie Sung, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

재료 및 방법

균주 및 plasmid

고온, 알칼리성 *Bacillus* sp. F204는 본 연구실에서 토양에서 분리한 균주⁽¹⁶⁾로서 알칼리성 cellulase complex를 생성하여 cellulase gene source 균으로 사용하였다. *E. coli* JM109($\Delta(lac\ pro)$, *thi*, *strA*, *supE*, *endA*, *sbcB*, *hadR*, F^{traD36}, *proAB*, *lacI*, Z Δ M15, *r*, *m*⁻)와 *B. subtilis* RM141(*arg15*, *leuB8*, *hisA1*, *r*, *m*⁻)가 host로 이용되었고, pUC19, pBR71은 *E. coli*와 *B. subtilis*의 cloning vector로 그리고 pKK223-3은 tac promoter를 가지는 *E. coli* 발현 vector로서 효소활성 증진에 사용되었다.

배지 및 배양

*E. coli*와 *B. subtilis*는 LB배지(Bacto-tryptone 10g, Bacto-yeast extract 5g, NaCl 5g/l)에서 37°C, 진탕배양하였고, 고온, 알칼리성 *Bacillus* sp. F204는 PY-CMC 배지(CMC 10g, polypeptone 5g, yeast extract 5g, NaCl 5g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, Na₂CO₃ 10g/l, pH 10.2, Na₂CO₃은 살균 후 별도첨가)⁽¹⁷⁾로 50°C에서 진탕배양하였다.

E. coli JM109의 형질전환체 분리시의 선택배지로는 ampicillin이 50 µg/ml 함유된 MacConkey 고체배지가 사용되었으며, cellulase 활성을 나타내는 형질전환체 분리시에는 ampicillin과 0.5% CMC가 함유된 LB 고체배지가 선택배지로 사용되었다.

Cellulase 유전자의 클로닝

Bacillus sp. F204의 염색체 DNA를 HindIII로 절단하여 15~30% sucrose gradient로 1-10 Kb 단편으로 분획한 5 µg과 동일효소로 절단하여 alkaline phosphatase로 처리한 pUC19 2.5 µg을 T₄DNA ligase(TaKaRa, Japan)로 12.5°C, 36시간 ligation하여 *E. coli* JM109의 competent cell에 형질전환 시켜 ampicillin(50 µg/ml)이 함유된 MacConkey 고체배지에 도말하여 37°C, 36시간 배양하였다. 이 때 흰색을 띠는 colony를 ampicillin과 0.5% CMC가 함유된 LB 고체배지에 이식하여 37°C, 36시간 이상 배양하여 colony 주위에 crater를 형성하거나 또는 0.1% congo red 염색시 노란색의 환을 형성하는 것을 선발하였다. 염색체 DNA의 분리는 proteinase K (1 mg/ml; Sigma)와 RNase(100 µg/ml, typeII-A-Sigma)를 처리하는 것을 제외하고는 Miura 법⁽¹⁸⁾에 준하였으며 plasmid의 대량 정제는 Maniatis 등⁽¹⁹⁾의 방법 그리고 재조합체를 함유하고 있는 plasmid의 신속한 분리는 Biroboim과 Doly의 방법⁽²⁰⁾을 사용하였다.

DNA 상동성검정

Agarose gel의 DNA 단편을 nitrocellulose filter에

고정하는 것은 Sourthern의 방법⁽²¹⁾을, 그리고 DNA hybridization 실험은 Boehringer Mannheim사의 non-radioactive immunoassay kit를 사용하여 Maniatis의 방법⁽¹⁹⁾을 따랐다.

면역적 방법

Bacillus sp. F204를 PY-CMC 배지에서 50°C, 36시간 배양한 후 원심분리한 상정액을 4배의 cold ethanol로 침전시킨 다음 침전액 1 ml(CMCcase activity 4.0 unit)를 complet Freund adjuvant 1 ml과 완전히 혼합하여 토끼에 주입했다.

Booster injection이 최초 주사 후 4주와 6주 후에 동일방법으로 행하였고, 분리된 혈청은 Johnstone 등의 방법⁽²²⁾에 따라 immunodiffusion 실험을 행하였다.

효소활성도 및 localization

Carboxymethyl Cellulase(CMCCase) 활성은 Horikoshi 등의 방법⁽¹⁷⁾에 준하였다. 즉, 조효소액 0.3 ml과 0.02M citrate-phosphate buffer(pH 6.5)에 용해된 1% CMC 용액 0.7 ml을 혼합하여 50°C 진탕수조에서 10분간 반응시킨 후 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 용액 1 ml을 첨가하여 정확하게 5분간 끓인 다음 급냉시켜 증류수 5 ml을 가하여 510 nm에서 흡광도를 측정하여 D-glucose를 정량하였다. 효소활성 단위는 mM-glucose/ml, min로 표시하였다. 균체의 periplasmic과 균체내 효소의 분획은 Cornelis 등⁽²³⁾의 방법에 따라 행하였다.

형질전환

*E. coli*와 *B. subtilis*의 형질전환은 Cohen⁽²⁴⁾과 Imanaka⁽²⁵⁾의 방법에 따라 각각 행하였다.

결과 및 고찰

Cellulase 유전자의 *E. coli*에의 클로닝

Bacillus sp. F204의 염색체 DNA를 pUC19에 cloning부위가 있는 7개 제한효소 즉, *EcoRI*, *SacI*, *BamHI*, *PstI*, *HindIII*, *PvuI*, *SalI*으로 처리하였을 때, *EcoRI*과 *HindIII*의 절단이 양호하였는데 본 실험에 사용될 plasmid (pKK223-3, pGR71)들은 *HindIII*가 클로닝 부위로 존재하므로 *HindIII*로 사용하였다. *HindIII*로 절단한 염색체 DNA 5 µg과 동일효소로 절단하여 alkaline phosphatase로 처리된 pUC19 2.5 µg를 ligation시킨 후 형질전환시켜 ampicillin이 함유된 MacConkey 고체배지에서 37°C, 36시간 배양하였다. 이 때 pUC19의 lacZ gene site에 존재하는 *HindIII* 부위에 의해 DNA가 삽입되면 흰색콜로니를 나타내고 의해 DNA가 없이 pUC19가 self-ligation된 plasmid는 적색 콜로니를 형성한다. 흰색을 띠는 약 2.3×10⁴개 colony를 다시 0.5% CMC와 ampicillin이 첨가된 LB agar배지에 tooth-picking하여 37°C, 36

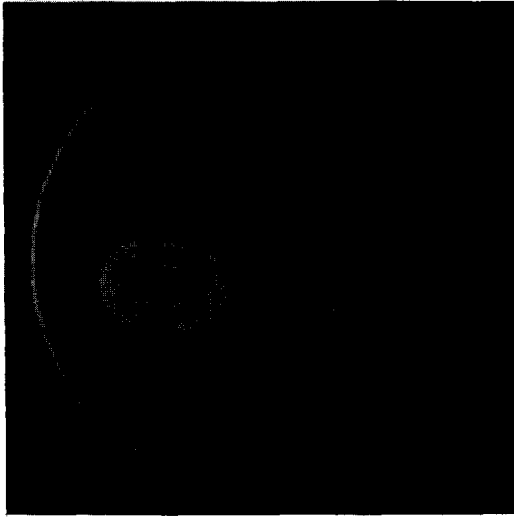


Fig. 1. Halo formation of *E. coli* JM109 carrying recombinant plasmid DNA by the congo red staining

1. *E. coli* JM109 containing pUC19
2. *E. coli* JM109 containing pBC192
3. *Bacillus* sp. F204
4. *E. coli* JM109 containing pBC191

시간 배양한 후 0.1% congo red로 염색하고 1N NaCl로 세척하였을 때 노란색의 halo를 형성하는 2개 균주를 선발하였다. 이들 균주에서 약 4.6 Kb와 5.8 Kb의 *Hind*III 단편을 가지는 2개의 재조합 plasmid, pBC191과 pBC192를 각각 분리하였다. Fig. 1은 선발된 recombinant plasmid DNA를 가지고 있는 *E. coli*가 0.5% CMC를 함유한 LB agar배지에서 clear zone이 나타남을 보여주고 있다.

pBC191을 몇종의 제한효소로 single과 double digestion을 한 후 각 절편을 전기영동 하였을 때 Fig. 2와 같이 *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Pvu*II 부위가 각각 1개씩 존재하였고, *Xba*I, *Sal*I, *Sac*I, *Bgl*II, *Xho*I site로 처리하였을 때는 절편이 전혀 나타나지 않았다.

DNA 상동성검정

pUC 19에 구축된 pBC191의 4.6 Kb *Hind*III 절편이 gene source균인 *Bacillus* sp. F204 유래인가를 확인하기 위하여 Boehringer Mannheim사 제품인 Nonradioactive immunoassay Kit의 deoxyuridin-triphosphate에 insert를 labeling한 probe와 *Hind*III로 절단한 염색체 DNA의 상동성을 조사하여 본 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 강한 상동성이 인정되었다.

Immunodiffusion assay

Bacillus sp. F204의 조효소액을 토기에 주사하여 얻은 항체에 대하여 pBC191의 cellulase gene이 생산하는 cellulase, *Aspergillus niger*의 cellulase 그리고 *Cellulomonas*

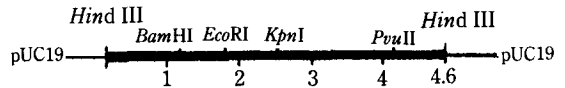


Fig. 2. Restriction endonuclease map of the 4.6 Kb insert in pBC191

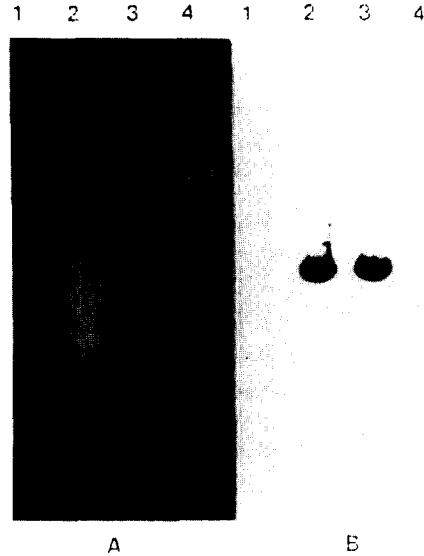


Fig. 3. Homology between the pBC191 and chromosomal DNAs

- A : Agarose(0.8%) gel electrophoresis of digests of various DNAs. lane 1, *E. coli* JM109 DNA(*Hind*III) ; lane 2, *Bacillus* sp. F204(*Hind*III) ; lane 3, pBC191 (*Hind*III) ; lane 4, λ DNA(*Hind*III)
- B : Hybridization analysis of the Southern transfer from the gel A

*fimi*의 cellulase를 immunodiffusion시킨 결과 pBC191이 coding하고 있는 cellulase는 강한 침강선을 형성하였으나 *A. niger*, *C. fimi*와의 어떤 반응도 나타나지 않았다 (Fig. 4). 또한 항체 30 μ l를 pBC191을 가지고 있는 *E. coli* JM109의 cellulase 조효소액에 첨가하면 92% 이상의 효소활성이 저해되었다. 이런 결과로 pBC191내의 cellulase gene은 *Bacillus* sp. F204의 유래임이 확인되었으며 그리고 재조합체 pBC191이 생성하는 cellulase는 *A. niger* 및 *C. fimi*의 cellulase와 침강선을 형성하지 않을 것으로 보아 pBC191내의 cellulase 유전자는 이들 균주의 cellulase 유전자와 상이하다는 것을 추론할 수 있다.

효소활성 및 localization

pBC191과 pBC192를 가지는 *E. coli* JM109를 1% CMC와 ampicillin이 함유된 LB배지에서 37°C, 36시간 배양하여 *Bacillus* sp. F204 유래의 cellulase가 *E. coli*의 세포내, periplasmic 혹은 균체외에 존재하는가를 조사한



Fig. 4. Oucherlony double diffusion assay

Samples were added to the outer wells as indicated below

Ab, antiserum to the crude enzyme of *Bacillus* sp. F 204 ; Well 1, periplasm fraction of *E. coli* JM109 carrying pUC19 ; Well 2, crude cellulase of *E. coli* carrying pBC192 ; Well 3, *Aspergillus niger* cellulase(Sigma C7377) ; Well 4, crude cellulase of *Cellulomonas fimi* ; Well 5, crude cellulase of *E. coli* JM109 *Bacillus* sp. F204

결과는 Table 1과 같다.

2개의 재조합체 중 pBC191을 가지는 *E. coli* JM109는 효소활성이 *Bacillus* sp. F204의 활성보다 약 1.3배 높았고, pBC192는 비슷한 수준이었다. *E. coli*에서 발현된 대부분의 cellulase 유전자의 연구결과와 비슷하게 많은 양의 효소는 periplasmic 분획과 세포내에서 검출되었고, 세포외로 분비되는 비율은 비교적 낮았다. *Bacillus* sp. F204는 β -1,4-glucosidic linkage를 가지는 다당류 즉,

CMC, avicel, filter paper 등을 배지에 첨가하면 cellulase의 생합성이 유도되는 유도효소이고, 또한 glucose와 같은 다당류 존재하에서는 효소 생합성이 저해되는 catabolite repression 조절하에 있는 균주인데⁽¹³⁾, 재조합체 pBC191과 pBC192를 함유하고 있는 *E. coli* JM109에서는 유도물질이 요구되지 않은 구성화 효소였으며, 배지내 glucose 존재와 관계없이 효소 생합성이 용이하였다. 이러한 결과를 미루어 보아 Horikoshi 등⁽⁴⁾의 연구결과와 유사하게 클로닝된 cellulase gene은 gene regulation에 관련된 operator 부위가 제거된 것으로 추측할 수 있다.

Cellulase 유전자의 발현 벡터와 *B. subtilis*에의 도입

이미 보고된 결과^(3,4,6)와 같이 본 실험에서 클로닝된 cellulase 유전자를 가지는 *E. coli*에서도 효소활성이 본 균주에 비해 비슷한 수준으로 나타났기 때문에 효소활성을 증가시킬 목적으로 tac promoter를 가지는 *E. coli* 벡터인 pKK223-3의 *Hind*III 부위에 pBC191의 4.6 Kb *Hind*III 절편을 분리하여 ligation한 다음 *E. coli* JM109에 형질전환시켜 CMC 0.5%가 함유된 LB고체배지에서 37°C, 36시간 배양 후 amp^r, ter^r colony 중에 congo red 염색시 노란색 환을 형성하는 colony 중에서 pKC231를 새로 구축하였다. pKC231를 가지는 *E. coli* JM109는 효소활성이 pBC191보다 약 3.2배 증가되었는데(Table 1), 이는 pBC191의 4.6 Kb *Hind*III 절편이 pKK223-3의 promoter 아래 도입되어 발현속도가 증가된 것으로 생각된다. 또한 pBC191을 가지는 *E. coli* JM109에서 효소활성은 다른 연구자들의 보고^(2,4,6)와 같이 periplasmic과 세포내에 존재하였다. 세포외로 효소분비를 촉진하고 *B.*

Table 1. Activities and distribution of CMCCase in *E. coli* JM109 and *B. subtilis* RM-141 carrying plasmids

Strains and plasmids	CMCase activity(mU) ^{a3}			
	Total	Extracellular(%)	Periplasmic(%)	Intracellular(%)
<i>E. coli</i> JM109				
pUC19	0	0	0	0
pUC191	2.10	0.20(9.4)	0.89(42.3)	1.01(48.3)
pBC192	1.85	0.28(15.4)	0.71(38.5)	0.85(46.1)
pKKC221 ^{b1}	6.75	0.72(10.6)	3.00(44.5)	3.03(44.9)
<i>B. subtilis</i> RM141				
pGR71	2	2	— ^{d1}	—
pGRC711 ^{c1}	5.84	5.84(100)	—	—
<i>Bacillus</i> sp. F204	1.60	1.60(100)	—	—

Strains were aerobically grown in LB media for 36 hrs at 37°C.

^{a3} One unit of CMCase is defined as the amount of enzyme which liberates 1 miliunit of reducing sugar expressed as glucose per min. ml.

^{b1} pKKC221 is pKK223-3 containing 4.6 Kb *Hind*III fragment in pBC1

^{c1} pGRC711 is pGR71 containing 4.6 Kb *Hind*III fragment in pBC1

^{d1} not determined

Table 2. Substrate specificity of the cellulase encoded by pBC191 and pBC192

Substrate	Enzyme activity(unit)	
	pBC191	pBC192
CMC	2.10	1.85
Laminarin	— ^{c)}	—
Avicel	—	—
Xylan	—	0.21
pNPG ^{a)}	—	—
pNPX ^{b)}	—	—
Cellobiose	—	0.38

E. coli JM109 was cultured in LB containing ampicillin for 36 hr at 37°C.

^{a)} pNPG : p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside

^{b)} pNPX : p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside

^{c)} not determined

*subtilis*에서 효소생성능을 알아보기 위하여 *E. coli*와 *B. subtilis*의 shuttle vector인 pGR71의 *Hind*III site에 pBC191의 4.6 Kb *Hind*III 절편을 연결시켜 *B. subtilis* RM141에 형질전환하여 0.5% CMC가 함유된 LB배지에서 Kan^r, Cml^r 한 colony를 선발하여 congo red염색 후 노란색의 zone을 형성하는 균주에서 재조합 plasmid pGC711를 분리하였고 효소활성을 측정하였다(Table 1). Cellulase 활성은 pBC191보다 약 2.8배 증가하였고, *B. subtilis*에서는 다른 연구자들의 보고⁽³⁾와 동일하게 *E. coli*와는 다르게 세포외로 효소를 거의 다 분비하였다.

기질 특이성

Gene source균인 *Bacillus* sp. F204는 CMCase, avicelase, β-1, 4-glucosidase 그리고 xylanase를 분비하므로 순수한 단일 효소로서의 정제에 난점이 있기 때문에 각종 기질에 대한 특이성을 조사하므로써 클로닝된 cellulase가 어떤 gene을 coding하고 있는가를 알 수 있다. pBC191과 pBC192가 들어있는 *E. coli* JM109를 LB배지에서 37°C, 36시간 배양하여 조제한 조효소를 각 기질 1%에 대하여 효소활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

pBC191을 coding하고 있는 cellulase은 CMC 기질에서만 효소활성을 보였고, β-1, 3-glucosidic linkage를 가지는 laminarin이나 β-1, 4-glucosidic linkage를 가지는 avicel, xylan, pNPG, pNPX 및 cellobiose 등에서는 효소활성이 검출되지 않았다. 그러나 pBC192에서 생성된 효소는 CMC외에 xylan과 cellobiose에서 약간의 효소활성이 나타났다. 위의 결과로 보아 cloned cellulase gene은 CMCase gene을 coding하고 있는 것으로 추정할 수 있으며, Kawal 등⁽⁶⁾이 *Ruminococcus albus*에서 cloning된 cellulase gene은 CMCase gene외에 Lichnan, Laminarin, pNPG, pNPC에 대해서도 활성을 보인 것과

는 약간 상이하였다.

요 약

고온, 알칼리성 *Bacillus* sp. F204의 CMCase 유전자를 pUC19의 *Hind*III 부위에 연결하여 전이된 *E. coli* 형질전환체 중 2개의 재조합 플라스미드 즉, pBC191과 pBC192를 선발하였는데, 이들은 4.6 Kb와 5.8 Kb *Hind*III 절편을 각각 함유하고 있었다. pBC191의 4.6 Kb *Hind*III 절편을 *Bam*HI, *Eco*RI, *Kpn*I, *Pvu*II 부위가 각각 1개씩 존재하였다. Dioxigenin-labeled deoxyuridin-triphosphate에 4.6 Kb 절편을 표식한 것을 probe로 하여 상동성을 검정한 결과 모균주와 강한상동성이 있었고, 면역학적 실험에서도 *Bacillus* sp. F204 유래임이 인정되었다. pBC191의 4.6 Kb 절편을 *E. coli*의 발현 벡터인 pKK223-3과 *Bacillus* vector인 pGR71에 연결시켜 구축한 pKC231과 pGC711은 각각 pBC191에 비하여 효소활성이 3.2배와 2.8배 정도 증가되었으며, 그리고 *E. coli*에서는 대부분 세포내와 periplasmic 분획에서 검출되었다. 기질 특이성을 조사한 결과에 의하면 pBC191과 pBC192는 CMCase gene을 코딩하고 있는 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구비(1986-1989)의 지원에 의한 결과의 일부이다.

문 헌

1. Bisaria, V.S. and Ghooe, T.K. : Biodegradation of Cellulosic materials : substrate, microorganisms, enzymes and products. *Enz. Microbiol. Technol.*, **3**, 90(1981)
2. Whittle, D.J., Kilburn, D.G. Warren, R.A.J. and Miller, R.C. : Molecular cloning of a *Cellulomonas fimi* cellulase gene in *E. coli*. *Gene*, **17**, 139(1982)
3. Koide, Y., Nakamura, A. Vozumi, T. and Beppu, T. : Molecular cloning of cellulase from *Bacillus subtilis* and its expression in *E. coli*. *Agri. Biol. Chem.*, **50**, 233(1986)
4. Sashihara, N., Kudo, T. and Horikoshi K. : Molecular cloning and expression of cellulase genes of alkalophilic *Bacillus* sp. strain N-4 in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **158**, 503(1984)
5. Schwartr, W.H., schimming, S. and Woh, Staudenbauer : High level expression of *Clostridium thermoceillum* cellulase genes in *E. coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 50(1987)
6. Kawal, S., Honda, H and kobayashi, T. : Molecular cloning of *Ruminococcus albus* cellulase gene. *Agri. Biol. Chem.*, **51**, 59(1987)
7. Shoemaker, S., Schweickart, V. Ladner, M. Gelfand, D. and Innis, M. : Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase I derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio. Technol.*, **3**, 691(1983)

8. Terri, T.T., Lehtovaara, P. Kauppinen, S. Salovuori, I. and Knowles, J. : Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes : gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene*, **51**, 43(1987)
9. Murphy, N. McConnell, D.J. and Cantwee I, F.A. : The DNA sequence of the gene and genetic control sites for the excreted *B. subtilis* enzyme β -glucanase. *Nucleic Acids Res.*, **12**(13), 136(1984)
10. Bequim, P. Cornet, P. and Aubert, J.P. : Sequence of a cellulase gene the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *J. Bacteriol.*, **162**(1), 102(1985)
11. M. Penttila, Lehtovaara, P. and Knowles, J. Homology between cellulase genes of *T. reesei* : Complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene*, **45**, 253(1986)
12. Sung, N.K., Rho, J.S., Park, S.K. and Chung, Y.C. : Intragenic protoplast fusion between Alkalophilic *Bacillus* sp. F204 and B. sp. K17. *Kor. J. App. Microbiol. Bioeng.*, **16**(4), 275(1988)
13. Choi, S.C. : Cellulase and xylanase production from catabolite repression resistant mutant of thermophilic, alkalophilic *Bacillus* sp. *Res. Bull., Gyeongsang Nat. Univ.* (1988)
14. Sung, N.K., Lee, S.W., Shim, K.H., Chung, Y.C. and Rho, J.S. : Isolation and protoplast formation of Cellulolytic *Aspergillus* sp. *J. Inst. Agri. Resource utilization (Gyeongsang National Uni.)*, **23**, 137(1989)
15. Kim, D.H., Park, C.K., Chung, Y.C., Kang, I.S. and Sung, N.Ki : Isolation and characteristics of cellulolytic Fungi. *J. Gyeongsang Nat. Univ.*, **29**(1), 261(1990)
16. Sung, N.K., Park, H.S., Lee, S.W., Chung, Y.C. and Shim, K.W. : The isolation and mutation of cellulolytic *Actinomyces*. *J. Gyeongsang Nat. Univ.*, **28**(1), 191 (1989)
17. Horikoshi, K., Nakao, M. Kurono, Y. and Sashihara, N. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 774(1984)
18. Saito, H. and Miura K. Preparation of transforming DNA by phenol treatment. *Biochem. Biophys. Acta.*, **72**, 619(1963)
19. Maniatis, R., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. : *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York p. 86(1982)
20. Birnboim, H.C. and Doly J. A rapid alkaline extract procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.*, **7**, 1513(1979)
21. Southern, E.M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Biol.*, **98** : 503.
22. Johnstone, A. and Thorpe, R. : Immunochemistry in practice in precipitation techniques in agar and agarose. *Blackwell Scientific Publication Co.*, Oxford London, p. 131(1982)
23. Cornelis, P., Digneffe, C. and Willemat, K. : Cloning and expression of a *B. coagulans* amylase gene *E. coli*. *Genet.*, **186**, 507(1982)
24. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. : Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria : Genetic transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110(1972)
25. Imanaka, T., Fujii, M., Aramori, I. and Akiba, S. : Transformation of *Bacillus stearothermophilus* with plasmid DNA and characterization of shuttle vector between *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **149**, 824(1984)

(1990년 9월 5일 접수)