

## *Bacillus stearothermophilus* $\beta$ -D-Xylosidase 유전자의 크로닝 및 *Escherichia coli*에서의 발현

오세욱 · 박성수 · 박영인 · 최용진\*  
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

### Molecular Cloning and Expression of *Bacillus stearothermophilus* $\beta$ -D-Xylosidase Gene in *E. coli*

Oh, Se-Wook, 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** — *Bacillus stearothermophilus* isolated from soil was identified to express multiple extracellular xylanases. Two *Hind*III restriction fragments of 5.4 and 6.4 kb from *B. stearothermophilus* genomic DNA were cloned into pBR322 to obtain recombinant plasmids pMG01 and pMG02, respectively, which enabled *E. coli* HB101 cells to produce  $\beta$ -D-xylosidase activity. By subcloning into pUC18 and Southern blotting, the loci of the  $\beta$ -D-xylosidase genes were elucidated to be on non-homologous DNA fragments of 2.2 kb from pMG01(pMG1) and 1.0 kb from pMG02(pMG2), respectively. The two enzymes produced in *E. coli* cleaved xylobiose, xylotriose, xylotetrose and xylohexose to produce xylose as a major end product. The gene on pMG1, distinct from that on pMG2 was observed to encode a bifunctional protein that displayed both  $\beta$ -D-xylosidase (EC.3.2.1.37) and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities (EC.3.2.1.55).

Xylan은  $\beta$ -1,4-D-xylopyranoside의 기본 탄소 골격을 갖고 있는 복합다당류(complex polymer)로서 hemicellulose의 주성분을 이루고 있으며 자연계에 cellulose 다음으로 널리 분포되어 있다(1-3). 그러므로 xylan의 효율적 가수분해는 다량의 D-xylose를 생산할 수 있는 것으로 판단되므로, xylan은 미래의 식품 또는 에너지원으로 매우 유망한 biomass 자원이라고 하겠다(4).

미생물에 의한 xylan의 분해는 다단계 과정(multi-step process)으로서 최소한 3, 4종 이상의 효소 즉, endoxylanase,  $\beta$ -D-xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase 및 acetyl esterase 등의 협동적 작용(cooperative action)에 의해 완전 분해되어 이용되고 있는 것으로 보고되어 있다(5).

본 연구실에서는 xylan의 효율적인 효소 분해법 개발에 의한 D-xylose의 경제적 대량 공급의 가능성을 검토하기 위한 기초연구로서 multiple xylanases을 세포외로 다량 생산하여 xylan을 효과적으로 분해 이용하는 세균을 토양으로부터 분리하고 균주 동정과 효소 생산 조건 조사(6)와 생산된 endo-xylan의 정제 및 특성 조사 등(7)을 실시하여 전보에 보고한 바 있다. 본보에서는 상기 분리균의  $\beta$ -D-xyloxydase 유전자를 *E. coli*에 크로닝하고 크로닝한 유전자의 특성을 조사, 그 결과를 보고한다.

#### 재료 및 방법

##### 사용 균주와 플라스미드

$\beta$ -D-Xylosidase 유전자의 공여체(gene donor)로 사용한 균주는 토양에서 분리한 *Bacillus stearothermophilus*(6)이었으며, 숙주세포로는 *Escherichia coli*

**Key words:** Cloning,  $\beta$ -D-xylosidase, *Bacillus stearothermophilus*

\*Corresponding author

HB101( $F^-$ , *hsdS20*, *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xylS*, *mtl1*, *supE44*)(8)을 사용하였고, cloning vector 및 subcloning vector로는 pBR322(9)과 pUC18(8)을 사용하였다.

### 배지 및 배양 조건

*B. stearothermophilus* 균체 증식은 본 실험실에서 확립한 효소 생산 최적 배지(6)를 사용, 45°C에서 진탕 배양하였으며 *E. coli*의 경우는 LB 배지에서 호기성 배양하였다. 항생물질 첨가량은 ampicillin 50 µg/ml, tetracycline 15 µg/ml 그리고 kanamycin 5 µg/ml이었으며, β-D-xylosidase 유전자 선별을 위해서는 ampicillin을 첨가한 LB agar에 p-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside(pNPX)를 최종농도 1 mM이 되게 첨가한 배지를 사용하였다.

### 사용 시약

Agarose, RNase, protease, acrylamide 및 pNPX 등은 Sigma Co., T4 DNA ligase와 기타 모든 제한 효소는 KOSCO, calf intestinal alkaline phosphatase (CIP) 및 Dig DNA Labelling & Detection Kit는 Boehringer Mannheim, 그리고 nylon membrane은 Amersham 제품인 Hybond-N<sup>+</sup>를 구입 사용하였으며, 기타 일반 시약류는 시판 일급 이상의 분석용을 사용하였다.

또 β-D-xylosidase의 기질로 사용한 각종 xylooligosaccharides는 Y. Mitsuish 등의 방법(10)에 따라 xylan을 산가수분해하여 Dowex 1×8(Cl form)과 Bio-gel P-2 column chromatography 등의 과정을 거쳐 본 실험실에서 분리 정제하여 이용하였다.

### Chromosomal DNA의 분리

Doi의 방법(11)에 따라, *B. stearothermophilus*를 500 ml의 최적 배지에서 16시간 배양하여 얻은 균체를 SET buffer(20% Sucrose, 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA)로 1회 세척 후 동일 완충 용액 10 ml에 현탁시키고 5 mg의 lysozyme을 첨가, 37°C에서 60분간 반응시켰다. 반응 후 5 ml TEN buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 7.6)와 0.5 ml 25% SDS를 가해 잘 혼합하고 1 ml의 5 M NaCl을 가한 다음 3회의 phenol extraction(20 ml)과 1회의 phenol/chloroform extraction을 실시하였다. 최종적

으로 2배 부피의 cold ethanol을 첨가하여 생성된 DNA fiber를 유리막대를 이용하여 회수한 다음 10 ml의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해시켜 사용하였다.

### 플라스미드 분리 및 형질전환

플라스미드 분리 정제는 CsCl-EtBr equilibrium centrifugation법(12), PEG 침전법(12) 또는 rapid alkaline lysis법(13)을 이용하였으며, 각종 플라스미드를 사용한 형질전환 실험은 Simanis가 확립한 과정(14)에 따라 실시하였다.

### SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Laemmli 방법(15)에 따라 10% polyacrylamide gel을 사용, 200 V에서 45분간 전기영동시켰으며 분리된 단백질 band는 Coomassie blue 염색법으로 염색하였고, protein size marker는 Sigma사에서 구입한 high molecular weight standard mixture(30,000-200,000)를 사용하였다.

### Agarose gel electrophoresis

Gel electrophoresis는 TAE buffer(0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA, pH 8.0)을 사용하여 Maniatis 등이 제안한 방법(12)에 준하였으며, agarose gel상의 DNA 절편은 electro-elution 방법(12)이나 Gene Clean kit를 사용하는 일반적인 방법을 이용하여 추출 회수하였다.

### Southern Blotting

Agarose gel상의 DNA 단편은 capillary blot transfer법(16)에 따라 Hybond-N<sup>+</sup> membrane으로 옮겼으며 DNA Hybridization은 68°C에서 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS 및 1% blocking reagent를 첨가한 5×SSC buffer(0.75 M NaCl, 0.075 M Na<sub>3</sub>-citrate) 중에서 실시하였으며, DNA labelling과 detection은 nonradioactive Dig kit를 이용한 digoxigenin-anti-digoxigenin ELISA 방법(17)에 따랐다.

### 효소 활성 측정

β-D-Xylosidase 활성은 100 µl의 10 mM pNPX 용액(50 mM phosphate 용액, pH 7.0)에 효소액 100 µl를 가하고 45°C에서 20분간 반응시킨 후 0.4 M Na<sub>2</sub>

CO<sub>2</sub>용액 2 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 unit는 분당 1 μmole의 p-nitrophenol을 생성할 수 있는 효소량으로 정의하였다. α-L-arabinofuranosidase 활성 측정은 pNPX 대신 pNPA(p-nitrophenyl-β-D-arabinofuranoside)를 기질로 사용한 것 외엔 β-D-xylosidase 활성 측정법과 동일하였다.

**단백질 정량**

Bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용한 Lowry법(18)에 따랐다.

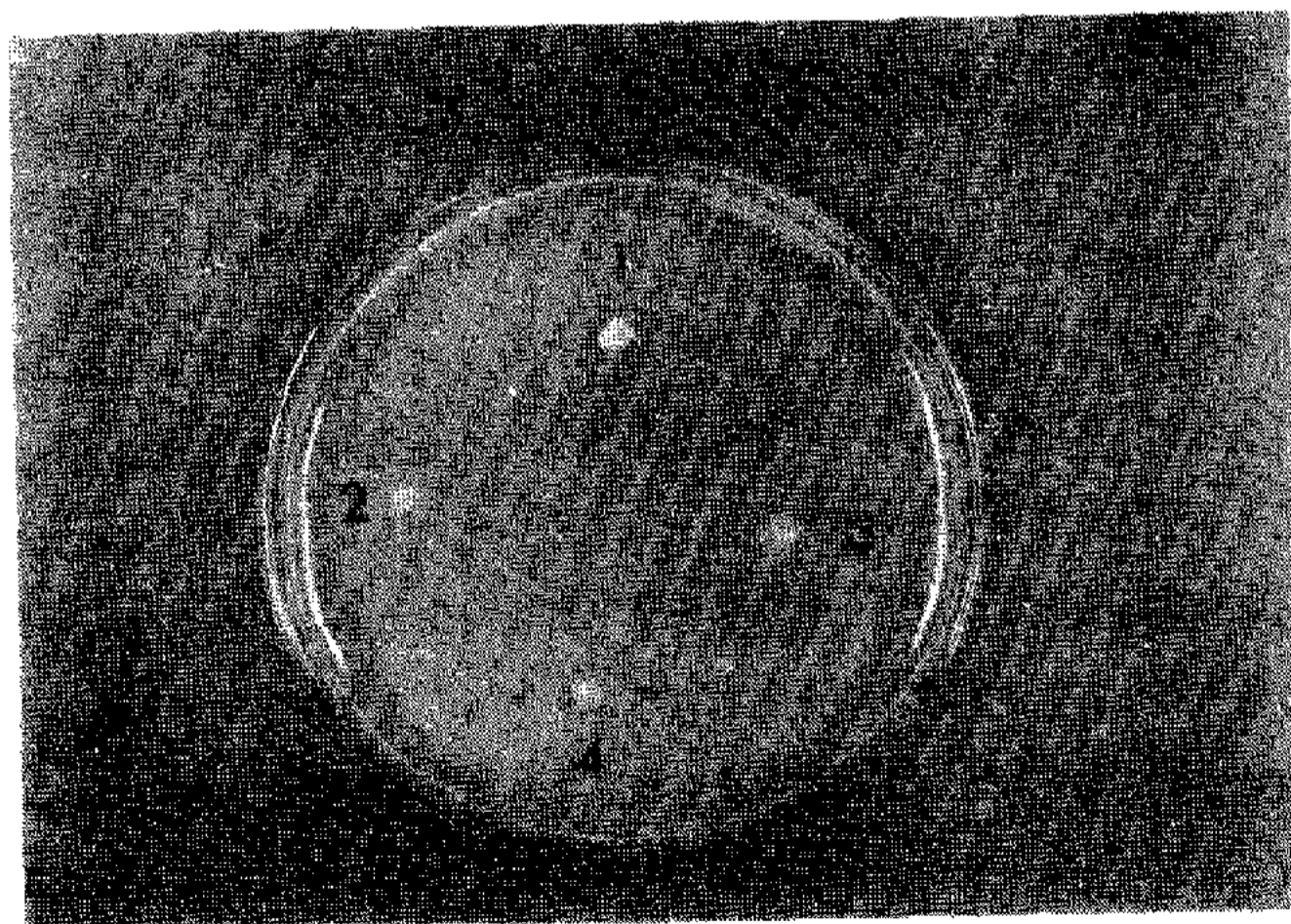
**Xylan 분해 생성물의 분석**

Xylan 가수분해 산물은 thin layer chromatography법(19)을 이용 분석하였다. 즉 Machery-Nagel TLC plate(20×20 cm)와 butanol : pyridine : water (5 : 3 : 2, v/v) 혼합액을 전개용매로 사용하여 2중 전개시킨 후 공기 중에서 건조시키고 aniline hydrogen phthalate 용액을 사용, 발색시켰다.

**결과 및 고찰**

**β-D-Xylosidase 유전자의 크로닝**

Multiple xylanase를 세포외로 다량 생산하는 *B.*

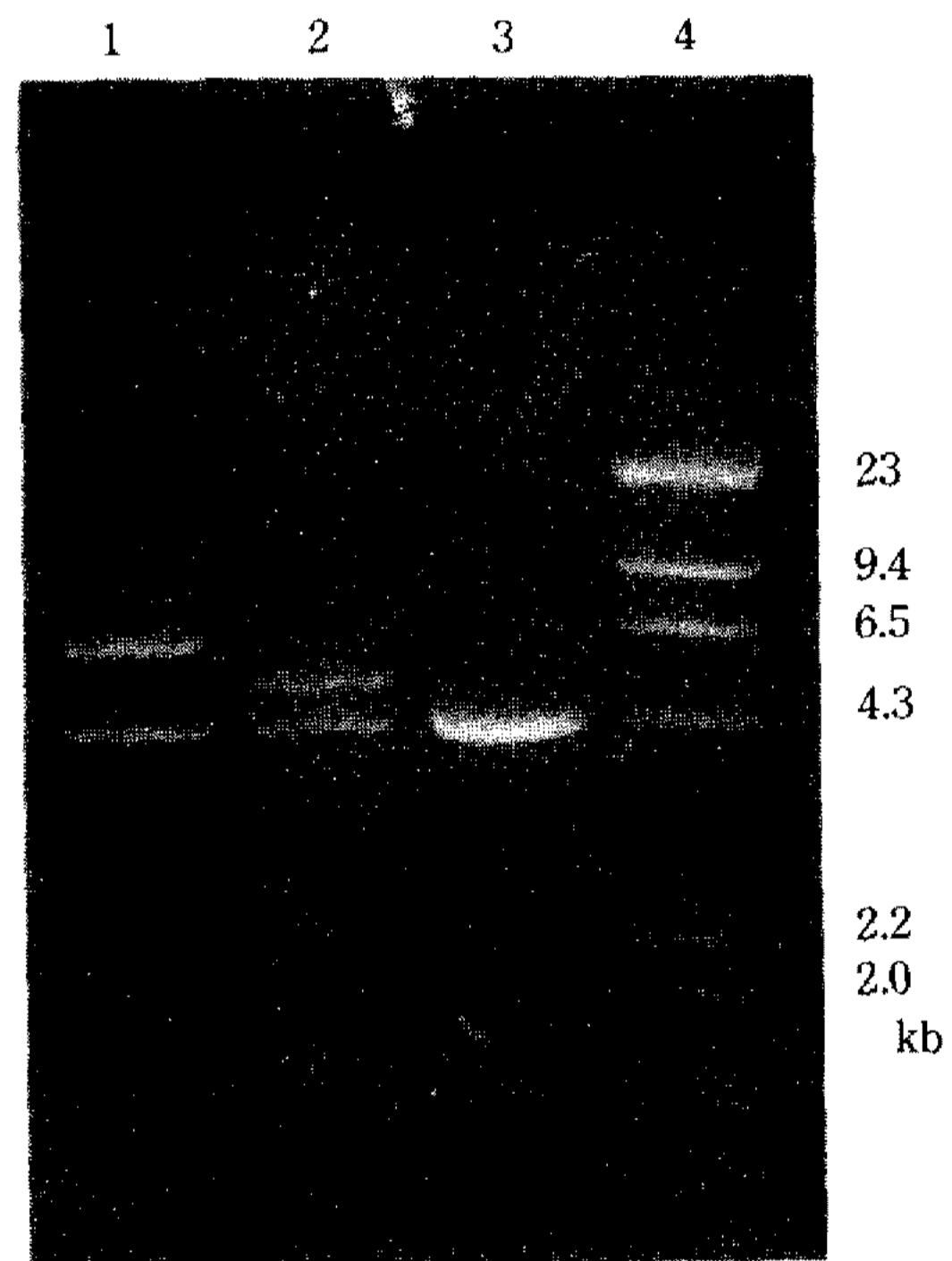


**Fig. 1.** Expression of β-D-xylosidase activity of *B. stearothermophilus* gene in *E. coli* HB101.

(1) *B. stearothermophilus*, (2) *E. coli* HB101/pMG01, (3) *E. coli* HB101/pMG02, (4) *E. coli* HB101.pBR322(control)

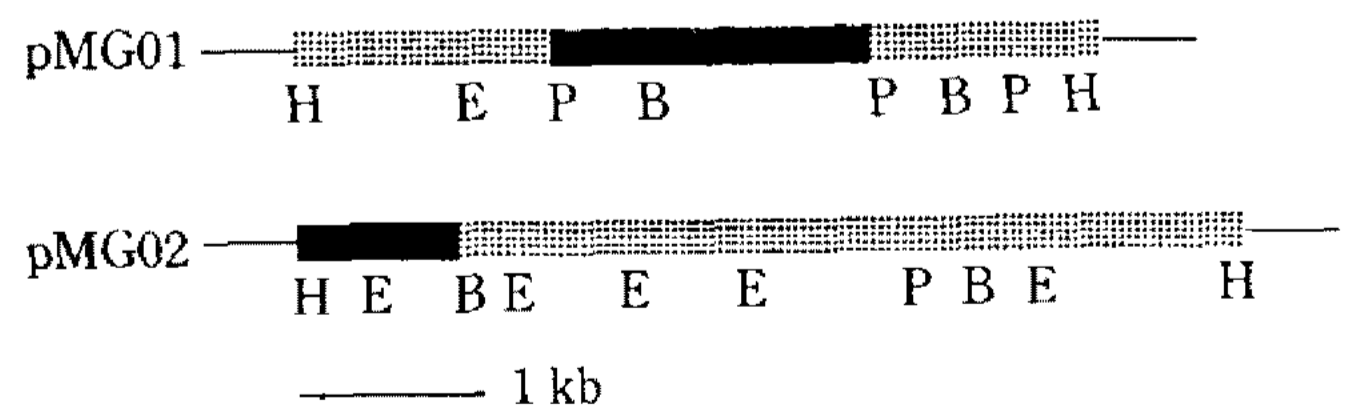
The cells were grown on LB agar supplemented with 1 mM pNPX at 37°C for 20 hours.

*stearothermophilus* 균주의 genomic DNA를 HindIII로 절단, 분리한 3-8 kb의 DNA 단편과 HindIII로 절단 후 CIP 처리한 pBR322 DNA를 ligation시켜 *E. coli* HB101을 형질전환시켰다. Ampicillin과 pNPX가 첨가된 선별 배지에서 자란 약 2만여개의 형질전환체 중에서 pNPX를 분해함으로써 colony 주위에 황색대를 생성한 2개의 colony를 선별하였다(Fig. 1 참조). 두 colony를 형성한 균주로부터 플라스미드를 각각 분리, 분석해 본 결과 Fig. 2에 표시되어 있는 바와 같이 두 균주가 각각 5.4 kb와 6.4 kb의 DNA 단편이



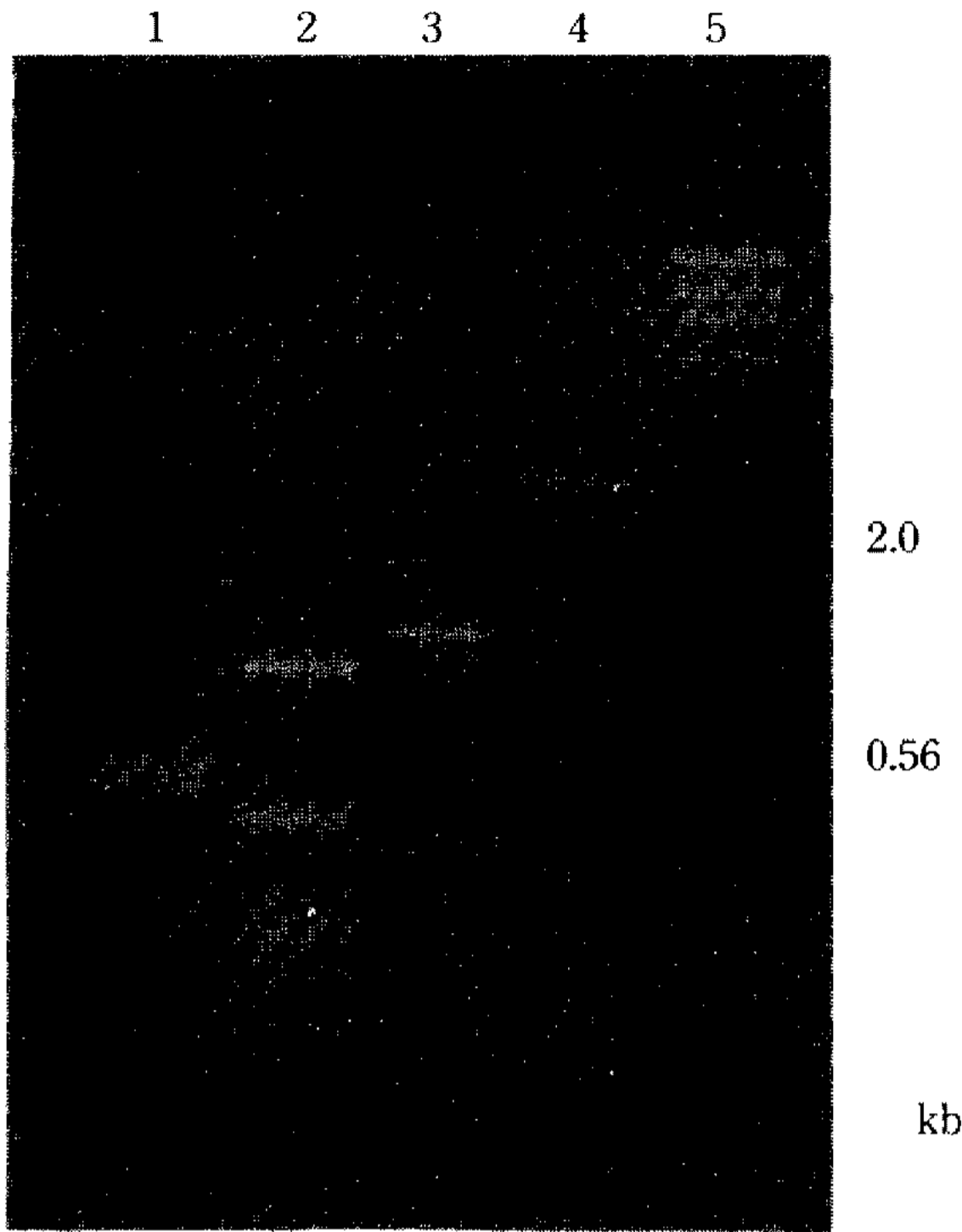
**Fig. 2.** Agarose gel electrophoretic analysis of the recombinant plasmids.

Lane 1; HindIII digest of pMG02, lane 2; HindIII digest of pMG01, lane 3; HindIII digest of pBR322(control), lane 4; HindIII digest of λ-DNA(size markers)



**Fig. 3.** Restriction enzyme maps of the recombinant plasmids.

H, E, P, and B represent HindIII, EcoRI, PstI, and BamHI respectively. Boxed region represents cloned DNA inserts of 5.4 kb for pMG01 and 6.4 kb for pMG02. ■ indicates the approximate location of the xylosidase gene and — represents pBR322.



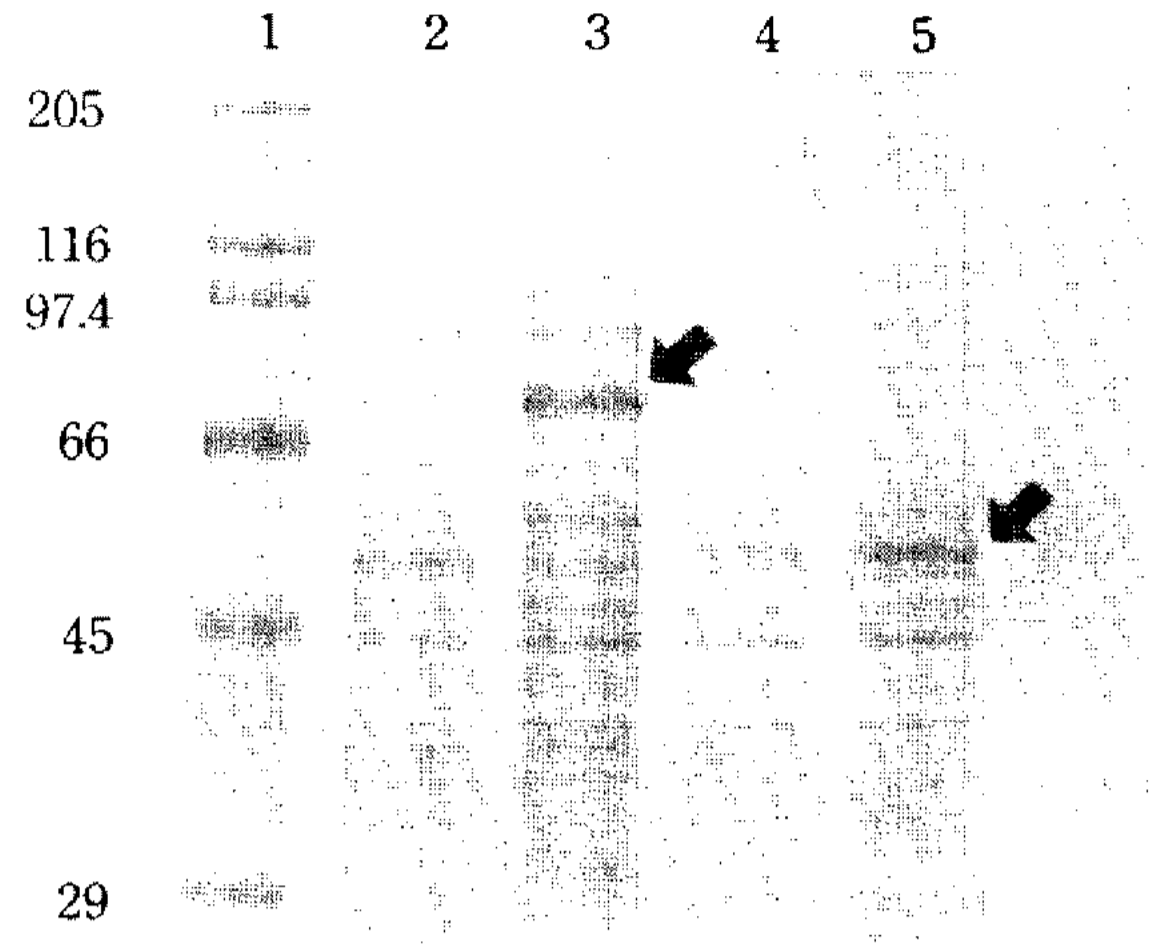
**Fig. 4. Restriction enzyme digestion pattern of the *B. stearotheophilus* DNA ligated into pUC18.**

Lane 1; *Sau*3AI digest of the pMG2 insert, lane 2; *Sau*3AI digest of the pMG1 insert, lane 3; pMG2 insert, lane 4; pMG1 insert, lane 5; DNA size markers

삽입된 재조합 플라스미드를 가지고 있는 것을 확인하였다. 따라서 전자의 재조합 플라스미드를 pMG01, 후자를 pMG02라고 명명하는 한편 상기 두 재조합 플라스미드를 PEG 침전법을 이용, 분리 정제한 다음 4 가지의 제한효소로 처리, physical mapping을 하여 Fig. 3에 표시된 바와 같이 각각의 restriction map을 작성하였으며 두 삽입 절편의 map을 비교해 본 결과 서로 다름을 확인하였다.

**Subcloning**

pMG01과 pMG02의  $\beta$ -D-xylosidase 활성과 관련된 5.4 kb, 6.4 kb의 DNA 단편을 분리하고 각각의 restriction map을 참고로 각종 제한효소를 처리하여, 여러 가지 크기의 DNA 단편을 분리한 다음, 적절한 효소로 절단한 pUC18에 subcloning하였다. pMG01 insert의 경우, 2.2 kb의 *Pst*I 단편이 삽입된 재조합 pUC18 플라스미드(pMG1으로 명명)로 형질 전환된 *E. coli* HB101 균주만이 노란색의 colony를 형성하였다. 반면 pMG02에 삽입된 6.4 kb를 절단 분리한 DNA 단편 중에서는 1 kb의 *Bam*H1-*Hind*III 단편이 삽입된



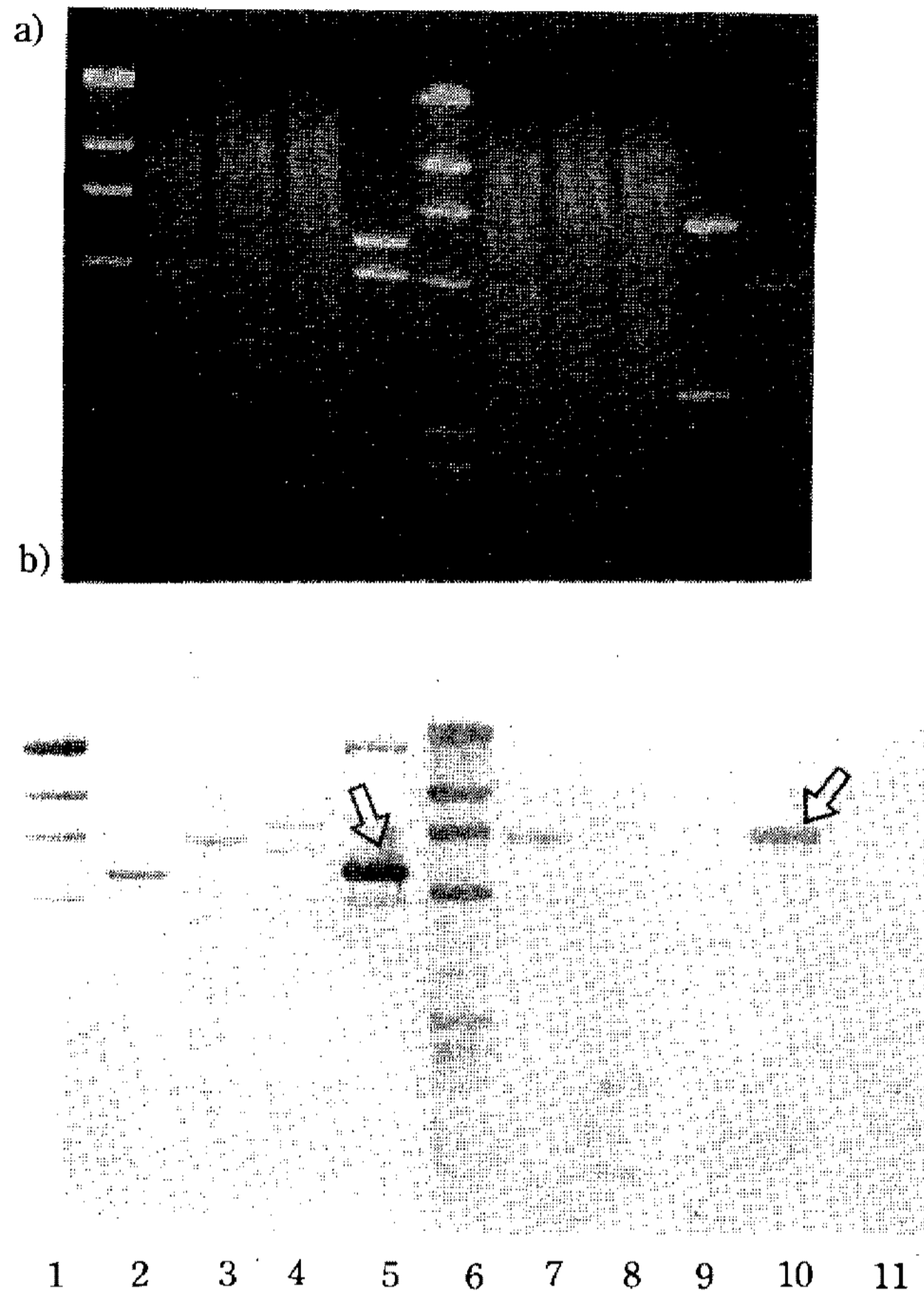
**Fig. 5. SDS-PAGE with the cell extracts from *E. coli* HB101 containing plasmid pMG01 or pMG02.**

Lane 1; protein size markers (from the top): myosin,  $\beta$ -galactosidase, phosphorylase b, albumin bovine, albumin egg and carbonic anhydradase, lane 2; *E. coli* HB101/pBR322(control), lane 3; *E. coli* HB101/pMG01, lane 4; *E. coli* HB101/pBR322(control), lane 5; *E. coli* HB101/pMG02. The arrows indicate the points of the  $\beta$ -D-xylosidase band.

pUC18 플라스미드(pMG2로 명명)를 가진 균주가 노란색의 colony를 형성하였다. 그러나 pMG2 균주가 pMG02에 비해 월등히 낮은  $\beta$ -D-xylosidase activity를 나타내고 있어(자료제공은 하지 않았음) 앞으로 보다 구체적인 실험으로 정확한 원인규명이 되리라 사료된다.

**Southern Blotting**

pMG1과 pMG2에 삽입된  $\beta$ -D-xylosidase 활성과 관계가 2.2 kb와 1.0 kb의 두 DNA 단편이 동일한  $\beta$ -D-xylosidase 유전자를 가지고 있는가를 알아보기 위한 한 방법으로 두 DNA 단편을 *Sau*3AI으로 절단하여 본 결과 Fig. 4에 표시되어 있는 바와 같이 서로 완전히 다른 digestion pattern을 보이고 있어 각각 별개의 유전자인 것으로 생각되었다. 또한 크로닝한  $\beta$ -D-xylosidase 유전자의 발현산물을 비교 분석하기 위한 기초 실험으로 pMG1과 pMG2를 가지고 있는 *E. coli* HB101 균주를 LB 배지에서 배양, 이들 균체로부터 얻은 cell extract를 SDS-PAGE로 분석해 보았다. Fig. 5에 화살표로 표시되어 있는 바와 같이 분자량이 각각 약 75,000과 54,000을 나타내는 위치에서  $\beta$ -D-xylosidase 유전자 산물이라고 추측되는 단백질대를 식별할 수 있었으나 앞으로 activity staining



**Fig. 6. Southern hybridization of *B. stearothermophilus* genomic DNA with random-primed DNAs synthesized from the inserts of pMG01 and pMG02. a) DNA electrophoretic patterns, b) southern blot patterns**

1.  $\lambda$ -DNA digested with *Hind*III, 2. chromosomal DNA digested with *Hind*III, 3. chromosomal DNA digested with *Eco*RI, 4. chromosomal DNA digested with *Bam*HI, 5. pMG01 digested with *Hind*III, 6.  $\lambda$ -DNA digested with *Hind*III, 7. chromosomal DNA digested with *Hind*III, 8. chromosomal DNA digested with *Eco*RI, 9. chromosomal DNA digested with *Bam*HI, 10. pMG2 digested with *Hind*III, 11. pBR322 digested *Hind*III. The arrows indicate the bands which are specifically hybridized with each probe, respectively. Lane 2-5: hybridized with pMG01 probe, lane 7-11: hybridized with pMG02 probe

실험을 통해 확인할 예정이다.

다른 한편 *B. stearothermophilus*의 chromosomal DNA를 *Hind*III, *Eco*RI 및 *Bam*HI 등으로 절단, gel electrophoresis하여 분리한 다음 Hybond-N<sup>+</sup> membrane에 alkali-transfer시키고  $\lambda$ -DNA size marker와 pMG1과 pMG2 삽입 DNA 단편을 Dig labelling하여 얻은 DNA 단편을 probe(pMG1 삽입 단편, probe 1; pMG2 삽입 단편, probe 2)로 사용하여 Fig. 6과 같은

**Table 1. Expression of  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities in various strains**

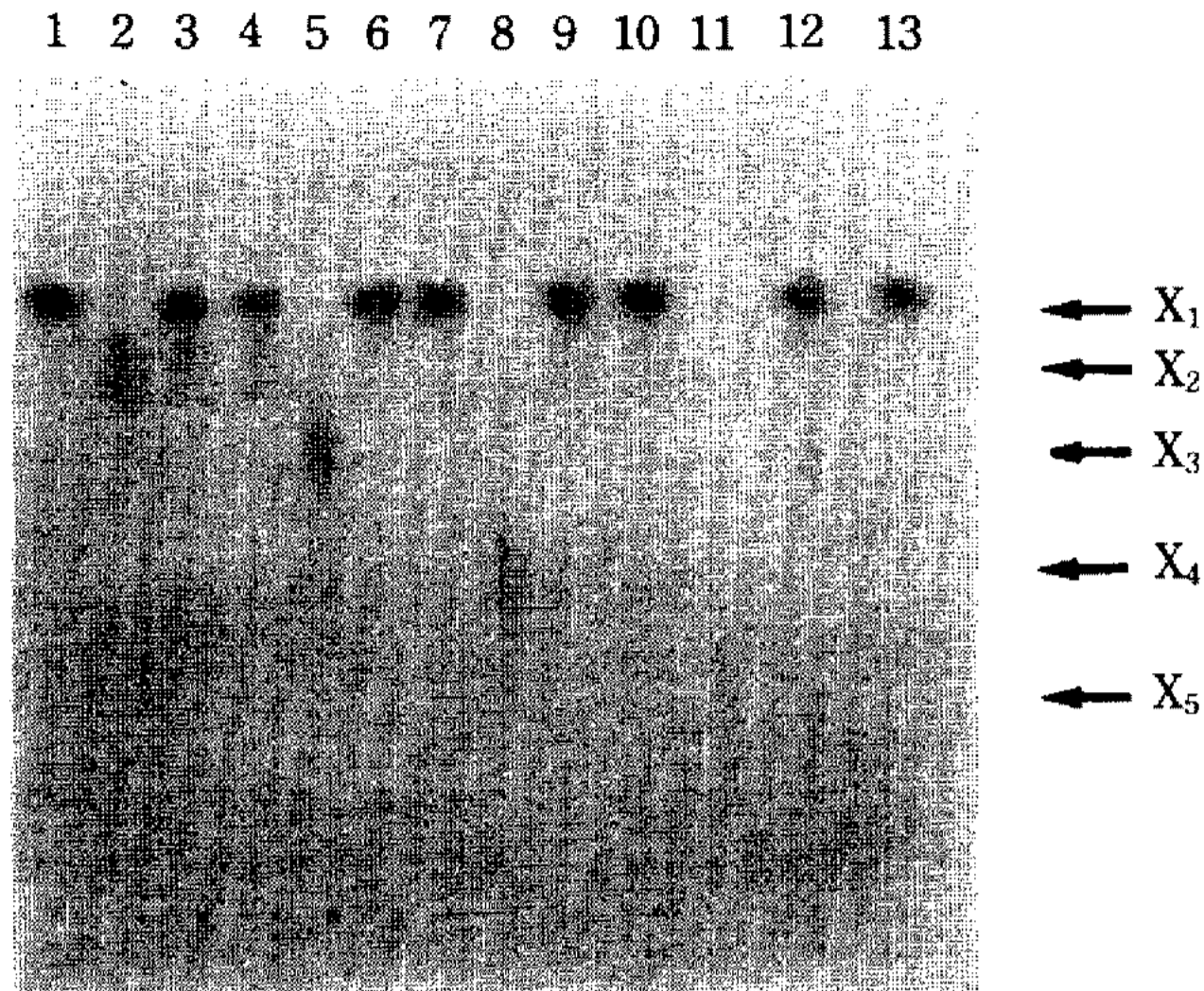
Organism	Specific activity (U/mg protein)	
	$\beta$ -D-Xylosidase	$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase
<i>B. stearothermophilus</i>	0.38	0.12
<i>E. coli</i> HB101(pMG1)	1.23	0.08
<i>E. coli</i> HB101(pMG2)	0.06	—

—; not detected. The cells of *E. coli* HB101 carrying the recombinant plasmid were grown in LB broth supplemented with 50  $\mu$ g/ml ampicillin at 37°C for 15 hours. *B. stearothermophilus* was grown in the optimal medium for  $\beta$ -D-xylosidase production at 45°C for 15 hours.

hybridization 결과를 얻었다. Probe 1은 *Hind*III로 절단한 pBR322 단편과는 hybridization하지 않는 반면 pMG01과 chromosomal DNA 단편에 대해서는 probe DNA와 같은 크기의 DNA 절편(5.4 kb)과 hybridization하였으며, 마찬가지로 probe 2 역시 6.4 kb와 같은 크기의 pMG02 및 chromosomal DNA 절편과 hybridization하였다. 따라서 pMG01과 pMG02에 삽입된  $\beta$ -D-xylosidase 활성과 관련된 두 삽입 절편은 다같이 *B. stearothermophilus* genomic DNA에서 유래된 DNA 절편이라는 것을 확인할 수 있었다.

또한 *Eco*RI 효소의 경우 probe 1은 6.8 kb의 크기를 가진 하나의 chromosomal DNA 절편, probe 2는 원칙적으로 최소한 6개의 band가 나타나야 하지만 본 실험에서는 7.0 kb, 1.7 kb 및 0.8 kb의 크기를 가진 세 DNA 절편과 hybridization하는 것으로 확인되었다. 이와 같은 결과는 아마도 *Eco*RI에 의한 chromosomal DNA의 불완전 분해, 비슷한 크기의 DNA 단편의 중첩, 혹은 관계 DNA 단편의 크기가 0.8 kb보다 작아 gel 상에서 감지가 되지 못했던 것이 원인이 아닌가 추측된다. 한편 *Bam*HI의 경우도 probe 1은 7.8 kb와 6.6 kb의 두 절편, probe 2는 10 kb, 6.7 kb 및 2.7 kb의 세 chromosomal DNA 절편과 hybridization하는 등 두 probe와 chromosomal DNA 사이에서 전혀 다른 hybridization pattern을 보이고 있어 pMG01과 pMG02에 삽입된 두  $\beta$ -D-xylosidase 유전자는 *B. stearothermophilus* genomic DNA 상의 서로 다른 위치에 있는 별개의 유전자라는 것을 확인할 수 있었다.

#### $\beta$ -D-Xylosidase의 효소적 특성



**Fig. 7. Thin-layer chromatogram of the hydrolysates of xylooligosaccharides by the  $\beta$ -D-xylosidase expressed by *E. coli* cells harboring pMG1 or pMG2.**

0.08 units of the enzyme were incubated at 50°C for 5 hours in 110  $\mu$ l reaction mixture containing 0.1  $\mu$ mole xylooligosaccharide and 0.5  $\mu$ mole phosphate buffer (pH 7.0).

1. Standard(xylose, X), 2. Standard(xylobiose, X<sub>2</sub>), 3. Hydrolysate of xylobiose with MG01 origin, 4. Hydrolysate of xylobiose with pMG02 origin, 5. Standard(xylotriose, X<sub>3</sub>), 6. Hydrolysate of xylotriose with pMG01 origin, 7. Hydrolysate of xylotriose with pMG02 origin, 8. Standard(xylotetrose, X<sub>4</sub>), 9. Hydrolysate of xylotetrose with pMG01 origin, 10. Hydrolysate of xylotetrose with pMG02 origin, 11. Standard(xylopentose, X<sub>5</sub>), 12. Hydrolysate of xylopentose with pMG01 origin, 13. Hydrolysate of xylopentose with pMG02 origin.

pMG1과 pMG2 상에 있는 관계 유전자의 발현으로 생산되는  $\beta$ -D-xylosidase의 특성은 아직 구체적으로 조사하지 않았으나 예비 실험 결과에 의하면 활성 최적 온도와 최적 pH에 있어서도 두 효소가 약간의 차이를 보였으며(자료 제공은 하지 않았음), Table 1에 표시되어 있는 바와 같이 pMG1을 가지고 있는 *E. coli* 균주가 pMG2 균주에 비해 현저히 높은  $\beta$ -D-xylosidase 생산량을 보였다. 또한 pMG1 균주가 생산하는 효소는 pMG2 효소와는 달리  $\beta$ -D-xylosidase 활성 뿐만 아니라 비교적 높은  $\alpha$ -D-arabinofuranosidase의 활성도 보이고 있어, *Butyrivibrio firischens*  $\beta$ -D-xylosidase(20)와 같이 xylan 가수분해에 매우 유리할 것으로 생각되는 bifunctional enzyme인 것으로 추측되었다.

그리고 pMG1과 pMG2 효소는 다같이 xylobiose는 물론 xylopentose도 효과적으로 분해할 뿐만 아니라 (Fig. 7 참조), 많은 다른  $\beta$ -D-xylosidase(21)와는 달

리 transferase의 활성을 가지고 있지 않는 등 xylan 분해와 관련하여 매우 흥미 있는 특성을 보이고 있어 앞으로 보다 구체적인 효소 특성 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

토양 분리균인 *B. stearothermophilus* chromosome의 유전자 은행으로부터 *E. coli* HB101 균주에  $\beta$ -D-xylosidase 생산능력을 갖게하는 5.4 kb와 6.4 kb의 두 DNA 절편을 분리, pBR322에 크로닝하여 각각 pMG01과 pMG02의 재조합 플라스미드를 얻었다. 상기 두 *B. stearothermophilus* DNA 절편의 restriction map을 작성하고 이것을 기초로 하여  $\beta$ -D-xylosidase 유전인자의 위치를 확인함과 동시에 pUC18에 subcloning 하여 각각 2.2 kb와 1.0 kb의 DNA 단편이 삽입된  $\beta$ -D-xylosidase 양성의 pMG1과 pMG2를 분리하였다. 상기 두  $\beta$ -D-xylosidase 유전인자는 Southern blotting에 의해서 *B. stearothermophilus*에서 유래된 서로 다른 별개의 유전인자임을 확인할 수 있었다. 또한 두  $\beta$ -D-xylosidase는 다같이 xylobiose, xylotriose, xylotetrose 및 xylopentose를 효율적으로 분해, 주 분해산물로서 다량의 xylose를 생산하였으며, 특히 pMG1 플라스미드상의  $\beta$ -D-xylosidase 유전인자는  $\beta$ -D-xylosidase 활성 뿐만 아니라  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase 활성도 함께 가지고 있는 bifunctional protein으로 추측되었다.

## 감사의 말

본 연구는 동력자원부 에너지관리공단의 대체에너지기술개발사업비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Whistler, R.L. and E.L. Richards. 1970. Hemicelluloses, pp. 447-469. In W. Pigman and D. Hoston (ed.), *The Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*, 2nd ed., Vol. 2A, Academic Press, Inc., New York.
2. Weinstein, L. and A. Peter. 1979. Structure of cell walls. *Plant Physiol.* **63**: 425-432.
3. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
4. Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemi-

- cellulases, their occurrence, purification, properties and applications. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 276-352.
5. Wong, K.K.Y. and L.U.L. Tan. 1988. Multiplicity of xylanase in microorganisms: function and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.
  6. Song, H.S. and Y.J. Choi. 1987. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 289-294.
  7. Bae, S.H. and Y.J. Choi. 1991. Purification and characterization of extracellular xylanase of *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **19**: 592-597.
  8. Bolivar, F. and K. Backman. 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* **68**: 245-280.
  9. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 77-81.
  10. Mitsuishi, M., T. Yamanabe, and M. Yagisawa. 1988. The modes of action of three xylanases from mesophilic fungus strain Y-94 on xylooligosaccharides. *Agri. Biol. Chem.* **52**: 921-928.
  11. Rodriguez, R.L. and R.C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques, An Introduction*. Addison-Wesley Pub.
  12. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
  13. Birhboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
  14. Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, pp. 109-135. In D.M. Glover (ed.), *DNA Cloning*, Vol. I. IRL press, Oxford.
  15. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
  16. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **88**: 503-517.
  17. 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.
  18. Lowry, O.H., N.J. Resebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  19. Wilson, C.M. 1959. Determination of sugars on paper chromatograms. *Anal. Chem.* **31**: 1199-1201.
  20. Utt, E.A., C.K. Eddy, K.F. Keshaw, and L.O. Ingram. 1991. Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1227-1234.
  21. Wood, T.M. 1985. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.* **13**: 407-410.

(Received January 27, 1992)