

Bacillus stearothermophilus Acetyl Xylan Esterase 유전자의 크로닝과 *Escherichia coli*에서의 발현

김인숙 · 조쌍구 · 최용진*
고려대학교 유전공학과

Molecular Cloning and Expression of the Acetyl Xylan Esterase Gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*

Kim, In-Sook, Ssang-Goo Cho and Yong-Jin Choi*

Department of Genetic Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — *Bacillus stearothermophilus* was shown to express multiple xylanolytic enzymes including acetyl xylan esterase. Genomic DNA of the strain partially digested with *Hind*III was ligated into the *Hind*III site of pBR322, and expressed in *E. coli* HB101 cells in order to clone the gene for acetyl xylan esterase. One transformant among 4000 screened formed a clear zone around its colony on the LB agar supplemented with 1.0% tributyrin. The functional clone harbored the recombinant plasmid pKMG5 with an insert of 5.1 kb. Subcloning yielded the recombinant molecule pKMG6 with 3.5 kb *Hind*III fragment derived from the *B. stearothermophilus* chromosomal DNA as determined by restriction enzyme analysis and Southern hybridization. The tributyrin degrading activity produced by the cloned gene also revealed acetyl residue cleavage activity on oat spelt acetyl xylan. The results of substrate specificity confirmed that the esterase from *E. coli* HB101 /pKMG6 was an acetyl xylan esterase.

자연계에서 전체 분포량이 cellulose 다음을 차지하고 있는 중요 biomass 자원인 xylan은(1) β -1,4-polxylose 주 탄소쇄에 acetic acid, arabinose 및 glucuronic acid 등의 다양한 측쇄 분자를 가지고 있을 뿐만 아니라 phenolic coupling에 의해 xylan 분자 또는 xylan과 lignin 분자가 서로 cross-link 되어 있는 등 매우 복잡한 구조를 가지고 있다(2, 3). 따라서 natural xylan 역시 cellulose 못지 않게 효소적 분해에 대해서 강한 저항성을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(4). 이와 같은 natural xylan의 완전 가수분해를 위해서는 β -1,4-interglycosidic linkage 절단 효소인 xylanase와 β -xylosidase는 물론이고 측쇄 결합 내지는 분자 상호간의 cross-linking을 효과적으로 절단할 수 있는 각종 debranching enzymes 즉 acetyl xylan

esterase, α -arabinofuranosidase 및 glucuronidase 등의 협동 작용이 필수적이라고 생각된다. 실제로 이와 같은 협동 작용의 효과를 직접 뒷받침하고 있는 많은 연구 보고가 발표되고 있으며(5-9) 동시에 상기 debranching process가 natural xylan 자원의 효과적 활용에 중요한 한 장애 요인이 되고 있다는 분석 결과도 보고되고 있다(10).

상기한 바와 같이, softwood xylan을 제외한 대다수의 natural xylan은 그 출처에 따라 정도의 차이는 있으나 구성 xylose 잔기가 아세틸화 되어 있는 것이 일반적이며 특히 hardwood xylan과 forage xylan은 구성 xylose 잔기의 50~70%가 아세틸화 되어 있으면서(11) 주요 xylan 분해계 효소로부터 자신을 보호하고 있다는 것이 생체내(*in vivo*) 내지는 생체외(*in vitro*) 실험에 의해 확인된 바 있다(4, 6, 12). 또한 acetyl xylan 기질에 대한 acetyl xylan esterase와 xylanase 혼합 사용의 뚜렷한 가수분해 상승 효과를 빛

Key words: Acetyl xylan esterase, *Bacillus stearothermophilus*, molecular cloning

*Corresponding author

받침하는 실험 결과도 보고되고 있다(6). 본 연구자는 각종 xylan 분해 효소를 세포외로 다량 생산, natural xylan을 매우 효과적으로 분해하는 *Bacillus stearothermophilus* 분리에 성공(13), 본 분리균으로부터 endo-xylanase와 exo-type xylanase로 분류할 수 있는 매우 특이한 β -xylosidase 유전자를 *E. coli*에 크로닝하여 이미 보고한 바 있다(14). 또한 최근에는 상기 균주로부터 acetyl xylan esterase와 α -arabinofuranosidase 활성도 확인, 일차로 acetyl xylan esterase 생산 유전자를 분리 크로닝하였다. 본 연구자가 조사한 바로는 몇 종의 미생물 acetyl xylan esterase에 관한 보고는 있으나 관계 유전자의 분리 크로닝은 본 연구실에서 최초로 그 결과를 여기에 보고한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

Acetyl xylan esterase 유전자 공여체는 토양 분리균인 *Bacillus stearothermophilus*이었고(13) 유전자 크로닝을 위한 숙주세포는 *E. coli* HB101(F⁻, *hsdS20*, *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galL20*, *xy15*, *mt11*, *supE44*)(15), 그리고 cloning vector는 pBR322(16)을 사용하였다. 또한 대조 효소로 사용한 *Pseudomonas fluorescens* carboxylesterase 생산 유전자(pUE892)는 KAIST 유욱준 박사로부터 제공받았다.

사용시약 및 효소

Lysozyme, ribonuclease A, oat spelt xylan 등은 Sigma Co., calf intestinal alkaline phosphatase(CIP)와 Dig DNA Labeling & Detection Kit, test-combinations for food analysis(acetic acid detection용)는 Boehringer Mannheim, Gene Clean kit는 Bio 101 Inc., 그리고 각종 제한효소와 T4 DNA ligase는 한국제철화학 혹은 New England Bio-lab(NEB)으로부터 구입 사용하였다. Nylon membrane은 Amersham제품인 Hybond-N'를 사용하였다.

사용 배지 및 배양 조건

B. stearothermophilus 배양은 본 실험실에서 확립 보고한 바 있는 효소 생산 최적 배지(13)를 사용, 45°C에서, 그리고, *E. coli*는 Luria broth를 사용, 37°C에서 각각 200 strokes/min로 진탕 배양하였다.

형질전환

Chromosomal DNA 분리는 전보(14)에 상술한 Doi(17)의 방법에 따랐으며 plasmid DNA는 rapid alkaline lysis법(18)을 이용하여 분리하였다. 그리고 형질전환은 Simanis 방법(19)에 따라 실시하였다.

Acetyl xylan esterase 유전자 clone의 선별

형질전환체 현탁액을 ampicillin(50 μ g/ml)과 tributyrin(1%)이 첨가된 LB 한천 배지에 도말하고 37°C에서 24시간 배양, 크로닝된 유전자 산물에 의한 tributyrin 분해로 형성되는 colony 주위의 투명환을 확인, 선별하였다(20).

Agarose gel electrophoresis 및 분리 DNA 단편의 회수

Gel electrophoresis는 TAE buffer를 사용한 Maniatis 방법(18)에 따랐으며, agarose gel 상에서 분리된 DNA 단편은 Gene Clean kit를 이용하여 회수하였다.

Southern blotting

Agarose gel 상의 분리 DNA 단편을 Vacuum Blotter(Hoefler scientific instruments, San-francisco)를 이용하여 Hybond-N' membrane으로 옮기고, 전보(14)에 기술한 과정에 따라 DNA hybridization을 실시하였다. 또한 DNA labeling과 detection은 digoxigenin-anti-digoxigenin ELISA 방법(21)에 따랐으며 이 때 사용한 probe DNA는 pKMG6에 삽입된 acetyl xylan esterase 활성과 관계되는 3.5 kb의 DNA 단편과 *HindIII* 절단 λ DNA 단편을 dig labeling한 것이었다.

효소액 조제

E. coli HB101/pKMG6는 50 ml의 ampicillin 첨가 LB 배지에서 37°C, 12시간, 그리고 *B. stearothermophilus*는 50 ml 효소 생산 최적 배지에서 45°C, 18시간 진탕 배양한 후 균체를 모아 인산 완충용액(0.05 M, pH 6.5)으로 일차 씻어낸 다음 같은 완충용액 5 ml에 현탁시켰다. 균체 현탁액은 28 KHz에서 초음파 처리(SUH ILL ultrasonic Co. type K150)하여 균체를 파쇄하고 5000 rpm에서 10분간 원심분리(Sorvall centrifuge, A50 Rotor), 분리된 상등액을 효소액으로 사용하였다.

Chromosomal DNA 및 plasmid DNA의 분리와

Acetyl xylan의 조제

K.G. Johnson 등의 화학적 방법(22)에 따라 시판 oat spelt xylan을 아세틸화시켰다. 즉 250 ml dimethyl sulfoxide에 10 g의 xylan을 서서히 첨가한 후 55°C로 가온, 완전 용해시키고, solid potassium borate를 최종 농도가 0.8%(w/v)되게 첨가하여 같은 온도에서 10분간 잘 혼화시켰다. 완전 혼화가 되면 60°C로 별도 가열시킨 acetic anhydride 200 ml을 상기 용액에 천천히 가해 xylan을 아세틸화시켰으며 반응이 끝난 acetyl xylan은 4°C 증류수 중에서 충분히 투석시킨 다음 동결 건조시켜 사용하였다.

효소 활성 측정 및 단백질 정량

Esterase 활성 측정 : Methylacetylsalicylate(MAS)를 기질로 사용, Iwai 등의 방법(23)에 따라 효소 활성을 측정하였으며 1분 동안에 1 μ mol의 methylsalicylate를 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

Acetylcysteine 활성 측정 : p-Nitrophenylacetate (0.05 M in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 0.1 ml에 동량의 효소액을 가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소량은 1분에 1 μ mol의 nitrophenol을 생성할 수 있는 양을 1 unit으로 정하였다.

Acetyl xylan esterase의 활성 측정 : 10% acetyl xylan 인산 완충용액(0.05 M, pH 6.5)을 약 30초간 vortex mixer로 혼합한 다음 효소 반응의 기질로 사용하였다. 기질 용액 0.5 ml에 동량의 효소액을 가하여 1시간 동안 반응시킨 후, 끓는 물에 약 2분간 방치, 반응을 정지시켰다. 이 때 HB101/pKMG6와 *B. stearothermophilus* 효소액의 경우는 예비 실험에서 효소 활성이 가장 높게 나타난 45°C, pH 6.5에서, HB101/pUE892와 HB101/pBR322 효소액의 경우는 37°C, pH 6.5에서 반응을 시켰으며, 유리 생성되는 acetic acid의 양을 효소(Boehringer Test Combination, Mannheim, F. R. G.)반응으로 측정, 효소 활성을 계산하였다. 즉 각 반응 조건에서 1분에 1 μ mol의 acetic acid를 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

효소액 중의 단백질 정량 : Bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용한 Lowry법(24)을 이용, 측정하였다.

결과 및 고찰

Acetyl xylan esterase 유전자의 크로닝

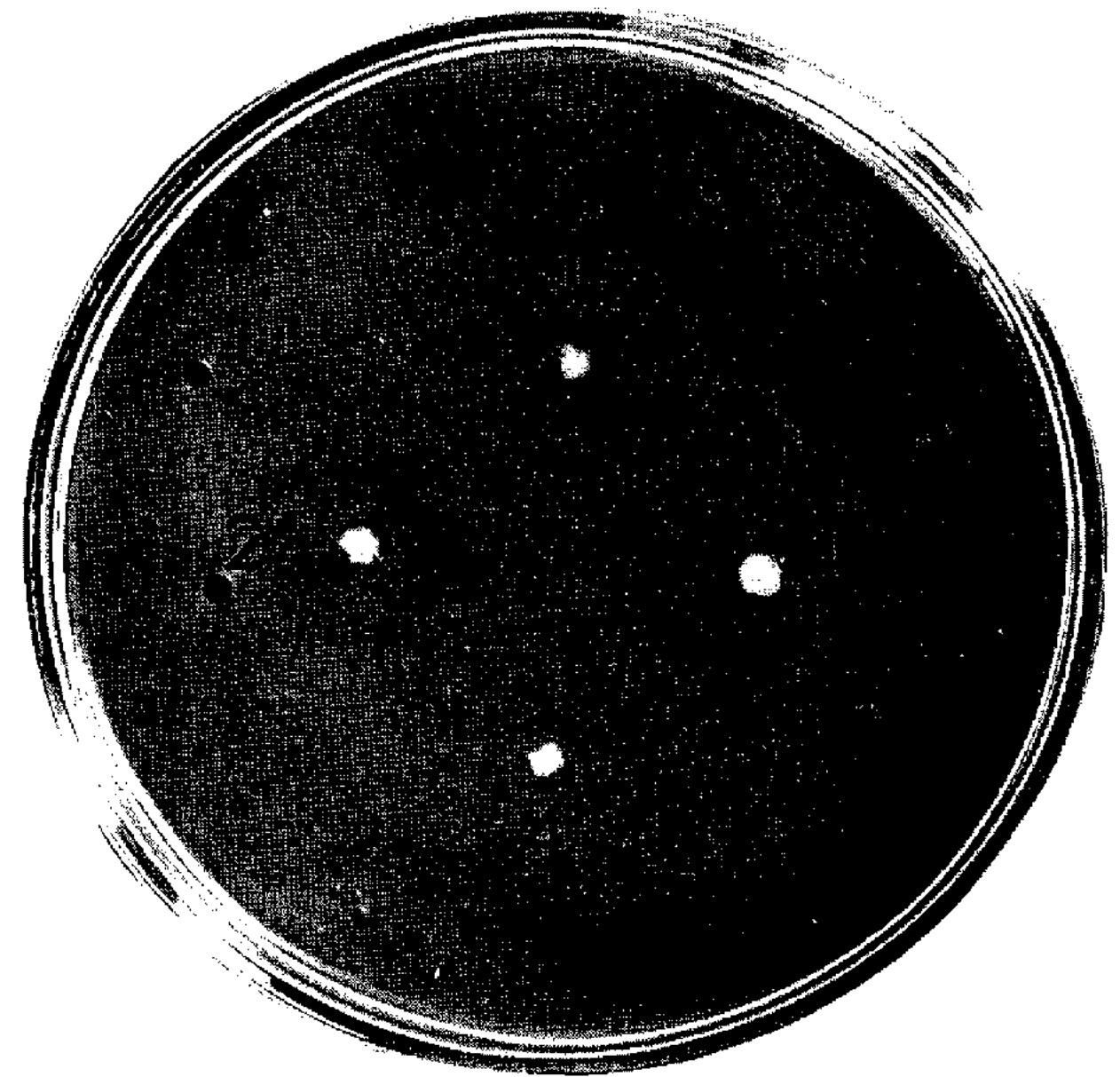


Fig. 1. Expression of tributyrin degradation activity of the *Bacillus stearothermophilus* gene in *E. coli* HB101. (Incubation was done at 45°C for 12 hours for *Bacillus stearothermophilus* growth after preincubation at 37°C for 18 hrs for *E. coli* strains).

1; *Bacillus stearothermophilus*, 2; *E. coli* HB101/pKMG6, 3; *E. coli* HB101/pBR322, 4; *E. coli* HB101.

*B. stearothermophilus*의 chromosomal DNA를 *Hind*III로 부분 절단하여 분리 회수한 3~9 kb의 DNA 단편을 *Hind*III로 완전 절단한 후 CIP 처리한 pBR322 DNA에 ligation시켜 *E. coli* HB101을 형질전환시켰다. 형질전환체는 ampicillin과 tributyrin이 첨가된 LB 한천배지를 이용, tributyrin 분해 활성을 검색한 결과, 약 4000개의 colony 중 한 개의 colony가 주위에 뚜렷한 투명환을 형성하였다. 이 균주를 분리, tributyrin 분해 활성 관련 유전자를 조사해 본 결과, 본 형질전환체가 약 5.1 kb의 삽입 DNA를 가지고 있는 재조합 plasmid를 가지고 있다는 것을 확인하였으며, 이 plasmid를 pKMG5로 명명하였다. 또한 pKMG5의 5.1 kb 삽입 DNA는 분석결과 1개의 내부 *Hind*III site를 가지고 있음이 밝혀져 subcloning을 실시하여 HB101/pKMG5와 같은 크기의 투명환을 형성하는 재조합 균주로부터 3.5 kb의 삽입 DNA를 가진 새로운 재조합 plasmid(pKMG6)를 분리할 수 있었다(Fig. 1, 2 참조).

크로닝한 유전자 생산 효소의 확인

Tributyrin 기질을 가수분해, 투명환을 형성할 수 있는 효소는 lipase와 esterase로 대별될 수 있다.

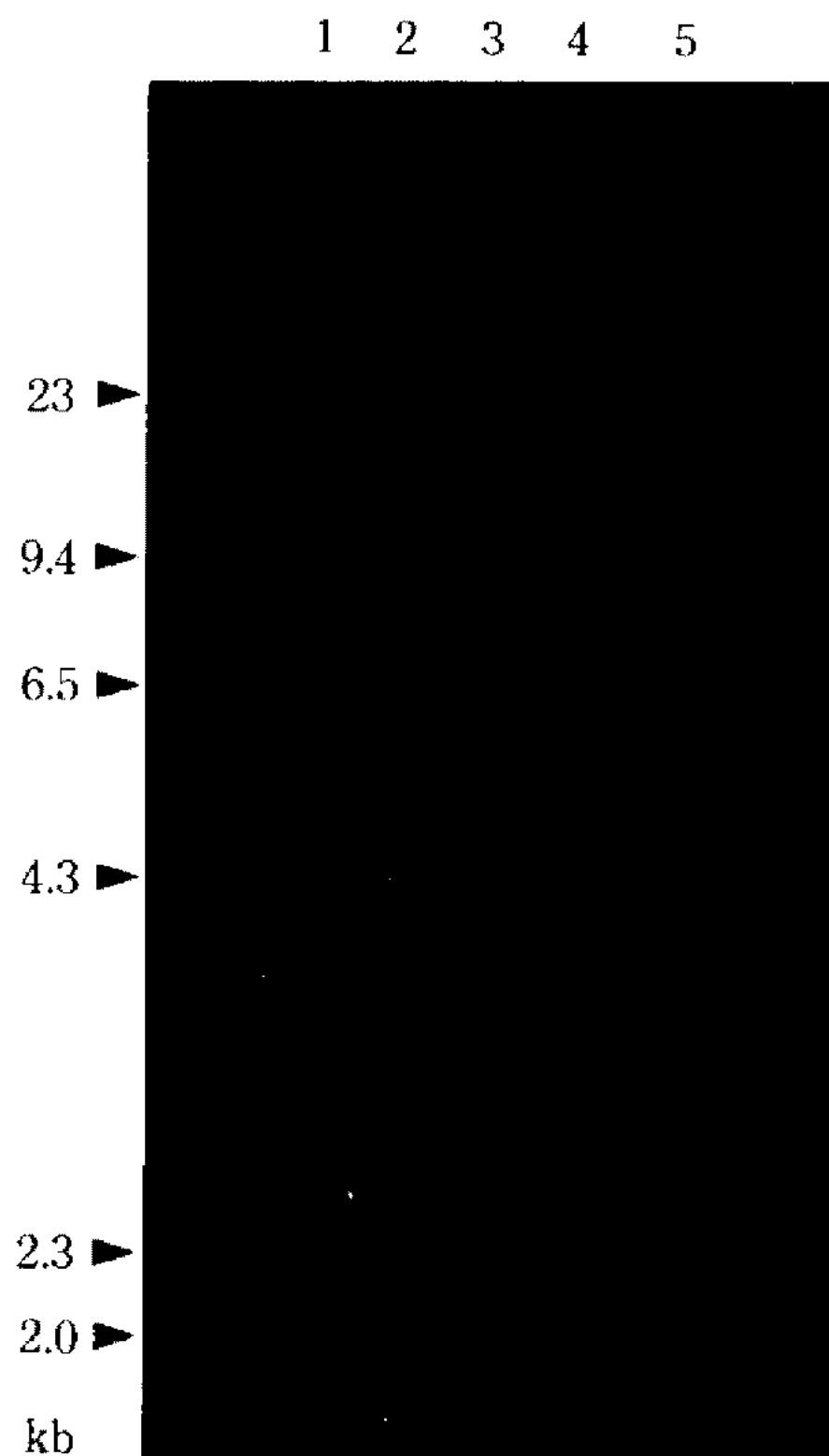


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic analysis of the recombinant plasmide.

Lanes 1 and 5; *Hind*III digests of λ DNA used as size markers, Lane 2; *Hind*III digests of pKMG5, Lane 3; *Hind*III digests of pKMG6, Lane 4; *Hind*III digest of pBR322.

그러나 pKMG6에 크로닝된 유전자 산물은 Table 1에서 보는 바와 같이 tributyrin 외에도 methylacetylsalicylate와 ρ -Nitrophenylacetate와 같은 수용성 기질에 대해서도 높은 활성을 나타내었다. 따라서 pKMG6와 관련된 tributyrin 분해 활성은 일종의 esterase임을 확인할 수 있었다. 또한 본 esterase는 대조 실험에 사용한 *Pseudomonas fluorescens* Carboxylesterase와는 달리 acetyl xylan에도 작용, 57.6 mU/mg의 비교적 높은 비활성을 보이고 있어(Table 2 참조), esterase 중에서도 acetyl xylan esterase로 최종 분류할 수 있었으며 앞으로 acetyl xylan esterase 생산 유전자는 물론 유전자 산물인 acetyl xylan esterase의 분자 수준에서의 특성 내지는 세포내 기능 규명과 관련하여 큰 기대를 갖게 한다.

한편, 현재 *Fibrobacter succinogenes*(25), *Butyrivibrio fibrisolvens*(26), *Streptomyces flavogriseus*(22, 27), *Streptomyces olivochromogenes*(22, 29) 및 *Bacillus subtilis*(29) 등의 세균, *Trichoderma reesei*(28,29), *Aspergillus awamori* 및 *Fusarium oxysporum*(29) 등의 진

Table 1. Esterase activities of the cell-free extract from *E. coli* HB101 containing recombinant plasmid pKMG6

Substrate	Esterase activity (Units/mg protein)
MAS	391.0
ρ -NPA	24.0

*The cell-free extract was prepared as described in Materials and Methods.

**The enzyme reaction was carried out at 37°C for 30 minutes in the reaction mixture containing 50 μ l of enzyme solution and 3 ml of 0.1 M Methyl acetylsalicylate (MAS) or 100 μ l of enzyme solution and the same volume of 0.05 M ρ -Nitrophenylacetate (ρ -NPA).

Table 2. Specific activity of the cloned acetyl xylan esterase on oat spelt acetyl xylan

Strains	Specific activity ² (mUnits/mg)
<i>E. coli</i> HB101/pBR322	0.9
<i>E. coli</i> HB101/pUE892 ¹	5.6
<i>E. coli</i> HB101/pKMG6	57.6
<i>B. stearothermophilus</i>	301.5

¹pUE892 was the recombinant plasmid containing the *P. fluorescens* gene for carboxylesterase.

²Enzyme assay was done by incubating 0.5 ml of the cell-free extract with the same volume of 10% oat spelt acetyl xylan suspension in phosphate buffer (0.05 M, pH 6.5) at 37°C for HB101/pBR322 and HB101/pUE892 and 45°C for HB101/pKMG6 and *B. stearothermophilus* for 60 minutes.

균류와 같은 각종 미생물로부터 acetyl xylan esterase의 생산이 보고되고 있으나 효소 생산 조건 내지는 효소 활성 표현 방법이 각 균주마다 달라 본 효소 활성과의 정확한 비교 분석은 불가능하였다. 그러나 본 acetyl xylan esterase 생산 유전자 공여 균주인 *B. stearothermophilus*의 경우는 HB101/pKMG6 균주에 비해 약 5.2배의 높은 효소 활성을 나타내었다. 이와 같은 *B. stearothermophilus*의 높은 acetyl xylan esterase 활성은 효소 생산 조건의 차이, 효소액 중 공존하고 있는 xylanase와 β -xylosidase, 기타 xylan 분해계 효소와의 어떤 형태의 협동 작용, 또는 본 실험에서 크로닝한 유전자 외에 또 다른 acetyl xylan esterase 생산 유전자의 존재 등의 원인을 생각할 수 있으나 특히 세번째 원인일 가능성이 크다고 판단, 현재 또 다른 새로운 관계 유전자의 분리, 크로닝 작업을 진행 중에 있다.

재조합 plasmid의 제한 효소지도

pKMG6에 삽입된 3.5 kb 외래 DNA를 *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PvuII* 및 *SmaI* 등과 같은 Six-base cut 제한 효소를 사용하여 단독, 이중 내지는 삼중 처리하고, 이 때 얻어진 DNA 단편을 agarose 전기영동을 통하여 분석, 3.5 kb 외래 DNA의 제한 효소 지도를 작성하였다. Fig. 3에 표시되어 있는 바와 같이 pKMG6 삽입 DNA 내에는 *EcoRI*, *BamHI*, 그리고 *PvuII*

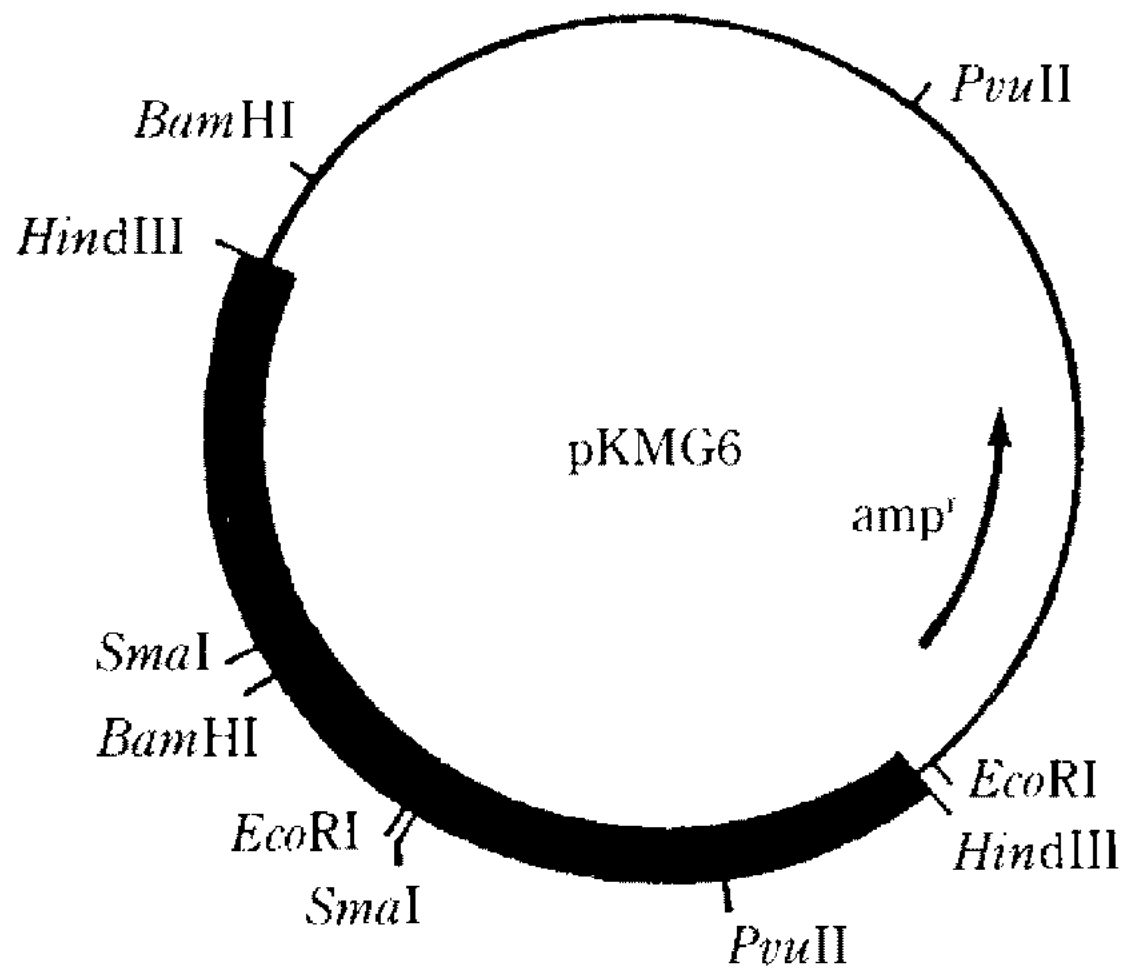


Fig. 3. Restriction map of pKMG6.

The thick line represents 3.5 kb foreign DNA and the thin line indicates pBR322.

site가 각각 하나씩 있고 두 개의 *SmaI* site가 있어 앞으로 acetyl xylan esterase 유전자 조작에 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

Acetyl xylan esterase 유전자의 유래

pKMG6에 크로닝된 acetyl xylan esterase 생산 유전자의 유래를 확인하기 위하여 pKMG6에 삽입된 3.5 kb DNA를 Dig-labeling하여 얻은 probe DNA와 *HindIII* 또는 *EcoRI*으로 완전 절단한 *B. stearothermophilus* chromosomal DNA 단편을 hybridization시켜 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 상기 probe DNA는 실험 대조로 사용한 pBR322 DNA와는 hybridization하지 않았으나 *HindIII*로 절단한 pKMG6 DNA와 chromosomal DNA 단편과는 probe DNA와 같은 크기의 위치에서 단일 hybridization band를 나타내었다. 또한 *EcoRI*으로 처리한 chromosomal DNA와는 예상대로 두 개의 hybridization bands를 생성함으로써 pKMG6내에 삽입된 acetyl xylan esterase 활성화와 관계된 3.5 kb 외래 DNA는 *B. stearothermophilus*의 genomic DNA에서 유래된 것임을 확인할 수 있었다. 한편, lane 4와 5의 약 4.3 kb 위치에 있는 약한 DNA band는 probe 제작시 불순물 형태로 극소량 혼입, labeling된 pBR322 DNA 단편에 기인되는 것으로 추측된다.

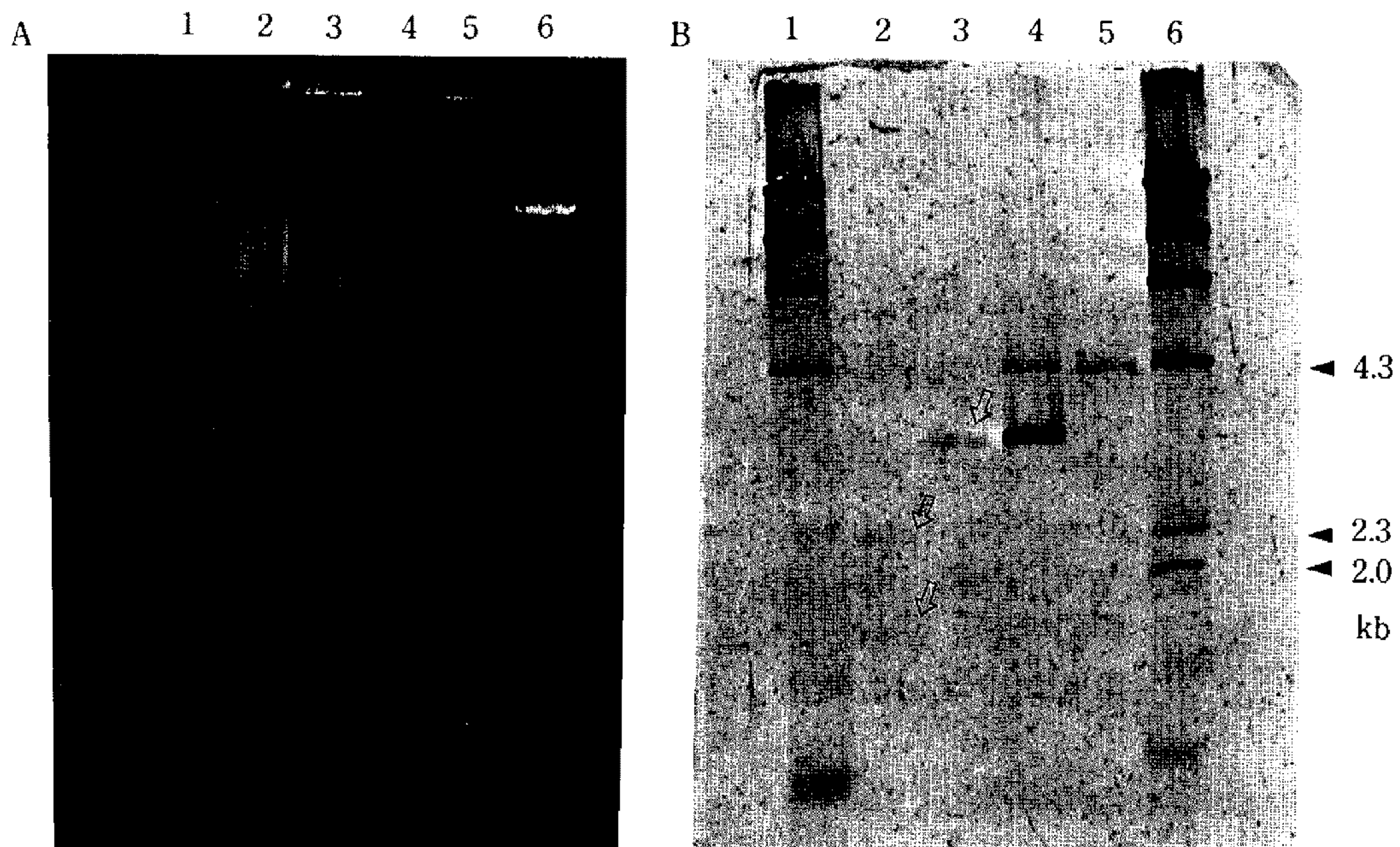


Fig. 4. Southern hybridization of *Bacillus stearothermophilus* genomic DNA with random-primed DNA synthesized from the pKMG6 insert DNA (A: DNA electrophoretic patterns. B: Southern blot patterns).

Lanes 1 and 6; λ DNA digested with *HindIII*, Lane 2; Genomic DNA digested with *EcoRI*, Lane 3; Genomic DNA digested with *HindIII*, Lane 4; pKMG6 digested with *HindIII*, Lane 5; pBR322 digested with *HindIII*.

요 약

토양에서 분리한 강력한 xylan 분해 균주인 *Bacillus stearothermophilus*의 HindIII 절단 genomic DNA 단편을 pBR322에 크로닝하여 약 4000개의 *E. coli* HB 101 형질전환체를 얻었으며 이 중 한 개의 형질전환체가 tributyrin 분해능을 나타내었다. 본 연구에서는 상기 형질전환체를 선별, tributyrin 분해 활성 관련 유전자를 조사 분석하였던 바 본 형질전환체가 tributyrin 분해능과 관련된 약 5.1 kb의 외래 DNA가 삽입된 재조합 plasmid를 가지고 있음을 확인하고 이 plasmid를 pKMG5로 명명하였다. 다음 5.1 kb 삽입 DNA 상의 restriction site를 결정하고 subcloning을 실시하여 높은 tributyrin 분해 활성을 나타내는 새로운 재조합 균주로부터 3.5 kb의 외래 DNA를 가지는 pKMG6를 분리하였다. 또한 pKMG6에 삽입된 tributyrin 분해 활성 관련 상기 3.5 kb 외래 DNA는 Southern blotting 실험 결과, *B. stearothermophilus* chromosome 유래의 DNA 단편임을 확인할 수 있었으며 동시에 삽입 DNA 단편상의 tributyrin 분해 활성 관련 유전자의 발현 산물이 일종의 acetyl xylan esterase로 분류할 수 있는 xylan 분해계 효소임을 알았다.

감사의 말

본 연구는 교육부 학술연구조성비(유전공학연구)로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases, their occurrence, purification, properties and applications. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 277-352.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**:286-290.
- Mueller-Harvey, I., R.D. Hartley, P.J. Harris, and E.H. Curzon. 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* **148**: 71-85.
- Grohmann, K., D.J. Mitchell, M.E. Himmel, B.E. Dale, and H.A. Schroeder. 1989. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**: 45-61.
- Biely, P., J. Puls, and H. Schneider. 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* **186**: 80-84.
- Biely, P., C.R. MacKenzie, J. Puls, and H. Schneider. 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetyl xylan. *Bio/technology.* **4**: 731-733.
- Poutanen, K., J. Puls, and M. Linko. 1986. Hydrolysis of steamed birchwood hemicellulose by enzymes produced by *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 487-490.
- Puls, J., O. Schmidt, and C. Granzow. 1987. α -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 83-88.
- Ross, N.W., K.G. Johnson, C. Braun, C.R. MacKenzie, and H. Schneider. 1992. Enzymic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complexes from *Populus deltoides*: Effects of combination of β -mannanases, xylanase, and acetyl xylan esterase. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 90-94.
- Chesson, A., A.H. Gordon, and J.A. Lomax. 1983. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* **34**: 1330-1340.
- Lindberg, B., K.G. Rosell, and S. Svensson. 1973. Positions of the O-acetyl groups in pine glucomannan. *Svensk Papperstid.* **76**: 383-384.
- Bacon, J.S.D., A. Chesson, and A.H. Gordon. 1981. Deacetylation and enhancement of digestibility. *Agric. Environ.* **6**: 115-126.
- Song, H.S. and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
- 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.* **20**:136-142.
- Bolivar, F. and K. Backman. 1979. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* **68**: 245-280.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 77-81.
- Rodriguez, R.L. and R.C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques, An Introduction*. Addison-Wesley Pub.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Hanahan, K. 1985. Techniques for Transforma-

- tion of *E. coli*, pp. 109-135. In, D.M. Glover (ed.), DNA Cloning, Vol. 1, IRL Press, Oxford.
20. Kugimiya, W., Y. Otani, Y. Hashimoto, and Y. Takagi. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of the lipase gene from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**: 185-190.
 21. Anthony, C.F. and L.M. James. 1985. Nonradioactive hybridization probe prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucl. Acids Res.* **13**: 745-761.
 22. Johnson, K.G., J.D. Fontana, and C.R. MacKenzie. 1988. Measurement of acetyl xylan esterase in *Streptomyces*. *Meth. Enzymol.* **160**: 551-560.
 23. Iwai, M., S. Okumura, E.L. de Leal, and Y. Tsujisaka. 1983. Purification of four esterases from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1865-1868.
 24. 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.
 25. McDermid, K.P., C.R. MacKenzie, and C.W. Forsberg. 1990. Esterase activities of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 127-132.
 26. Hespell, R.B. and P.J. O'Bryan-Shah. 1988. Esterase activities in *Butyrivibrio fibrisolvens* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1917-1922.
 27. MacKenzie, C.R., D. Bilous, H. Schneider, and K.G. Johnson. 1987. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2835-2839.
 28. Poutanen, K. and M. Sundberg. 1988. An acetyl esterase of *Trichoderma reesei* and its role in the hydrolysis of acetyl xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 419-424.
 29. Poutanen, K., M. Rättö, J. Puls, and L. Viikari. 1987. Evaluation of different microbial xylanolytic systems. *J. Biotechnol.* **6**: 49-60.

(Received October 18, 1993)