

*Bacillus stearothermophilus*로부터 α -L-Arabinofuranosidase 유전자의 클로닝 및 *Escherichia coli*에서의 발현

엄수정 · 김희선 · 조쌍구 · 최용진*
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Molecular Cloning and Expression of the α -L-Arabinofuranosidase Gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*

Eom, Soo-Jung, Hee-Sun Kim, Ssang-Goo Cho and Yong-Jin Choi*

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

Abstract — The *Bacillus stearothermophilus* *arfI* gene encoding α -arabinofuranosidase was isolated from the genomic library, cloned into pBR322, and subsequently transferred into the *Escherichia coli* HB101. The recombinant *E. coli* was selected from approximately 10,000 transformants screened by making use of its ability to produce a yellow pigment around the colony on the selective medium supplemented with *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside (pNPAf), a chromogenic substrate. The functional clone was found to harbor a recombinant plasmid, pKMG11 with an insertion of about 5 kb derived from the *B. stearothermophilus* chromosomal DNA. Identity of the *arfI* gene on the insert DNA was confirmed by a zymogram with 4-methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranoside as the enzyme substrate. The α -arabinofuranosidase from the recombinant *E. coli* strain showed very high substrate specificity; the enzyme displayed high activity only with pNPAf among many other *p*- or *o*-nitrophenyl derivatives of several sugars, and acted only on arabinoxylan among various natural arabinose containing polysaccharides tested.

식물 세포벽의 주요 구성 성분중의 하나인 xylan은 β -D-1,4-xylopyranoside 주 탄소골격에 acetyl, arabinosyl 및 glucuronosyl 등의 잔기로 구성된 각종 측쇄결합을 가지고 있는 매우 복잡한 화학구조의 복합 다당류이다(1-3). 더욱이 생체내에서의 xylan 분자는 구성 arabinose 잔기가 주탄소쇄 말단에 부착되어 있는 경우도 있으나 ferulic acid 혹은 coumaric acid와의 ester 결합을 통하여 xylan 분자 상호간 또는 lignin 성분과 cross-link 되어 있다고 한다. Xylan 분자의 상기 각종 측쇄 결합과 arabinose 잔기를 통한 분자상호간 또는 lignocellulose 화합물과의 cross-linking 결합은 β -1,4-xylopyranoside 주결합에 대한 xylanase와 β -xylosidase의 물리적 접근을 제한, 그 결과 생물학적 분해에 대한 보다 큰 저항성을 나타내고 있는 것으로 분석 보고되고 있다(4, 5). 실제로, phenolic carbohydrate complex를 구성하고 있는 xylan 성분의 가수분해 정도는 구성 arabinose와 phenolic

acid의 함량과 정확하게 반비례적인 관계를 보이고 있다는 실험결과도 보고되고 있다(24). 그러므로 일반 native xylan은 물론이고 연질목재(soft woods)와 초본식물(grasses) xylan과 같이 다량의 arabinose 잔기를 포함하고 있는 arabinoxylan의 효율적 완전 가수분해를 위해서는 xylan 주탄소 골격절단에 필요한 효소는 물론이고 Non-xylose 성분 가수분해 효소 특히 α -arabinofuranosidase는 절대적으로 필요한 효소인 것으로 판단된다(6-10).

본 연구실에서는 효율적인 xylan 분해 시스템 개발과 관련된 다년간의 연구로 각종 xylan 분해 효소를 세포 내외로 다량 생산하는 강력한 xylan 분해 균주인 *Bacillus stearothermophilus*를 분리하고(11), 이 균주로부터 xylanase(12)와 β -xylosidase(13) 생산 유전자는 물론이고 중요 탈측쇄효소중의 하나인 acetyl xylan esterase(14) 생산 유전자도 분리 클로닝하고 유전자 및 유전자 산물의 특성을 조사 분석하여 그 결과의 일부는 이미 보고한 바 있다.

본 연구에서는 앞에서 언급한 바와 같이 native xylan 특히 arabinoxylan의 완전가수분해에 극히 중요한

Key words: α -Arabinofuranosidase, *Bacillus stearothermophilus*, molecular cloning

*Corresponding author

역할을 하는 높은 기질특이성을 가진 α -arabinofuranosidase 생산유전자를 *B. stearothermophilus* chromosome으로부터 분리 클로닝하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 플라스미드

α -L-Arabinofuranosidase 생산 유전자 공여체는 토양에서 분리한 *Bacillus stearothermophilus*(11), 유전자 클로닝에 이용한 숙주세포는 *E. coli* HB101(F⁻, *hdsS20*, *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xyl5*, *mt11*, *supE44*)(15), 그리고 클로닝 vector로는 pBR322(16)를 이용하였다.

사용시약 및 효소

Lysozyme, ribonuclease A, oat spelt xylan, 4-methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranoside, nitrophenyl-glycosides 등은 Sigma Co., rye arabinoxylan은 Megazyme Co., CIP 및 DNA labeling and detection kit는 Boehringer Mannheim(BM), Gene Clean II kit는 Bio 101 Inc., 각종 제한효소와 T4 DNA ligase는 한국 제철 화학, New England Biolab(NEB) 또는 Toyobo사로부터 구입하였다. Nylon membrane은 Amersham 제품인 Hybond-N⁺를 사용하였으며 기타 본 연구에 사용한 일반 시약류는 시판되는 일급 이상의 분석용이었다.

사용배지 및 배양조건

B. stearothermophilus 배양은 본 실험실에서 조사 확립한 xylanase 생산 최적 배지(11)를 사용, 45°C에서 진탕배양하였으며 *E. coli*는 LB 배지를 사용, 37°C에서 진탕배양하였다. Ampicillin은 필요에 따라 50 µg/ml의 최종농도로 첨가하였다.

Chromosomal DNA와 플라스미드의 분리 및 형질전환

Chromosomal DNA는 전보(13)에 상술한 Doi 방법(18)에 따라 분리하였으며 플라스미드는 rapid alkaline lysis 법(19) 또는 PEG 침전방법을 이용하여 분리 정제하였다. 그리고 형질전환은 Simanis 방법(20)에 따라 실시하였다.

Agarose gel electrophoresis 및 분리 DNA 단편의 회수

Gel electrophoresis는 TAE buffer를 사용한 Ma-

niatis 방법(19)을 따랐으며, agarose gel 상의 분리 DNA 단편은 Gene Clean II kit를 이용하여 회수하였다.

α -L-Arabinofuranosidase 유전자 clone의 선별

Ampicillin을 포함한 LB 한천배지에 200 µl의 10 mM *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside 용액(pH 6.5, 50 mM phosphate 용액)을 도달한 후 형질전환체 현탁액을 접종하고, 37°C에서 18시간 배양하여 클로닝된 *arf* 유전자 산물에 의해 노란색을 띠는 colony를 확인 선별하였다.

Southern blotting

Agarose gel 상의 DNA 단편은 capillary blot transfer 법에 따라 Hybond-N⁺ membrane으로 옮기고, 전보(13)에 상술한 과정에 따라 DNA hybridization 실험을 실시하였다. DNA labeling과 detection은 digoxigenin-anti-digoxigenin ELISA 방법(21)에 따랐고, 이때 probe DNA로는 pKMG11에 삽입되어 있는 5 kb의 *B. stearothermophilus*의 α -arabinofuranosidase 활성 관련 DNA 단편과 *BstEII* 절단 λ DNA 단편을 dig-labeling 하여 이용하였다.

효소액 조제

형질전환체는 ampicillin을 첨가한 50 ml LB 배지에서 37°C, 18시간, *B. stearothermophilus*는 xylanase 생산 최적배지에서 45°C, 22시간 진탕배양하였다. 5000 rpm에서 10분간 원심분리(Sorvall centrifuge, A50 Rotor)하여 균체를 분리 제거해서 얻은 상등액을 세포의 효소액으로 이용하였고, 분리 균체는 인산완충용액(50 mM, pH 6.5)으로 세척하고, 소량의 동일 완충용액에 현탁한 다음 28 kHz에서 3분간 초음파처리(SUH ILL Ultrasonic Co. type KSK150) 한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 세포내 효소액으로 이용하였다.

효소활성 측정 및 단백질 정량

각종 nitrophenyl-glycosides 기질 10 mM 완충용액(50 mM phosphate buffer, pH 6.5) 100 µl에 동량의 효소액을 첨가하여 45°C에서 20분간 반응시키고 0.6 M Na₂CO₃ 2 ml로 반응 정지시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 arabinogalactan, gum arabic, arabinan에 대한 반응은 DNS 법(23)을 이용하였다.

효소활성은 1분에 1 µmole의 nitrophenol을 생성할 수 있는 양을 1 unit으로 표시하였다. 단백질 정량은

bovine serum albumin을 표준단백질로 사용한 Lowry 법(22)을 이용하였다.

Zymogram

효소 시료액은 동일한 6% nondenaturing polyacrylamide gel 두개를 이용하여 전기영동을 실시, 분리한 다음, 한 gel은 coomassie blue 염색을 하여 단백질 분리대를 관찰하였고, 다른 한 gel은 50 mM 인산완충용액(pH 6.5)으로 세척한 다음 5 mM 4-methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranoside agarose gel을 접촉시켜 45°C 에서 적정시간 반응시킨 후 효소 반응에 의해 생산되는 효소 활성대를 UV 조사하여 관찰하였다(17).

Arabinoxylan 분해생성물의 분석

1% rye arabinoxylan 인산완충용액(50 mM phosphate buffer, pH 6.5) 500 μ l에 동량의 효소액(α -arabinofuranosidase 단독 또는 xylanase와 α -arabinofuranosidase 혼합액)을 첨가, 45°C 에서 24시간 반응시킨 후 4배 농축하여 high-performance liquid chromatography(HPLC)로 분석하였다.

HPLC는 Waters사 제품(Pump ; Model 510, Integrator ; Model 741, Column ; Carbohydrate Analysis Column(3.9 \times 300 mm), Detector ; Differential Refractometer R401)을 이용하였고, acetonitrile과 water의 혼합물(70 : 30 ; v/v)을 mobile phase로 사용하여 1.5 ml/min의 속도로 용출시켜 분석하였다.

결과 및 고찰

Arabinofuranosidase 유전자의 클로닝

B. stearothermophilus chromosomal DNA를 *EcoRI*으로 부분절단하여 3~9 kb의 DNA 단편을 분리 회수하고 *EcoRI*으로 완전 절단한 후 CIP 처리한 pBR322 DNA와 ligation 시켜 *E. coli* HB101을 형질전환시켰다. Ampicillin을 첨가하고 *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside를 도말한 LB 한천배지를 α -arabinofuranosidase 유전자 클론의 검색용 배지로 이용하여 37°C 에서 18시간 정도 배양하여 얻은 약 10,000 개 전후의 형질전환체로부터 한 형질전환체 colony 주위에서 노란색 환을 관찰할 수 있었다(Fig. 1 참조).

노란색 환을 형성한 상기 형질전환체는 순수 분리한 다음 플라스미드를 분리하여 분석해 본 결과 Fig. 2와 같이 5 kb 정도의 외래 DNA가 삽입된 재조합 플라스미드(pKMG11으로 명명)를 가지고 있음을 확인하고 5 kb 삽입 DNA 상의 *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside 분해 활성과 관련된 α -arabinofuranosidase 유전자를 *arfI*이라고 명명하였다.

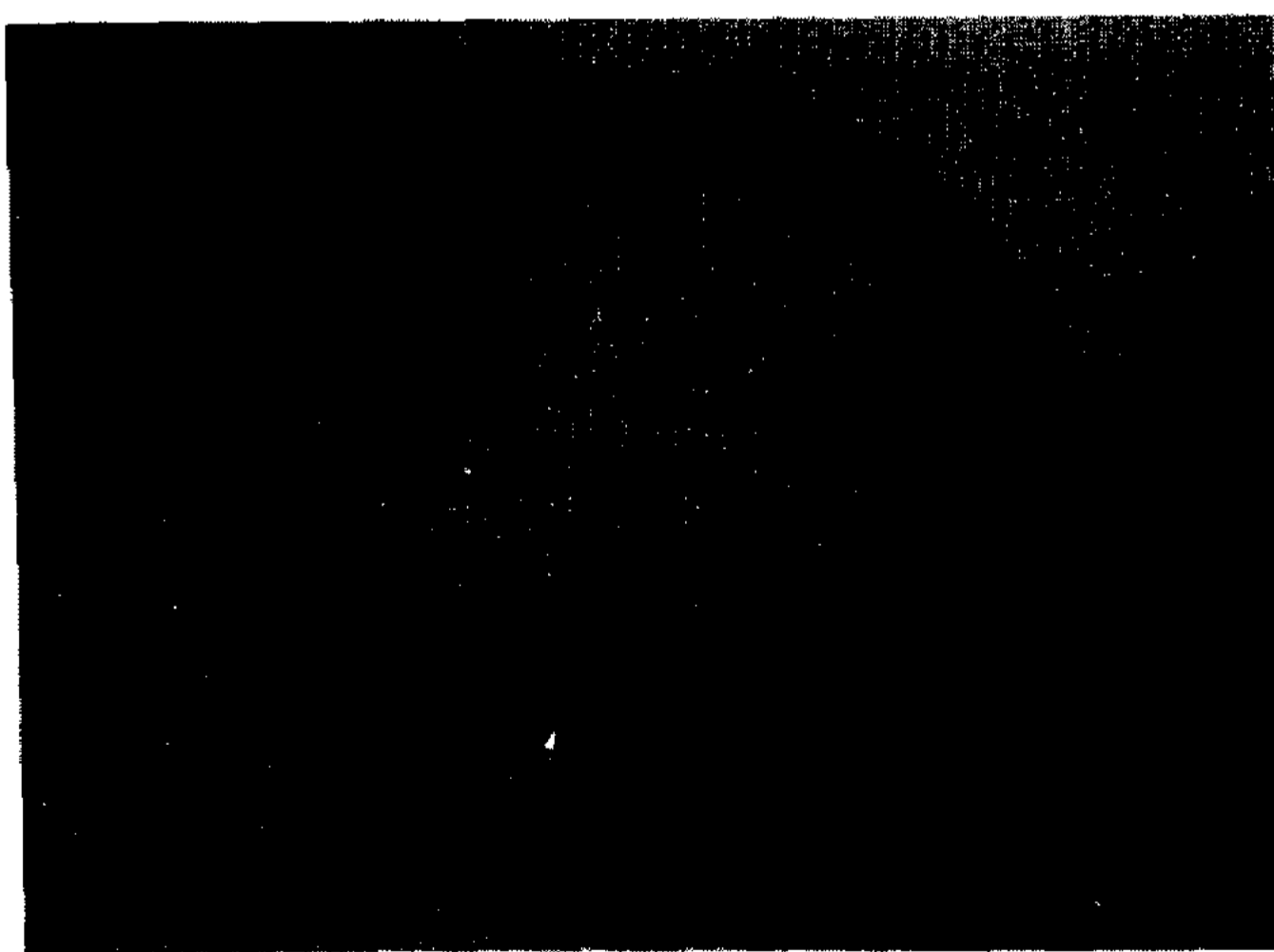


Fig. 1. Expression of α -L-arabinofuranosidase activity of the *Bacillus stearothermophilus* gene in *E. coli* HB101. Incubation of *E. coli* was done at 37°C for 18 hours followed by that of *B. stearothermophilus* at 45°C for 18 hours.
1: *Bacillus stearothermophilus*, 2: *E. coli* HB101/pKMG11, 3: *E. coli* HB101/pBR322

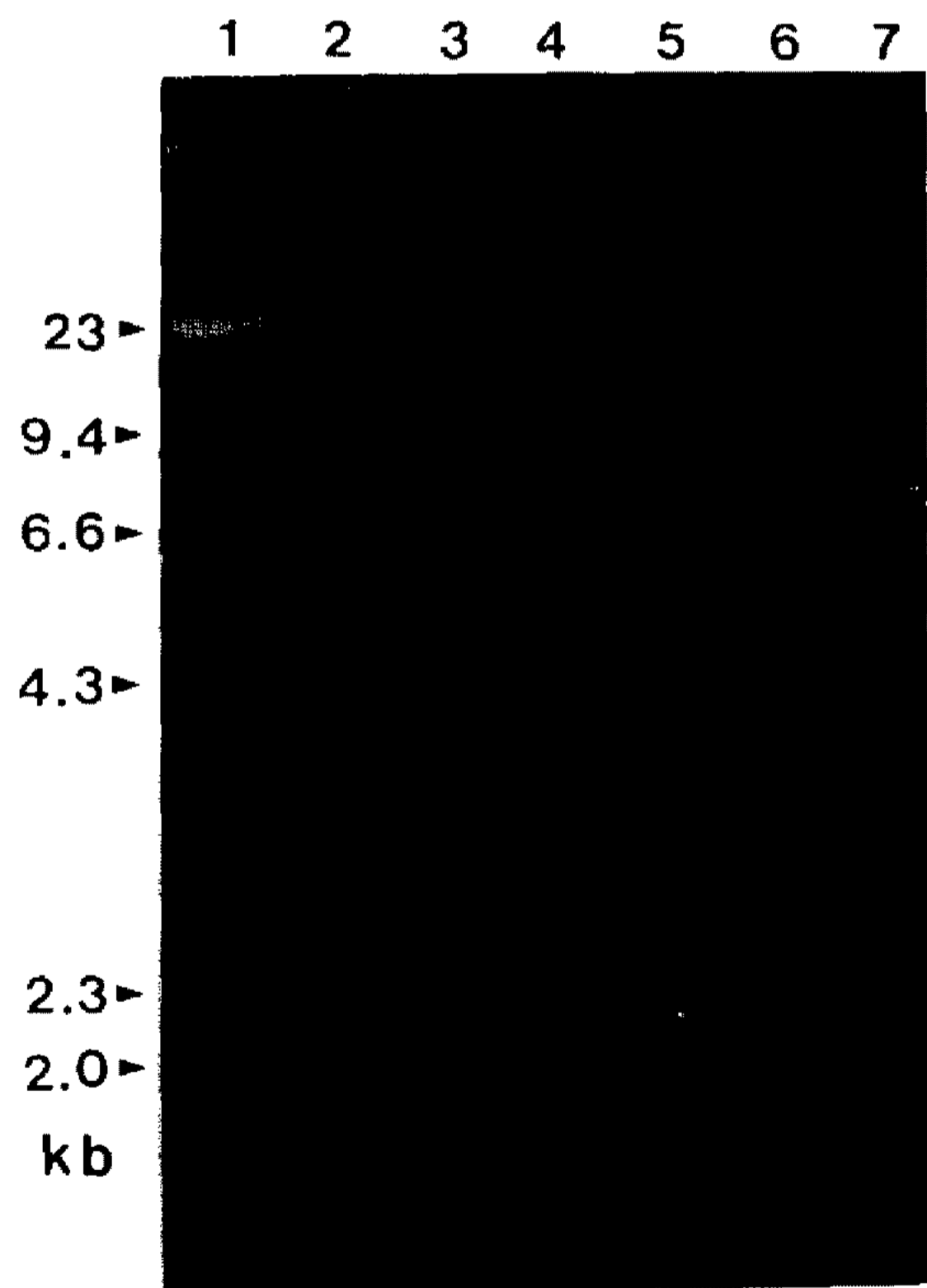


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of pKMG11.
Lane 1: *Hind*III digest of λ DNA, Lane 2: *Ava*I digest of pKMG11, Lane 3: *Cla*I digest of pKMG11, Lane 4: *Hind*III digest of pKMG11, Lane 5: *Kpn*I digest of pKMG11, Lane 6: *Eco*RI digest of pKMG11, Lane 7: *Eco*RI digest of pBR322

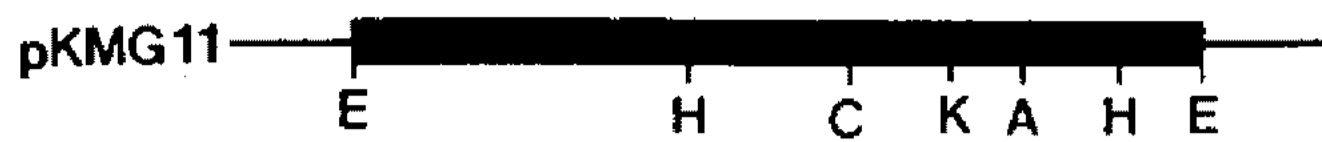


Fig. 3. Restriction map of pKMG11.

A, C, E, H and K represent *AvaI*, *ClaI*, *EcoRI*, *HindIII* and *KpnI*, respectively. The thick line represents cloned 5 kb DNA insert of pKMG11. The thin line represents pBR322.

재조합 플라스미드의 제한효소지도

pKMG11에 삽입된 *arfI* 유전자를 포함하고 있는 5 kb 삽입 DNA 단편을 분리하여 각종 제한효소 인식부위의 존재와 위치를 조사해 본 결과 *ClaI*, *KpnI* 및 *AvaI*은 각각 한개, 그리고 *HindIII*의 경우는 두개의 인식부위가 있음을 확인하였다. 상기 결과를 토대로 하여 Fig. 3과 같은 삽입 DNA 단편의 제한효소지도를 작성하였으며 이 지도를 활용하여 subcloning을 시도해 보았으나 각각 1.9 kb와 0.5 kb의 크기를 가진 양단의 *EcoRI-HindIII* DNA 단편 어느 것을 제거하더라도 α -arabinofuranosidase 활성의 완전한 실활을 가져왔다. 따라서 *arfI* 유전자는 2.6 kb의 내부 *HindIII* 단편을 중심으로 해서 양쪽 방향으로 좀 더 연장된, 전체 유전자 크기가 최소한 2.6 kb보다 큰 비교적 큰 유전자인 것으로 추정되었으며 앞으로 T4 DNA polymerase를 이용한 single-stranded DNA deletion 기술을 활용하여 *arfI* 유전자의 정확한 위치를 결정할 예정이다.

α -Arabinofuranosidase 유전자의 유래

pKMG11에 클로닝된 *arfI* 유전자가 *B. stearothermophilus* genome에서 유래되었는지 확인하기 위해 pKMG11에 삽입된 5 kb DNA를 dig-labeling 하여 얻은 probe DNA와 *EcoRI* 또는 *HindIII*로 완전절단한 *B. stearothermophilus* chromosomal DNA 단편을 hybridization 시켜 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. pKMG11의 5 kb probe DNA는 *EcoRI*으로 절단한 chromosomal DNA와 역시 같은 효소로 처리한 pKMG11 DNA 경우와는 동일한 위치에서 하나의 hybridization band를 나타냈다. 그리고 *HindIII*로 절단한 chromosomal DNA에서는 2.6 kb 위치의 진한 band와 그보다 훨씬 윗쪽에 또 하나의 흐릿한 band가 나타났는데 이는 크기가 큰 DNA 단편과는 제대로 hybridization이 일어나지 못했기 때문으로 생각된다. 또한 제한효소 지도로 보아 이외에도 또 한개의 band가 있어야 하나 아마도 크기가 작아 본 실험에서 이용한 gel 상에서 분리가 불가능하였던 것으로 생각된다. 그리고 *EcoRI*으로 절단한 플라스미드 DNA에서 보

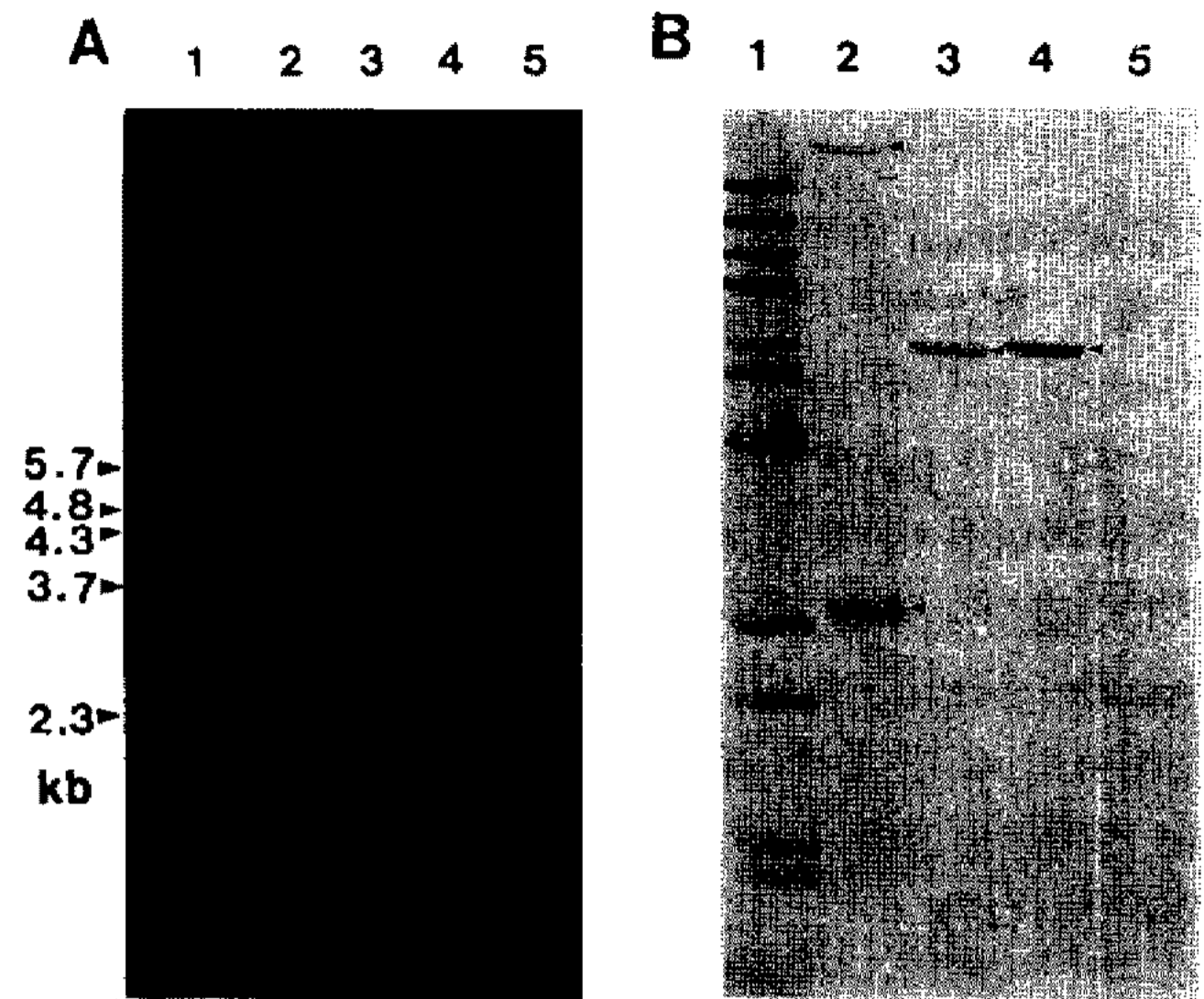


Fig. 4. Southern hybridization of *B. stearothermophilus* genomic DNA with random-primed DNAs synthesized from the DNA insert of pKMG11.

A: DNA electrophoretic patterns, B: Southern blot patterns

Lane 1: λ DNA digested with *BstEII*, Lane 2: Chromosomal DNA digested with *HindIII*, Lane 3: Chromosomal DNA digested with *EcoRI*, Lane 4: pKMG11 digested with *EcoRI*, Lane 5: pBR322 digested with *EcoRI*

The arrows indicate the bands which are specifically hybridized with the DNA insert of pKMG11.

여지는 4.3 kb 위치의 약한 DNA band는 probe를 만들 때 혼입되어 labeling 된 pBR322 DNA 단편에서 유래된 것으로 추정된다. 이상의 실험 결과로 pKMG11에 삽입된 *arfI*을 포함하고 있는 5 kb 외래 DNA는 예상했던 바와 같이 *B. stearothermophilus* chromosomal DNA 단편임을 확인할 수 있었다.

또한 4-methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranoside를 기질로 사용한 zymogram 기술을 이용하여 HB 101/pKMG11 재조합 균주가 생산하는 α -arabinofuranosidase가 pKMG11의 5 kb 삽입 DNA 상의 유전 정보 발현에 의해 생산된 효소임을 확인할 수 있었다. 이와 동시에 *B. stearothermophilus*는 *arfI* α -arabinofuranosidase 외에도 이 효소보다 분자량이 큰 최소한 2개 이상, 그 중의 하나는 매우 높은 효소활성을 나타내는 α -arabinofuranosidase 관련 효소를 생산하고 있다는 것을 발견하였다(Fig. 5 참조). 현재로서 이들 효소가 post-translational modification에 의한 것인지 아니면 완전히 다른 별개의 유전자 산물인지는 알 수 없으나 native xylan의 완전가수분해에 있어서 α -arabinofuranosidase의 중요 역할을 감안해서 앞으로 이들 효소들에 대해서 많은 연구가 있어야 하겠다.

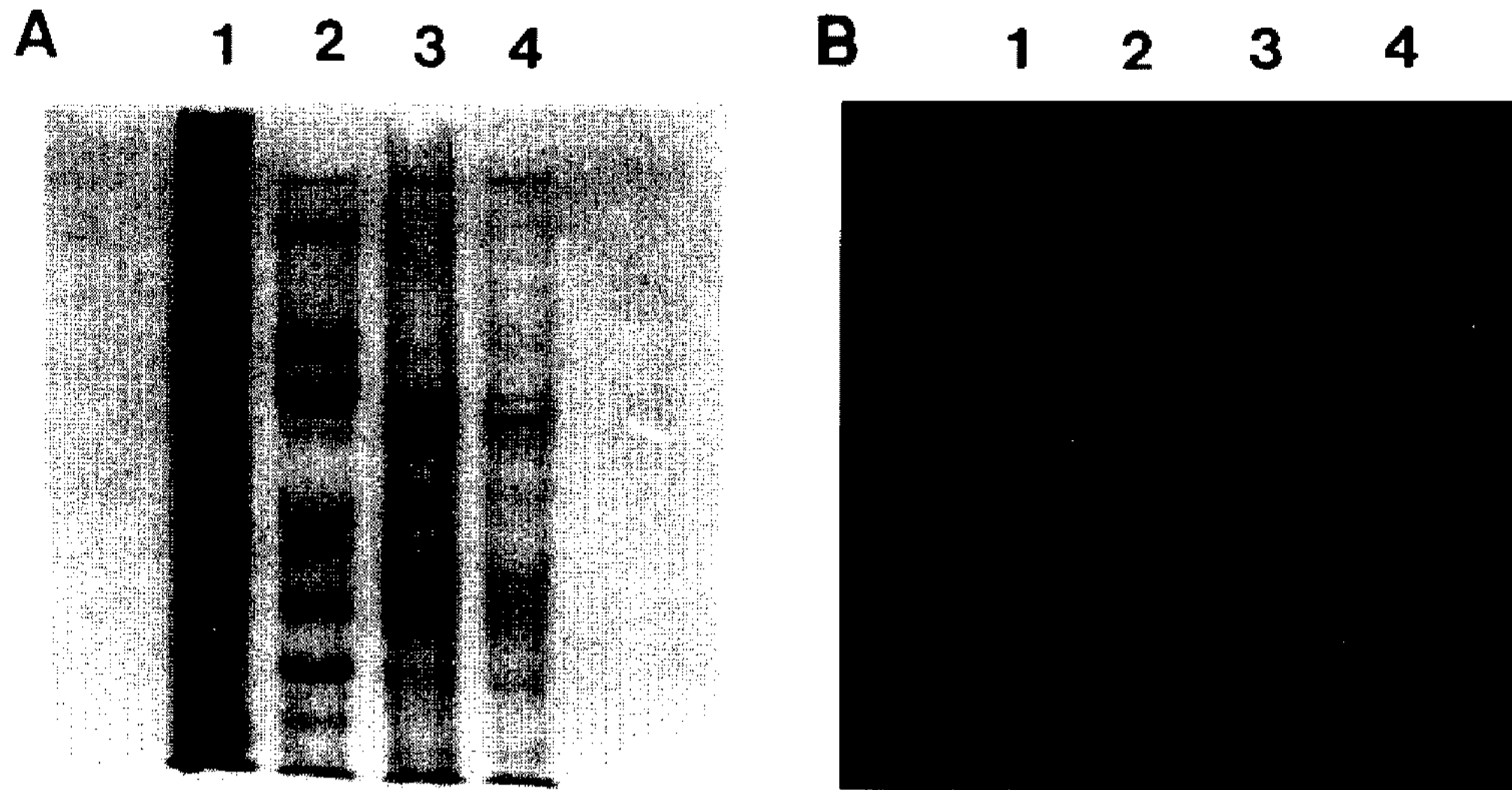


Fig. 5. Zymogram of α -L-arabinofuranosidase from *B. stearothermophilus* and *E. coli* HB101/pKMG11.
 A: protein bands (Coomassie blue R-250 staining), B: activity bands (contact with agarose gel containing 5 mM 4-methylumbelliferyl- α -L-arabinofuranoside)
 Lane 1: Intracellular protein of *B. stearothermophilus*, Lane 2: Extracellular protein of *B. stearothermophilus*, Lane 3: *E. coli* HB101/pKMG11, Lane 4: *E. coli* HB101/pBR322

Table 1. Substrate specificity of *arfI* gene product against different nitrophenyl-glycosides

Substrates	Specific Activity (U/mg)
<i>p</i> -nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside	24.09
<i>p</i> -nitrophenyl- α -L-arabinopyranoside	ND*
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	0.03
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	0.18
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	ND
<i>o</i> -nitrophenyl- α -D-galactopyranoside	ND
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- α -L-rhamnopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- α -L-fucopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- β -L-fucopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-fucopyranoside	ND
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-fucopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-glucopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	ND
<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-glucopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- α -D-mannopyranoside	ND
<i>p</i> -nitrophenyl- β -D-mannopyranoside	ND

*ND: Not Detected

***arfI* 유전자 생산 효소의 기질특이성**

HB101/pKMG11 재조합 균주가 생산하는 *arfI* 생산 α -arabinofuranosidase의 효소 작용 특성을 알아보기 위해 여러가지 기질에 대한 효소활성을 측정해 보았다. Table 1에 표시되어 있는 바와 같이 *arfI* α -arabinofuranosidase는 *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofurano-

Table 2. Specific activity of *arfI* gene product against natural substrate

Substrates	Specific Activity (mU/mg)
arabinogalactan	ND*
gum arabic	ND
arabinan	ND
arabinoxylan	12.71

*ND: Not Detected

side에 대해서는 높은 수준의 효소활성을 나타내었으나 기타 다른 각종 합성기질에 대해서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 또한 몇 가지 자연기질에 대한 작용도 조사해 본 결과 arabinoxylan(Table 2 참조)만을 분해하는 것으로 밝혀져 본 α -arabinofuranosidase는 매우 높은 기질특이성을 가진 효소임을 알 수 있었다.

Xylanase 활성에 미치는 α -arabinofuranosidase의 효과

Xylanase에 의한 arabinoxylan 가수분해에 미치는 HB101/pKMG11 생산 α -arabinofuranosidase의 영향을 알아 보기 위해 1% arabinoxylan 기질용액에 0.3 unit의 xylanase와 74 unit의 α -arabinofuranosidase를 첨가하고 45°C 에서 24시간 반응 후 반응생성물을 HPLC로 분석해 보았다(Fig. 6 참조). 대조실험(HB 101/pBR322 균주 생산 효소액+xlanase)에 비해 xylobiose의 생산량은 약 3.4배, xylose 생산량은 2.1배

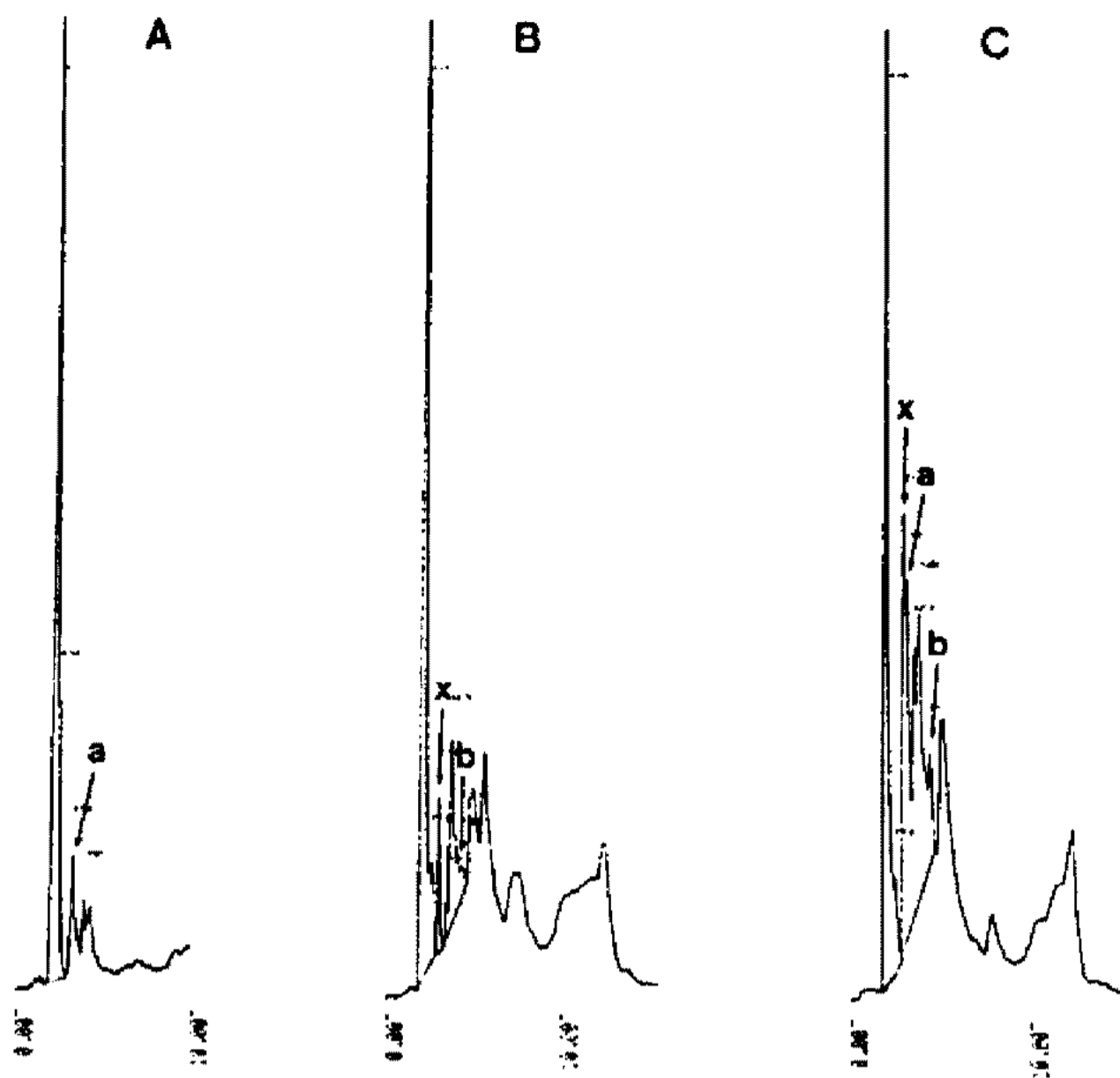


Fig. 6. HPLC chromatograms of the hydrolysis products of arabinoxylan.

A: Hydrolysate from the reaction with cell-free extract of *E. coli* HB101/pKMG11, B: Hydrolysate from the reaction with cell-free extract of *E. coli* HB101/pBR322 and xylanase, C: Hydrolysate from the reaction with cell-free extract of *E. coli* HB101/pKMG11 and xylanase

a: arabinose, x: xylose, b: xylobiose

증가하였고, 많은 양의 arabinose를 생산하였다. 또한 α -arabinofuranosidase 단독으로 처리했을 때에 비해 arabinose 생산량은 약 6배 정도 증가되었다. 이와같은 결과는 xylan 분해계 주효소작용에 대한 탈측쇄 효소의 상승효과를 입증해 주는 것으로서 본 α -arabinofuranosidase는 효율적 xylan 분해 시스템 개발에 효과적으로 활용할 수 있을 것으로 믿는다.

요 약

강력한 xylan 분해 균주인 *Bacillus stearothermophilus*의 *EcoRI* 절단 genomic library, pBR322 플라스미드 및 *E. coli* HB101 숙주세포 등을 이용하여 *B. stearothermophilus*의 α -arabinofuranosidase 생산 유전자(*arfI*)를 분리, 클로닝하였다. *arfI* 유전자 클론의 분리는 이 유전자 생산효소의 높은 *p*-nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside 분해 활성에 의한 황색 색소 형성 현상을 활용하였으며 약 10,000개의 형질전환체를 검색하여 한개의 형질전환체가 *arfI* 유전자를 포함하고 있는 5 kb 외래 DNA가 삽입된 재조합 플라스미드(pKMG11)을 가지고 있는 것으로 분석되었다. Southern blotting과 zymogram 기술을 이용하여,

상기 *arfI* 클론이 *B. stearothermophilus* chromosome으로부터 유래된 매우 높은 기질특이성을 가진 α -arabinofuranosidase 생산 유전자임을 확인함과 동시에 *B. stearothermophilus*는 *arfI* 효소 외에도 이보다 분자량도 크고 효소 활성도 높은 최소한 두개 이상의 다른 α -arabinofuranosidase 관련 효소를 생산하고 있음을 발견하였다.

감사의 말

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

참고문헌

- Chanda, S.K., E.L. Hirst, J.K.N. Jones, and E.G.V. Percival. 1950. Constitution of Xylan from Esparto Grass. *J. Chem. Soc.* 12: 39.
- Ehrenthal, I., R. Montgomery, and F. Smith. 1954. The carbohydrates of Gramineae II. The constitution of the hemicelluloses of wheat straw and corn cobs. *J. Am. Chem. Soc.* 76: 5509.
- Schuerch, C. The Hemicelluloses, Pp. 191. *In the Chemistry of Wood.* R.E. Krieger Publishing Co., New York.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3: 286-290.
- Muller-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.
- 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. Broun, C.R. MacKenzie, and H. Schneider. 1992. Enzymic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complexes from *Populus deltoides*: Effects of combination of β -mannanase, xylanase, and acetyl xylan esterase. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 90-94.

11. Song, H.S. and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
12. Cho, S.G., S.S. Park, Y.I. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of an endo-xylanase from *Bacillus stearothermophilus* into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **20**: 271-279.
13. 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 *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **20**: 136-142.
14. Kim, I.S., S.G. Cho, and Y.J. Choi. 1993. Molecular cloning and expression of the acetyl xylan esterase gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 542-548.
15. Bolivar, F. and K. Backman. 1987. Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* **69**: 245-280.
16. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 77-81.
17. MacKenzie, C.R., D. Bilous, H. Schneider, and K.G. Johnson. 1987. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2835-2839.
18. Rodriguez, R.L. and R.C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques, An Introduction*. Addison-Wesley Pub.
19. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
20. Hanahan, K. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*, Pp. 109-135. In D.M. Glover(ed.), *DNA Cloning*, Vol. 1, IRL Press, Oxford.
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. 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.
23. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426.
24. Brice, R. and I.M. Morrison. 1982. The degradation of isolated hemicelluloses and lignin-hemicellulose complexes by cell-free, rumen hemicellulases. *Carbohydr. Res.* **159**: 165-170.

(Received October 1, 1994)