Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 22, No. 6, 636-642 (1994)

화학적 수식에 의한 *Bacillus stearothermophilus* β-D-Xylosidase의 연구

서정한 · 최용진*
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Chemical Modification of the β-D-Xylosidase from *Bacillus stearothermophilus*

Suh, Jung-Han and Yong-Jin Choi*
Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701

Abstract — Essential amino acids involving in the catalytic mechanism of the β-D-xylosidase of *Bacillus stearothermophilus* were determined by chemical modification studies. Among various chemical modifiers tested *N*-bromosuccinimide (NBS), p-hydroxymercurybenzoate (PHMB), *N*-ethylmaleimide, 1-[3-(di-ethylamino)-propyl]-3-ethylcarbodi-imide (EDC), and Woodward's Reagent K(WRK) inactivated the enzyme, resulting in the residual activity of less than 20%. WRK reduced the enzyme activity by modifying carboxylic amino acids, and the inactivation reacion proceeded in the form of pseudo-first-order kinetics. The double-lagarithmic plot of the observed pseudo-first-order rate constant against the modifier concentration yielded a reaction order of 2, indicating that two carboxylic amino acids were essential for the enzyme activity. The β-D-xylosidase was also inactivated by *N*-ethylmaleimide which specifically modified a cysteine residue with a reaction order of 1, implying that one cysteine residue was important for the enzyme activity. Xylobiose protected the enzyme against inactivation by WRK and *N*-ethylmaleimide, revealing that carboxylic amino acids and a cysteine residue were present at the substrate-binding site of the enzyme molecule.

Xylan은 hemicellulose의 주성분으로 자연계 분포량이 cellulose 다음을 차지하고 있는 cellulose 못지 않은 중요한 biomass 자원으로 평가되고 있다(1). 이와 같은 xylan은 β-1,4-D-xylopyrano-side 주 탄소 골격에 각종의 다양한 측쇄결합을 가지고 있는 매우 복잡한 화학구조의 복합다당류이다(2). 그러므로 xylan을 효율적으로 활용하기 위해서는 xylanase와 β-D-xylosidase와 같은 xylan 분해계 주효소외에도 각종 탈 측쇄효소(debranching enzymes)가 필수적인 것으로 확인되고 있다(3).

본 연구실에서는 각종 xylan 분해계 효소를 세포 내외로 다량 생산하는 강력한 xylan 분해균을 분리, *Bacillus stearothermophilus*로 동정함과 더불어 관련 유전자를 *E. coli*에 클로닝하여 그 결과의 일부를 이미 보고한 바 있다(4-6). 특히 본 *B. stearothermophilus*는 exo-xylanase로 분류할 수 있는 일종의 β-D-xylosidase를 생산하고 있음을 확인하고 효소 생산 유전자의 염기서열을 결정 분석하여 일반 acid catalyst로 추정되는 본 효소의 catalytic site를 구성하는 conserved amino acid sequence의 존재도 확인 보고한 바 있다(7-9).

그러나 lysozyme과 cellulase 등과 같은 다른 carbohydrase와는 대조적으로 xylan의 biomass자원으로서의 그 중요성에도 불구하고 xylan 분해계 효소, 특히 β-D-xylosidase의 효소 작용기작과 관련된 연구는 극히 제한되어 있다(6).

따라서 본 연구에서는 *B. stearothermophilus* β-D-xylosidase의 효소작용기작 내지는 효소 분자의 구조와 기능과의 관계 정립을 위한 기초 연구로서 본 β-D-xylosidase 활성과 관련된 아미노산 잔기를 화학적 수식(chemical modification) 법을 이용, 분석하고 그 결과를 보고하고자 한다.

Key words: β-D-Xylosidase, *Bacillus stearothermophilus*, chemical modification, WRK, *N*-ethylmaleimide, carboxylic amino acids, cysteine
*Corresponding author

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

β-D-xylosidase 생산균주는 *Bacillus stearothermophilus xyl*A 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드인 pMG1을 가지고 있는 *E. coli* JM109(*rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, thi, *hsd*R17, *sup*E44, (*lac-pro*AB), F, *tra*D36, *pro*AB, *lac*IqZM15) 균주로서 효소 생산 및 생산 효소의 정제는 전보(8)에 상술한 방법에 따라 실시하였다.

그리고, diethylpyrocarbonate(DEP), *N*-acetylimidazole, *N*-ethylmaleimide, *N*-bromosuccini-mide (NBS), 1-[3-(di-ethylamino)-propyl]-3-ethylcarbodiimide(EDC), Woodward's Reagent K(WRK), phenylglyoxal, phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), chloramineT, 2-hydroxy-5-nitro-benzylbromide(HNBB), ρ-hydroxymercurybenzoate(PHMB) 등의 enxyme modifier를 비롯하여 본 연구에 사용한 대부분의 시약은 Sigma 사로부터 구입한 것이었다.

효소 활성 측정 및 단백질 정량

10 mM ρ-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside(pNPX) 용액(0.05 M 인산 완충 용액, pH 6.5) 0.1 ml에 동량의 효소용액을 첨가하고 45℃에서 20분간 반응시킨 후 0.4 M Na_2CO_3 용액 2 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 효소반응에 의해 생성된 ρ-nitrophenol을 405 nm에서 비색 정량하여 1분간에 1 μmole의 ρ-nitrophenol을 생성할 수 있는 효소량을 1 unit로 표시하였다(10).

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용한 Lowry 법(11)을 이용하였다.

화학적 수식(chemical modification)

비활성이 79.3 unit/mg인 정제 β-D-xylosidase 5 μl에 특정 완충용액을 이용한 각종 modifier 일정량을 첨가하고(Table 2 참조) 실온에서 30분간 반응시킨 후 잔여 효소 활성을 측정, 효소 활성에 필수적인 역할을 하는 아미노산 잔기를 식별하였다.

Chemical modifier에 의한 효소 불활성화 반응의 kinetics : 효소 활성 저해효과가 뚜렸했던 WRK와 *N*-ethylmaleimide modifier 경우는 첨가 농도를 달리해서 20분간 수식반응을 시키면서 5분 간격으로 시료를 채취, 첨가농도와 반응시간에 따른 저해효과를 분석 비교하였다.

Levy 등(12)에 의하면 상기 반응의 pseudo-first order rate constant(k′)는 반응 시간에 따른 잔여 효소 활성의 대수값을 plot 하여 얻어지는 직선의 기울기로부터 계산된다고 한다. 또한 상기 불활성화 반응은 active enzyme + n[modifier] → inactivated enzyme (I)과 같은 식으로 표현할 수 있으며 k′은 modifier의 농도에 의해 좌우됨으로 $k' = k[\text{modifier}]^n$ (II)로 나타낼 수 있다. 따라서 II번식은 양변에 log 값을 취함으로써 $\log k' = \log k + n \log [\text{modifier}]$ (III)로 고쳐 쓸 수 있다. 여기서 n은 reaction order로서 효소 불활성화시 modifier 한 분자에 의해 수식되는 특정 아미노산 잔기의 분자수를 나타내며 그 값은 III번식을 그래프로 나타낼 때 얻어지는 직선의 기울기로부터 구할 수 있다.

기질에 의한 효소 보호(enzyme protection) 효과 측정 : β-D-xylosidase의 주요 기질 중의 하나인 xylobiose를 최종 농도가 100 mM이 되도록 효소액 5 μl에 첨가, 1분간 미리 반응시킨 후 WRK(10 mM)와 *N*-ethylmaleimide(5 mM)를 첨가하고 20분간 반응시키면서 5분 간격으로 잔여 효소 활성을 측정하여 기질에 의한 효소 보호 효과를 조사하였다.

효소활성에 미치는 환원제의 영향 조사 : Cysteine, sodium thiosulfate, sodium sulfite, sodium citrate 등의 환원제를 최종 농도가 10 mM이 되도록 5 μl의 효소액에 첨가하고 30분간 실온에서 반응시킨 후 잔여 효소 활성을 측정, 효소 활성에 미치는 환원제의 영향을 조사하였다.

Cysteine modifier의 저해효과에 미치는 cysteine의 효과 측정 : Cysteine 용액을 최종농도가 5 mM이 되도록 5 μl의 효소용액에 첨가, 1분간 미리 반응시킨 후 *N*-ethylmaleimide(5 mM)를 첨가하여 20분간 반응시키면서 5분 간격으로 잔여 효소 활성을 측정하였다.

Carboxylic amino acid modifier의 저해효과에 미치는 carboxylic amino acid의 효과 측정 : Carboxylic amino acid인 aspartic acid와 glutamic acid 각각을 최종 농도가 10 mM이 되도록 5 μl의 효소용액에 첨가하여 1분간 미리 반응시킨 후 WRK(10 mM)를 첨가하여 20분간 반응시키면서 5분 간격으로 잔여 효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소 정제

E. coli JM109/pMG1이 생산하는 *B. stearothermophilus* β-D-xylosidase의 정제는 전보(8)에 상술한 방법에 따라 ammonium sulfate 분획, DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography 및 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography 등의 단계를 거쳐 실시하였다. Table 1에 표시되어 있는 바와 같이 최종적으로 약 12배 정제, 비활성이 79.3인 정제 효

Table 1. Summary of purification of the β-D-xylosidase from *E. coli* JM109 (pMG1)

Steps	Volume (m*l*)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific acivity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Culture broth	4,000	1,857	12,455	6.7	100	1
Ammonium sulfate fractionation	10.5	483	3,477	7.2	27.9	1.07
Ion exchange chromatography	70.3	143	1,114	7.8	8.9	1.16
Gel filtration chromatography	0.31	0.75	59.5	79.3	0.5	11.8

Table 2. Effects of chemical modifiers on the β-D-xylosidase activity

Chemicals	Target amino acid	Inhibitor concentration (mM)	Residual activity (%)	Incubation buffer (50 mM)
Diethyl pyrocarbonate	His	10	100	potassium phosphate (pH 6)
N-Acetylimidazole	Tyr	10	100	potassium phosphate (pH 7)
Phenylmethyl-sulfonyl fluoride	Ser	5	100	potassium phosphate (pH 7)
Phenylglyoxal	Arg	5	100	sodium acetate (pH 6)
N-Bromosuccinimide	Trp, Cys, Tyr	1	0	sodium acetate (pH 6)
Chloramine T	Met	5	100	sodium acetate (pH 6)
2-Hydroxy-5-nitro-benzyl bromide	Trp	5	100	sodium acetate (pH 6)
p-Hydroxymercury-benzoate	Cys	0.5	10	sodium acetate (pH 6)
N-Ethylmaleimide	Cys	10	5	sodium acetate (pH 6)
Woodward's Reagent K	Asp, Glu	10	10	Mes/NaOH (pH 6)
EDC	Asp, Glu, Tyr, Cys	10	20	Mes/NaOH (pH 6)

소를 얻었으며 본 정제 효소는 SDS-polyacrylamide gel 전기영동법(13)으로 분석해 본 결과 단일 단백질임을 확인할 수 있었다.

각종 modifier에 의한 수식 효과

정제 β-D-xylosidase에 11종의 특정 modifier를 작용시켜 효소 활성에 미치는 각 modifier의 효과를 분석, 직접 내지는 간접적으로 효소 활성에 관련된 아미노산 잔기의 종류를 알아 보았다. Table 2에 표시되어 있는 바와 같이 본 효소는 NBS, PHMB, *N*-ethylmaleimide, WRK 및 EDC 등 5종의 modifier에 의해서만 효소 활성이 현저하게 저해되었을 뿐 기타 modifier에 의해서는 전효 영향을 받지 않았다.

NBS는 cysteine 뿐만 아니라 typtophan이나 tyrosine에도 작용할 수 있는 modifier로 알려지고 있으나(14) 본 β-D-xylosidase는 tryptophan과 tyrosine에만 특이적으로 작용하는 HNBB와 *N*-acetylimidazole에 의해서는 전혀 활성 저해를 받지 않는 것으로 보아 NBS의 저해효과는 cysteine 잔기의 수식에서 비롯됨을 알 수 있었다.

또한 EDC의 경우도 tyrosine, cysteine 및 carboxylic amino acid 모두에 작용할 수 있는 modifier이나(15) 앞에서 언급한 바와 같이 EDC의 저해효과 역시 tyrosine을 제외한 cysteine과 carboxylic amino acid의 수식에서 기인되는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합 분석해 보면 *B. stearothermophilus* β-D-xylosidase는 구성 아미노산 잔기 중에서 histidine, tyrosine, serine, arginine, methionine 및 tryptophan 등은 효소 활성에 직접적으로 관여하지 않는 잔기이며 cysteine과 aspartic acid나 glutamic acid와 같은 carboxylic amino acid 잔기가 본 효소 활성에 중요한 역할을 하는 필수 아미노산 잔기라는 결론을 얻을 수 있었다.

WRK와 *N*-ethylmaleimide에 의한 효소 활성 저해 반응

앞 항에서 설명한 바와 같이 뚜렷한 효소 불활성화 효과를 보였던 carboxylic amino acid와 cysteine 각각에 대한 modifier인 WRK와 *N*-ethylmalimide의 첨가 농도 내지는 수식 반응의 반응시간에 따른 효과를 조사, Fig. 1과 2와 같은 결과를 얻었다. 예상대로 본 효소는 modifier의 첨가 농도와 반응 시간에 비례적인 효소 활성 저하현상을 보였으며 반응 시간에 따른 잔여 효소 활성의 대수값을 나타내는 Fig. 1과 2가 직선을 나타내고 있음은 상기 modifier에 의한 β-D-xylosidase 불활성화 반응이 first-order kinetic을 따르고 있음을 시사해 준다(12). 또한 Fig. 1과 2의 결과를 토대로 하여 얻어진 log k′ 값에 대한 첨가 modifier 농도의 대수값을 plot 하여 Fig. 3과 같은 그래프를 얻을 수 있었다.

WRK의 경우 기울기 즉 n 값이 2인 직선을 이루었는데 이 결과는 modifier에 의해서 두개의 carboxylic acid 분자가 수식되었을 때 효소의 불활성화가 일어남을 시사해 준다. 이는 본 효소의 생산 유전자의 염기서열 분석결과(9) 산성 아미노산 잔기를 포함한 잘 보존되어 있는 두개의 촉매부위가 존재한다는 사

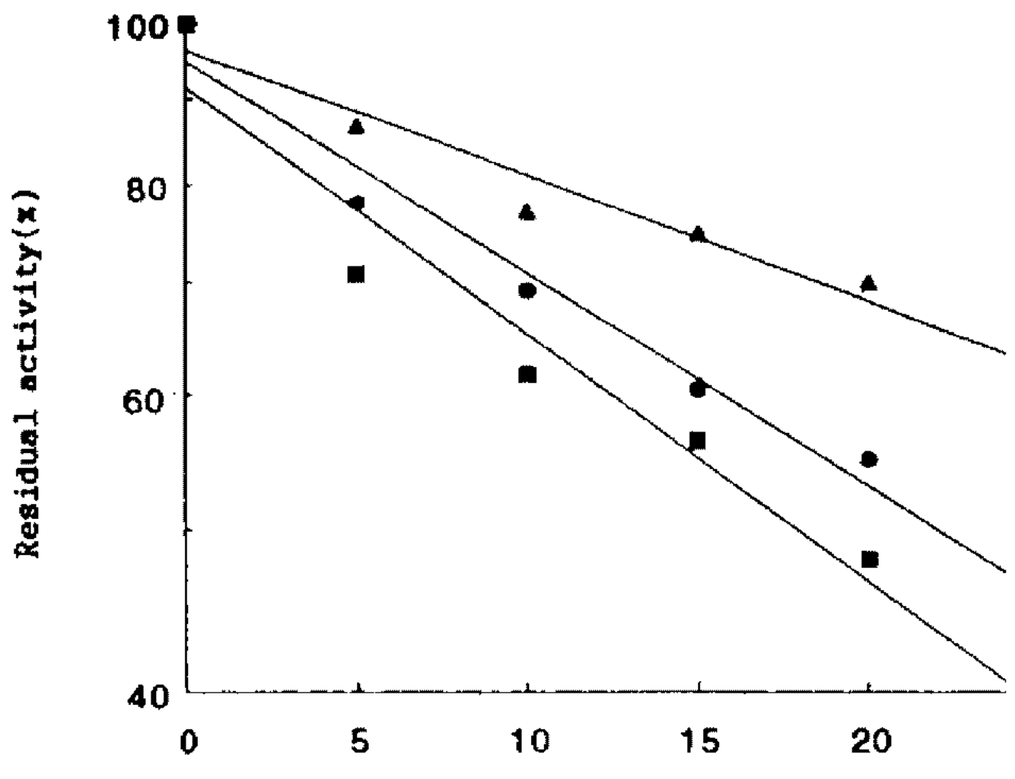

Fig. 1. Effects of Woodward's Reagent K on the β-D-xylosidase activity.
5 μl of the enzyme solution in 0.05 M Mes/NaOH buffer (pH 6) was incubaed with WRK in the final concentrations of 4, 5 and 6 mM, respectively.
▲−▲: 4 mM, ●−●: 5 mM, ■−■: 6 mM

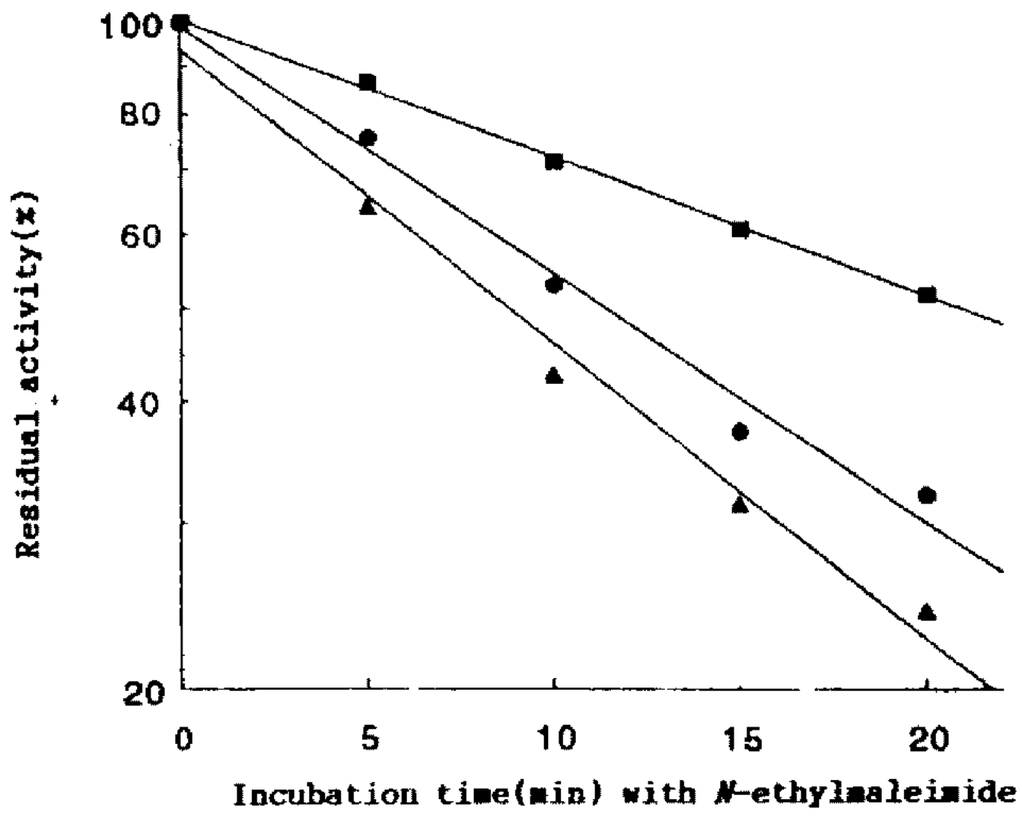

Fig. 2. Effects of *N*-ethylmaleimide on the β-D-xylosidase activity.
5 μl of the enzyme solution in 0.05 M sodium acetate buffer (pH 6) wasincubated with *N*-ethylmaleimide in the final concentrations of 0.3, 0.4 and 0.5 mM, respectively.
■−■: 0.3 mM, ●−●: 0.4 mM, ▲−▲: 0.5 mM

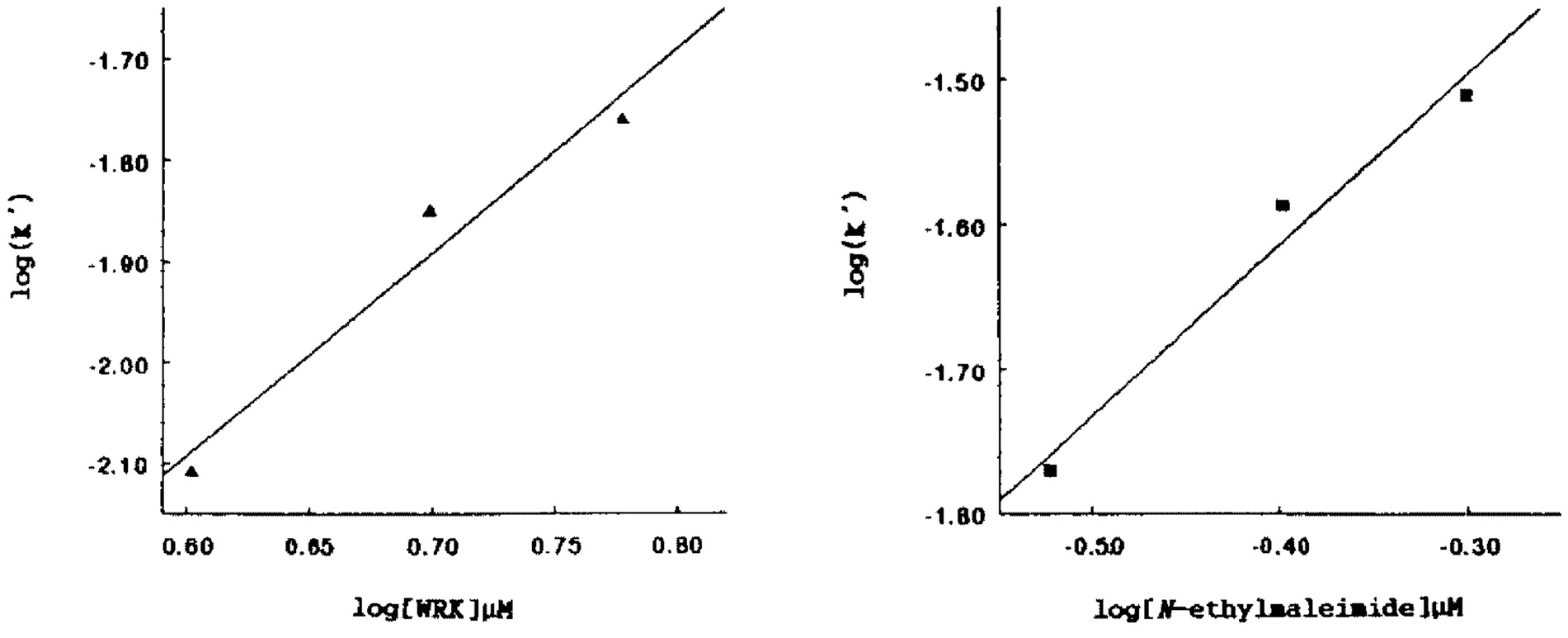

Fig. 3. Kinetics of inactivation by Woodward's Reagent K and *N*-ethylmaleimide.
K values for each modifier concentrations were obtained from the slopes in Fig. 1 for WRK and Fig. 2 for *N*-ethylmaleimide.

실과 상통되는 결과라고 하겠다.

반면, *N*-ethylmaleimide의 경우에는 n 값이 1인 직선을 형성하였으며 이는 modifier가 한개의 cysteine 잔기를 수식할 경우 효소 불활성화가 일어나는 것임을 알 수 있다.

β-D-Xylosidase 활성에 미치는 각종 환원제의 효과

효소 용액에 각종 환원제를 첨가, 30분간 반응시킨 후 잔여 효소 활성을 측정하여 효소 활성에 미치는 환원제의 영향을 조사하였다. Table 3에 표시되어 있는 바와 같이 본 실험에 사용한 어느 환원제도 뚜렷한 효소 활성 저해효과를 나타내지 않은 것으로 미루어 보아 cysteine에 특이적으로 작용, 현저한 효소 불활성화 효과를 보였던 PHMB 및 *N*-ethylmaleimide 등의 효소 활성 저해효과는 disulfide bond 절단에 기인되는 현상이라기 보다는 cysteine 잔기 그 자체를 수식함으로써 효소 활성에 영향을 초래하는 것임을 반증해 주고 있다.

기질에 의한 효소 보호 효과

Table 3. Effects of reducing agents on the β-D-xylosidase activity

Reducing agent (10 mM)	Residual activity (%)
None	100
Cysteine	103.3
Sodium thiosulfate	101.2
Sodium sulfite	96.5
Sodium citrate	98.9

Each reducing agent was incubated with 5 μl of the enzyme solution for 30 min. and then assayed for the residual enzyme activity.

화학적 수식에 의해 거의 완전한 효소 불활성화 현상을 초래했던 β-D-xylosidase의 carboxylic amino acid와 cysteine 잔기의 효소 활성과 관련된 구체적 역할에 대한 지식을 얻기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 즉, 본 효소의 대표적인 기질인 xylobiose 100 mM 존재하에서 cysteine과 carboxylic amino acid의 수식반응을 실시하여 효소의 잔여활성을 측정 분석해 보았다. Table 4와 같이 10 mM WRK와 5 mM *N*-ethylmaleimide를 사용한 실험에서 xylobiose가 첨가되었을 때는 첨가되지 않은 대조실험에 비해 현저히 높은 잔여 효소 활성을 보였다(Fig. 4). 따라서 상기 두 종류의 효소 활성 필수 아미노산 잔기가 효소-기질 결합에 중요한 역할을 함으로써 촉매 활성에

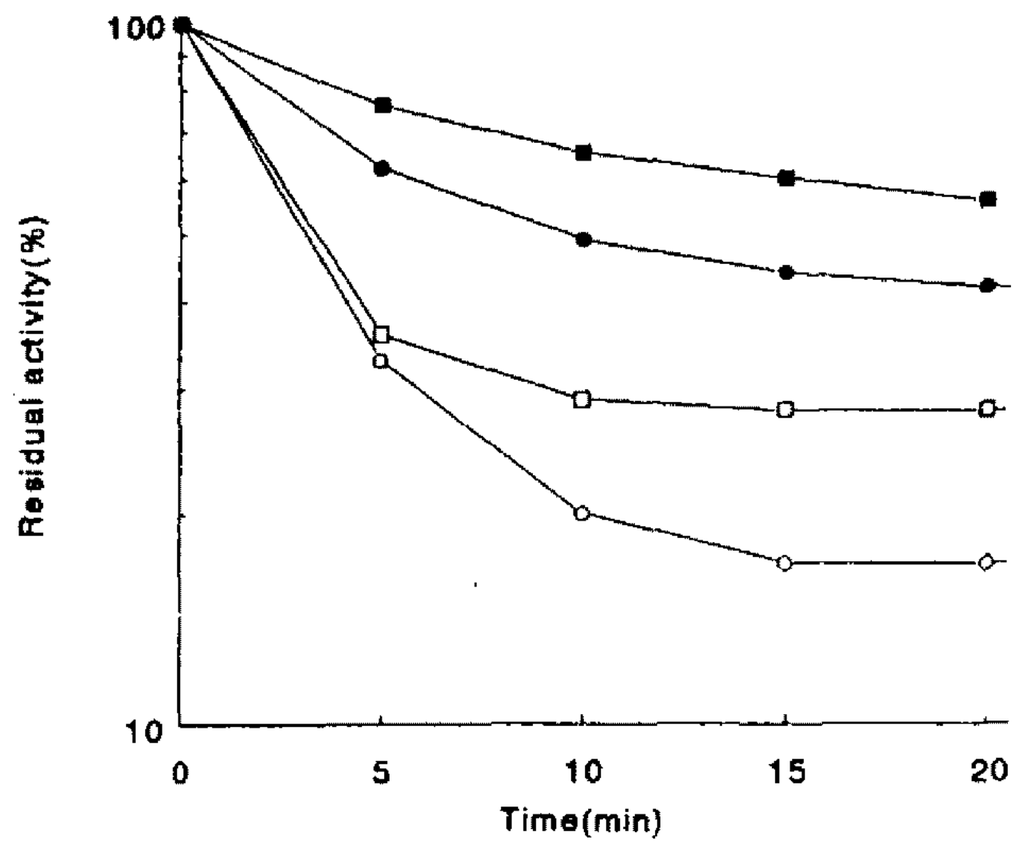

Fig. 4. Protection of the β-D-xylosidase by xylobiose.
Xylobiose (100 mM) was preincubated with 5 μl of the enzyme solution in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) for 1 minute and then mixed with either 10 mM WRK or 5 mM *N*-ethylmaleimide.
○−○: 10 mM WRK, ●−●: 10 mM WRK+100 mM xylobiose, □−□: 5 mM *N*-ethylmaleimide, ■−■: 5 mM *N*-ethylmaleimide+100 mM xylobiose

Table 4. Protection of the β-D-xylosidase by xylobiose from chemical modification

Incubation time (min)	Residual activity (%)			
	Woodward's Reagent K (10 mM)		*N*-Ethylmaleimide (5 mM)	
	xylobiose 0 mM	xylobiose 100 mM	xylobiose 0 mM	xylobiose 100 mM
0	100	100	100	100
5	33	62	36	76
10	23	49	30	65
15	17	44	28	63
20	17	42	28	54

Xylobiose (final concentration of 100 mM) was preincubated with 5 μl of the enzyme solution in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) for 1 minute and then WRK (10 mM) or *N*-ethylmaleimide (5 mM) was added.

Table 5. Reduction of modifier effects by carboxylic amino acids and cysteine

Incubation time (min)	Residual activity (%)					
	Woodward's Reagent K (10 mM)				*N*-Ethylmaleimide (5 mM)	
	Aspartic acid		Glutamic acid		Cysteine	
	0 mM	10 mM	0 mM	10 mM	0 mM	5 mM
0	100	100	100	100	100	100
5	56	78	56	72	21	97
10	44	68	44	60	19	86
15	39	59	39	55	18	77
20	35	55	35	52	16	70

Aspartic acid (10 mM) or glutamic acid (10 mM) was preincubated with 5 μl of the enzyme solution in 0.05 M Mes/NaOH buffer (pH 6.0) for 1 minute before the additioon of WRK (10 mM). Cysteine was used in the case of *N*-ethylmleimide (5 mM).

직접적으로 관계하고 있을 것이라는 추측을 할 수 있었다.

그러나, 앞에서 언급한 바와 같이 본 효소 생산 유전자의 염기서열 분석결과(9)에 의하면 본 효소는 다른 일반 탄수화물 분해효소와 마찬가지로 일종의 acid-catalyst로서 aspartic acid와 glutamic acid 잔기를 포함하고 있는 conserved catalytic site를 가지고 있음이 확인되어 이점에서는 본 실험결과와 잘 부합되고 있다고 하겠다. 그러나 상기 촉매 부위에는 cysteine은 포함되어 있지 않았다. 따라서 cysteine 잔기는 촉매 부위 밖에 위치하고 있으면서 효소-기질 결합에 적합한 효소 분자의 3차 구조 형성에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 판단된다. 앞으로 분자 수준의 보다 구체적인 연구에 의해 밝혀질 것을 기대한다.

Modifier의 효소불활성화에 미치는 carboxylic amino acid와 cysteine의 첨가 효과

Carboxylic amino acid인 aspartic acid나 혹은 glutamic acid를 첨가하였을 때 WRK에 의한 효소 활성 저해효과를 측정하여 Table 5와 같은 결과를 얻었다. 예상대로 carboxylic amino acid가 존재했을 때의 효소 불활성화 정도는 존재하지 않았을 때보다 감소하는 것을 알 수 있었으며 이는 WRK에 의한 효소 불활성화는 carboxylic amino acid의 수식에서 기인함을 재확인 해주는 결과라고 하겠다.

N-ethylmaleimide의 경우에도 cysteine이 존재할 때는 존재하지 않은 경우보다 불활성화 정도가 감소함을 알 수 있었으며 이 결과 역시 *N*-ethylmaleimide는 cysteine 잔기를 수식함으로써 효소 활성을 저해하고 있다는 것을 반증해 주고 있는 것이다.

요 약

E. coli JM109/pMG1 재조합 균주가 생산하는 *Bacillus stearothermophilus* β-Dxylosidase의 효소활성과 관련된 필수 아미노산 잔기를 화학적 수식(chemical modification) 법을 이용, 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다. *B. stearothermophilus* β-D-xylosidase의 구성 아미노산 잔기 중에서 histidine, tyrosine, serine, methionine 및 tryptophan 등은 효소 활성에 직접적인 관계를 가지고 있지 않는 것으로 판명되었으며 carboxylic amino acid와 cysteine은 효소 작용에 직접 관련된 중요한 역할을 하고 있는 아미노산 잔기로 밝혀졌다.

한편 xylobiose 기질에 의한 효소 활성 보호 실험 결과에 의하면 상기 두 종의 효소 활성 필수 아미노산 잔기는 효소-기질 결합 단계에서 중요한 역할을 하는 것으로 추측되었다.

또한 각각 carboxylic amino acid와 cysteine modifier인 Woodward's Reagent K(WRK)와 *N*-ethylmaleimide의 효소 불활성화 반응의 kinetics를 분석해 본 결과 WRK의 경우에는 두개의 carboxylic amino acid를, *N*-ethylmaleimide의 경우는 한개의 cysteine 잔기를 수식함으로써 거의 완전한 효소 불활성화 현상을 초래하는 것으로 계산되었다.

참고문헌

1. Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases, their occurence, purification, properties and applications. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 277-352.
2. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.

3. 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 Agri.* **34**: 1330-1340.
4. Song, H.S, and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus. Kor. J. Appl. Microbiol. Tech.* **17**: 289-294.
5. Cho, S.G., S.S. Park, Y.I. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of an endo-xylanase gene from *Bacillus stearothermophilus* into *Escherichia coli. Kor. J. Appl. Microbiol. Tech.* **20**: 271-279.
6. 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. Tech.* **21**: 542-548.
7. Oh, S.W., S.S. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus stearothermophilus* β-D-xylosidase gene in *E. coli. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **20**: 136-142.
8. Mun, A.R. and Y.J. Choi. 1992. Purification and characteriztion of exo-xylanase from *Escherichia coli* harboring the recombinant plasmid pMG1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **20**: 574-582.
9. Oh, H.J. and Y.J. Choi. 1994. Sequence analysis of β-D-xylosidase gene from *Bacillus stearothermophilus. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **22**: 134-142.
10. Yu, J.H., K.S. Chung, and D.H. Oh. 1989. Molecular cloning and expression of a xylanase gene from thermophilic alkalophilic *Bacillus* sp. K-17 in *E. Coli. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 178.
11. Lowry, O.H., N.J. Rasebrough, A.J. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
12. Levy, H.M., P.D. Leber, and E.M. Ryan. 1963. Inactivation of myosin by adenosine triphosphate and other phosphate compounds. *J. Biol. Chem.* **238**: 3654-3659.
13. Laemmili, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**: 680-685.
14. Vasanti Deshpande, J. Hinge, and M. Rao. 1990. Chemical modification of xylanases. *Biochemica et Biophysica Acta.* **1041**: 172-177.
15. Mauri, M., K. Nakanish, and T. Yasui. 1993. Chemical modification of xylanases from *Streptomyces* sp. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**: 662-663.

(Received September 13, 1994)