

재조합 균주 *Escherichia coli*가 생산하는 *Bacillus stearothermophilus* α -L-Arabinofuranosidase의 정제 및 특성

임수정 · 조쌍구 · 최용진*
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Purification and Characterization of the α -L-Arabinofuranosidase from *Escherichia coli* Cells Harboring the Recombinant Plasmid pKMG11

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

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

Abstract — α -Arabinofuranosidase was produced by *E. coli* HB101 harboring the recombinant plasmid pKMG11 which contained the *arfI* gene of *Bacillus stearothermophilus*. The maximum production of the enzyme was observed when *E. coli* HB101 cells were grown at 37°C for 20 hours in the medium containing 0.5% arabinose, 1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% NaCl. The α -arabinofuranosidase produced was purified to homogeneity using a combination of 20~50% ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange column chromatography and Sepharose 6B-100 gel filtration. The purified enzyme was most active at 55°C and pH 6.5. The K_m and V_{max} values of the enzyme on *p*-nitrophenyl- α -arabinofuranoside was determined to be 2.99 mM and 0.43 μ mole/min (319.74 μ mole/min/mg), respectively. The pI value was 4.5. The molecular weight of the native protein was estimated to be 289 kDa. The SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis suggested that the functional protein was a trimer of the 108 kDa identical subunits. The N-terminal amino acid sequence of the α -arabinofuranosidase was identified as X-Ser-Thr-Ala-Pro-Arg(?)-Ala-Thr-Met-Val-Ile-Asp-X-Ala-Phe.

Xylan은 β -D-1,4-xylopyranoside로 구성된 주탄소 골격에 acetyl, glucuronosyl 및 arabinosyl 등의 잔기로 구성된 각종 측쇄가 결합되어 있는 매우 복잡한 화학 구조의 복합다당류이다(1, 2).

Xylan 분자의 측쇄결합의 한 역할은 β -1,4-xylopyranoside 주결합체에 대한 xylanase와 β -xylosidase와 같은 xylan 분해계 주 효소의 접근을 제한함으로써 생물학적 손상으로부터 스스로를 보호하는 기능과 관련이 있는 것으로 추측되고 있다(3, 4). 그러므로 xylan을 완전 가수분해 하려면 xylan 분해계 주 효소 외에 상기 측쇄결합 절단에 관계하는 각종 xylan 분해계 효소의 협동적 작용이 필수적인 것으로 분석되고 있다(5).

β -L-Arabinofuranosidase (EC. 3. 2. 1. 55)는 상기 arabinosyl 측쇄절단반응을 촉매하는 한 효소로서 특히 연질목재와 초본식물의 xylan과 같은 다량의 ara-

binose 잔기를 포함하고 있는 arabinoxylan 가수분해에 매우 중요한 역할을 할 것으로 기대된다(6-8).

본 연구실에서는 각종 xylan 분해계 효소를 세포 내외로 다량 생산하는 강력한 xylan 분해 균주인 *Bacillus stearothermophilus*를 분리하고(9), 이 균주로부터 xylanase와 β -xylosidase 생산유전자(10, 11)는 물론이고 탈측쇄효소인 acetylxyylan esterase 생산 유전자(12, 13)와 α -arabino-furanosidase 생산 유전자를 클로닝(14)하여 그 결과의 일부를 이미 보고한 바 있다. 본 연구에서는 상기 *B. stearothermophilus arfI* 유전자를 클로닝한 *E. coli* 재조합 균주로부터 다량의 α -arabinofuranosidase를 생산하고 생산효소를 정제하여 그 특성을 살펴보았다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

α -Arabinofuranosidase 생산 균주로는 *Escherichia coli* HB101/pKMG11 재조합 균주를 사용하였으며

Key words: α -arabinofuranosidase, characterization, recombinant plasmid, *Bacillus stearothermophilus*
*Corresponding author

pKMG11은 *Bacillus stearothermophilus*의 *arfI*을 포함하고 있는 5 kb *EcoRI* 단편을 pBR322의 *EcoRI* site에 삽입시켜 얻은 재조합 플라스미드이다(14).

효소 정제시 사용한 DEAE-Sepharose CL-6B와 Sepharose 6B-100, 그리고 ρ -nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside(pNPAf)를 비롯한 각종 효소기질은 Sigma Co. 제품이었고, 기타 일반 시약류는 시판 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

효소활성 측정 및 단백질 정량

기질용액인 10 mM pNPAf 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5) 100 μ l에 효소액 100 μ l를 첨가하고 45°C에서 20분간 반응시킨 후 0.6 M Na₂CO₃ 용액 2 ml를 추가하여 반응을 정지시켰다. 효소 활성은 45°C에서 1분 동안 1 μ mole의 ρ -nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였으며 효소 반응에서 생긴 ρ -nitrophenol은 405 nm(Beckman DU-64 spectrophotometer)에서 비색 정량하였다. 또한 arabinoxylan 기질의 경우는 생성환원당을 DNS 법(15)으로 측정하여 효소활성을 나타내었다.

Column 용출액 중의 단백질량은 자외선 흡광도법(at 280 nm, Beckman DU-64 spectrophotometer), 기타 효소 용액의 경우는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 한 Lowry 법(16)을 이용하여 단백질량을 측정하였다.

조효소액의 조제

HB101/pKMG11을 0.5% arabinose가 포함된 LB 배지(21 culture)에서 20시간 동안 배양하고 원심분리(Beckman J2-21, JA-10 rotor, 5000 rpm, 10 min)하여 균체를 분리하였다. 분리한 균체를 다시 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5) 120 ml에 현탁시켜 French press를 이용, 균체를 파쇄한 다음 원심분리(Beckman J2-21, JA-10 rotor, 5000 rpm, 10 min)하여 상등액을 얻었으며, 이 상등액을 효소 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

효소 정제

Ammonium sulfate 분획 조효소액을 10% 농도 간격으로 ammonium sulfate 분획을 실시하여 효소 활성이 높았던 20~50% 분획을 취하여 140 ml의 0.05 M 인산 완충 용액(pH 6.5)에 용해시킨 후 Amicon YM10 membrane(molecular weight cut-off: 10 kd)을 이용하여 ammonium sulfate 제거와 단백질 농축을 행하였다.

DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chroma-

tography Ammonium sulfate 분획을 하여 얻은 효소액을 DEAE-Sepharose CL-6B column(2.8×30 cm)에 흡착시킨 다음 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5)으로 일차 세척하였다. 세척이 끝난 다음 0.1 M NaCl 용액과 0.6 M NaCl 용액을 이용, 시간당 20 ml의 용출 속도(3 ml/tube)로 linear gradient elution을 실시하였다.

Sepharose 6B-100 gel filtration Ion exchange chromatography에서 분리된 활성이 높은 분획을 모아 ethanol을 이용하여 농축한 다음 0.05 M 인산 완충 용액(pH 6.5)으로 미리 평형시킨 Sepharose 6B-100 column(1.6×91.5 cm)을 사용하여 시간당 12 ml의 유속(2 ml/tube)으로 여과하였다.

정제 효소의 순도 검정 및 분자량 측정

정제 효소의 순도는 SDS polyacrylamide gel 전기영동법(17)을 이용하여 검정하였으며 효소 분자량은 SDS slab gel 전기영동법(18)과 Sepharose 6B-100 gel 여과법을 이용하여 측정하였다.

Isoelectric point의 결정

Vertical slab gel(Bio-Rad Co.)을 이용한 isoelectric focusing 법에 따랐다(19). 즉, 효소 단백질을 ampholyte(Biolyte pH 3~10, pH 5~7, Bio-Rad, 최종농도 2%)가 포함된 5.0% polyacrylamide gel에서 200 V, 90분에 이어 400 V에서 90분간 전개시켰다. 전개가 끝난 gel은 10% TCA(trichloroacetic acid) 용액에서 30분, 1% TCA 용액에서 24시간 세척한 후 Coomassie blue 염색법으로 염색하여 단백질대를 관찰하였다. pI 표준물질은 Bio-Rad의 IEF standards를 사용하였다.

N-말단 아미노산 서열 결정

정제 효소 단백질의 N-말단 아미노산 서열은 Edman degradation 방법(20)에 기초한 Milligen 6600B protein sequencer를 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

α -Arabinofuranosidase의 세포 내외의 분포

E. coli HB101/pKMG11 재조합 균주에 의해 생산되는 α -arabinofuranosidase의 세포 내외의 분포를 조사해 본 결과 Table 1과 같이 생산 효소의 거의 전부가 세포내 분획에서 검출되었다. 이와 같은 결과는 본 효소의 원 생산균인 *B. stearothermophilus*에서는 생산 α -arabinofuranosidase의 대부분이 세포외로 분비되고 있는 현상과 대조적으로 두 균주의

단백질 분비기구의 차이가 한 원인이 될 수 있을 것으로 추측된다.

효소 생산에 미치는 탄소원과 질소원의 영향

다량의 효소를 생산함으로서 정제를 용이하게 하기 위하여 LB 배지에 각종 탄소 및 질소원을 첨가하여 *E. coli* HB101/pKMG11에 의한 α -arabinofuranosidase 생산량을 비교 분석해 보았다. 탄소원은 0.5% arabinose, 질소원으로는 0.5% yeast extract와 1% tryptone을 첨가한 배지에서 20시간 정도 배양했을 때 가장 높은 효소 생산량을 얻었다.

효소 정제

E. coli HB101/pKMG11 균주를 2l의 효소 생산 최적 배지에 접종하고, 20시간 배양하여 얻은 균체로부터 비활성이 45.44 units/mg 인 조효소액 117 ml를 얻은 다음 Table 2에 요약된 과정에 따라 α -arabinofuranosidase를 정제하였다.

Table 1. Subcellular distribution of the α -arabinofuranosidase

	Enzyme activity (Unit)	Relative activity (%)
Extracellular	0.32	0.35
Periplasm	0.10	0.11
Intracellular	89.47	99.54

Enzyme activity was measured under standard condition at 45°C for 20 min. using pNPAf as the substrate. Unit was expressed μ mole ρ -nitrophenol released per min.

Table 2. Summary of the purification of α -arabinofuranosidase from *E. coli* HB101/pKMG11

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification
Cytoplasmic extract	2061.54	93673.71	45.44	100.00	1.00
Ammonium sulfate Fractionation	767.66	48394.98	63.04	51.66	1.39
DEAE-Sepharose CL-6B	25.87	3363.62	130.01	3.59	2.86
Sepharose 6B-100	4.91	904.33	184.18	0.97	4.05

Unit was expressed as μ mole ρ -nitrophenol released per min.

즉 ammonium sulfate 분획(20~50%), DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography(Fig. 1) 및 Sepharose 6B-100 gel filtration(Fig. 2) 과정을 거치면서 약 4배 정도 정제되어 단일 단백질 형태를 나타내었다(Fig. 3 참조). 최종적으로 비활성이 184.2 units/mg을 나타내는 총 904.3 units의 정제 효소를 얻었다.

효소의 일반적 성질

최적 pH pH 4~11 범위에서 pH를 0.5~1.0 간격으로 조정하여 네 종의 서로 다른 완충용액을 이용하여 효소 활성에 미치는 반응액의 수소이온농도의 영향을 살펴보았다. Fig. 4와 같이 본 α -arabinofuranosidase는 pH 6.5에서 가장 높은 활성을 나타내면서

Table 3. Activity of the purified α -arabinofuranosidase on synthetic and natural substrates

Substrate	Specific activity (unit/mg)**
ρ -nitrophenyl- α -L-arabinofuranoside	184.18
ρ -nitrophenyl- α -L-arabinopyranoside	ND*
ρ -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	ND
o-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside	1.37
Arabinogalactan	ND
Gum arabic	ND
Arabinan	ND
Arabinoxylan	0.10

*ND: not detected

**Specific activity was expressed a μ mole ρ -nitrophenol or reducing sugar released $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$.

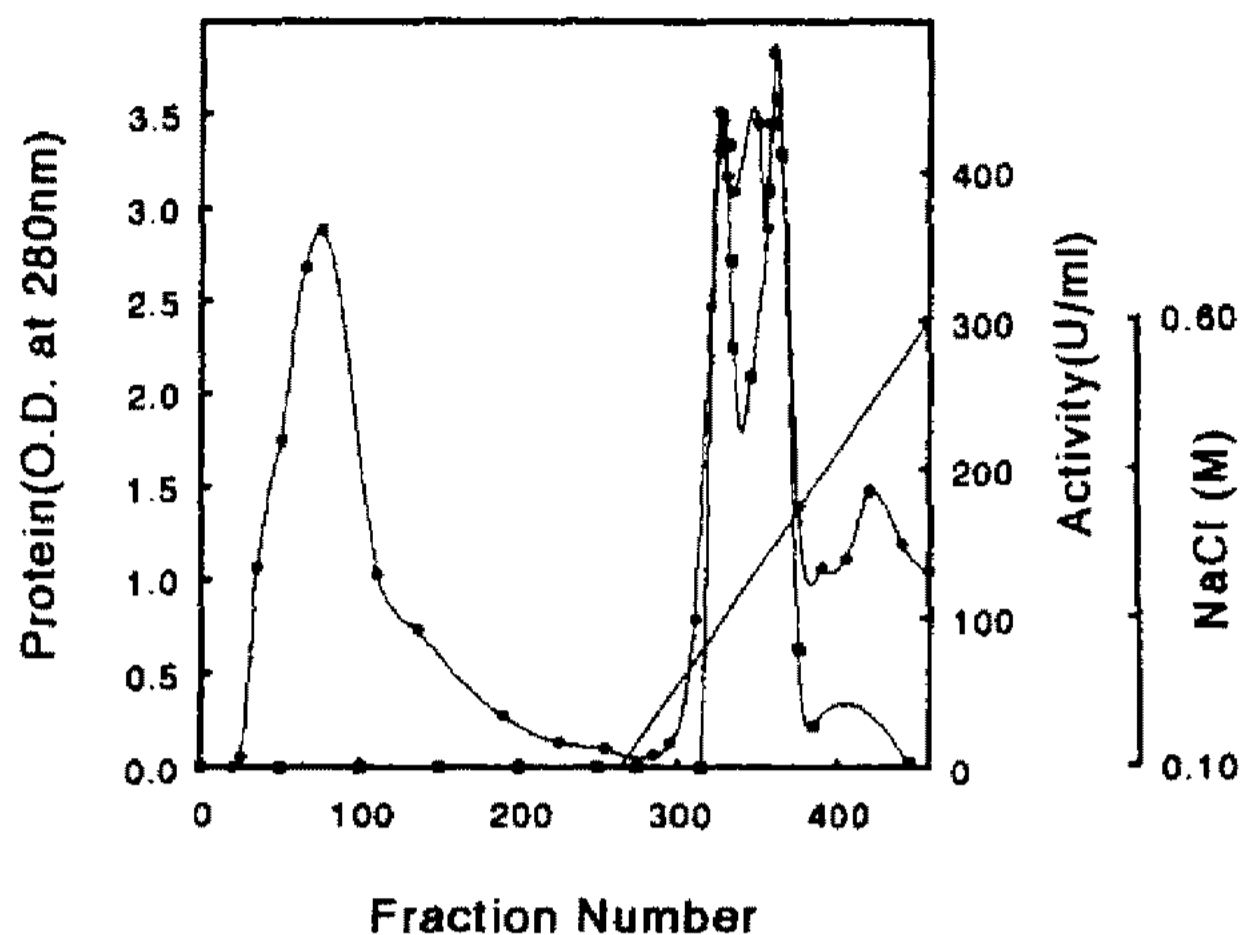


Fig. 1. Ion Exchange column chromatography of the α -arabinofuranosidase on DEAE-Sepharose CL-6B. The ammonium sulfate fraction was charged on the DEAE-Sepharose CL-6B column (2.8 \times 30 cm). After washing with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5), the column was eluted with linear gradient of 0.1 M NaCl and 0.6 M NaCl. Aliquots of each fraction were assayed to determine the distribution of the α -arabinofuranosidase and the protein.
 ●: absorbance at 280 nm, ■: enzyme activity (U/ml)

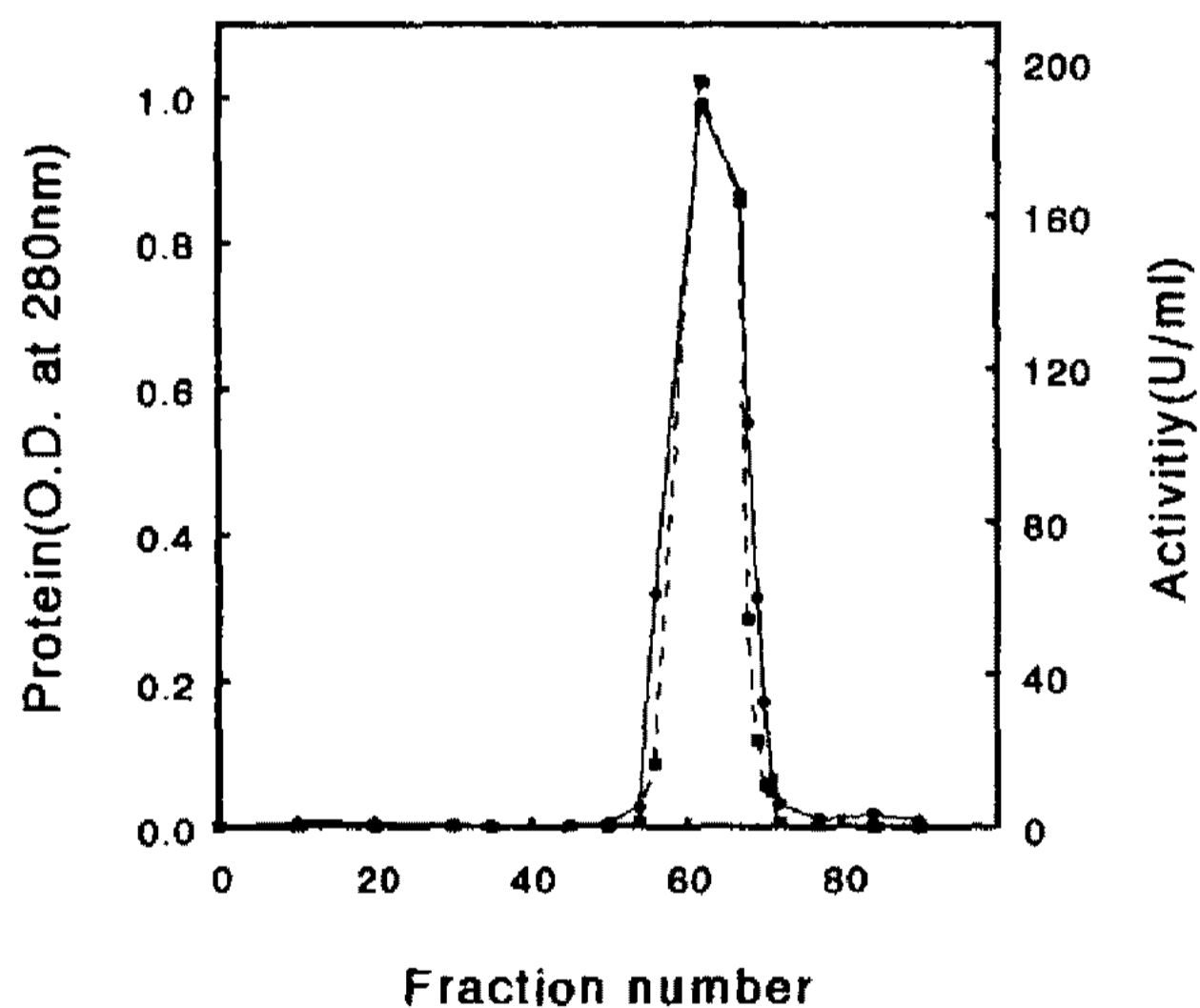


Fig. 2. Gel filtration of the α -arabinofuranosidase on Sepharose 6B-100. Enzyme obtained from ion exchange chromatography was applied to the gel (1.6 \times 91.5 cm). Elution was performed with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) at a flow rate of 12 ml/hr (2 ml/tube).
 ●: absorbance at 280 nm, ■: enzyme activity (U/ml)

pH 변화에 매우 민감한 반응을 나타내었다. 본 효소의 pH 6.5의 활성 최적 pH는 현재까지 보고되고 있는 다른 세균 생산 α -arabinofuranosidase (Table 4 참조) 의 최적 pH와 근사한 값인 것으로 조사되었다. 이에 반해 별도 자료 제공은 하지 않았으나, 효소 안정성은

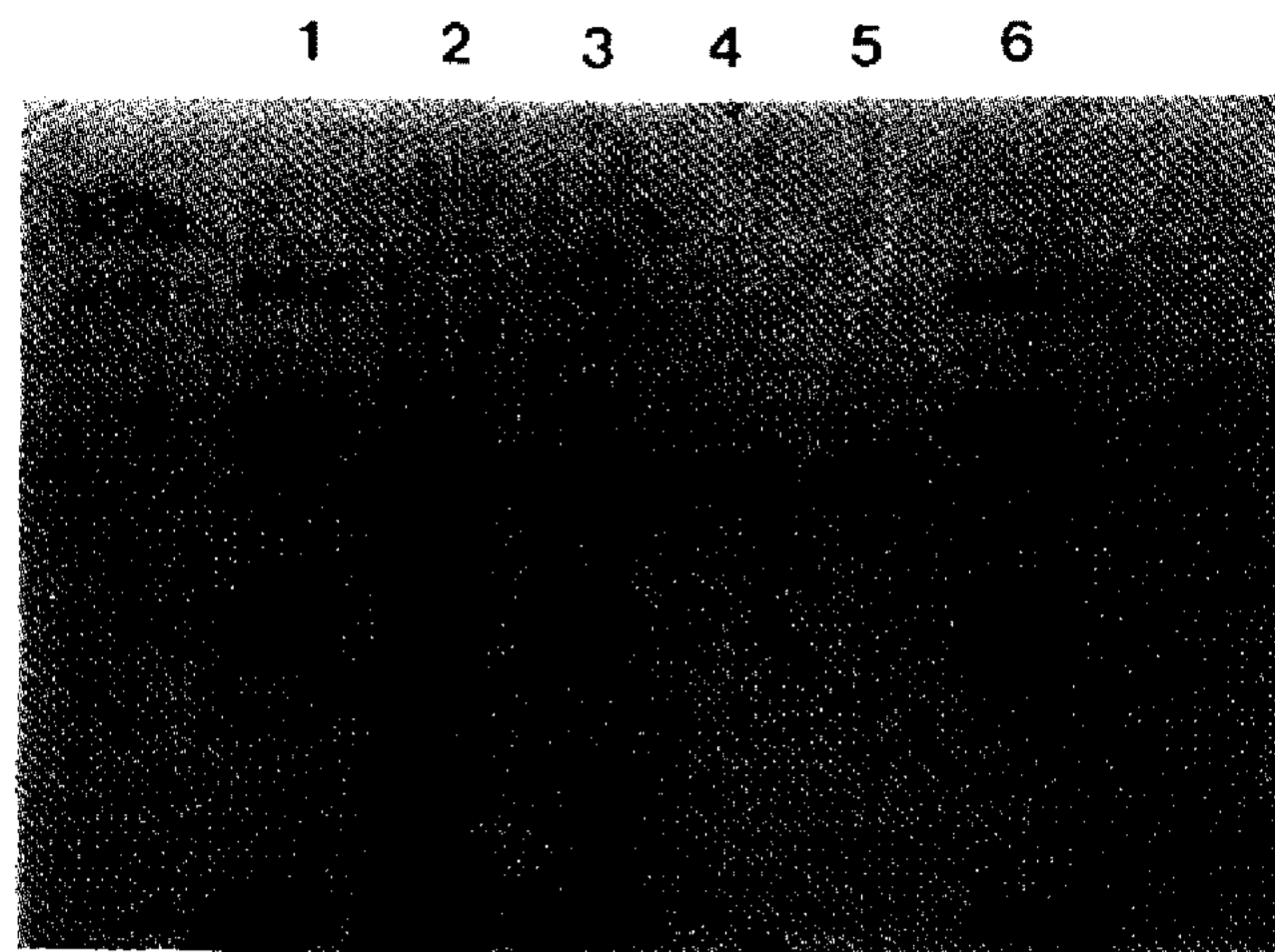


Fig. 3. Electrophoretic monitoring of the major steps of the purification of α -arabinofuranosidase. Electrophoresis was performed in a 8% SDS-polyacrylamide gel.
 Lane 1: size marker protein
 Lane 2: cytoplasmic extract
 Lane 3: ammonium sulfate precipitate
 Lane 4: ion exchange column effluent
 Lane 5: gel filtrate
 Lane 6: size marker protein
 Size marker: myosin 200 kDa, β -galactosidase 116 kDa, phosphorylase b 97 kDa, albumin (bovine) 66 kDa
 Arrow indicates the α -arabinofuranosidase band.

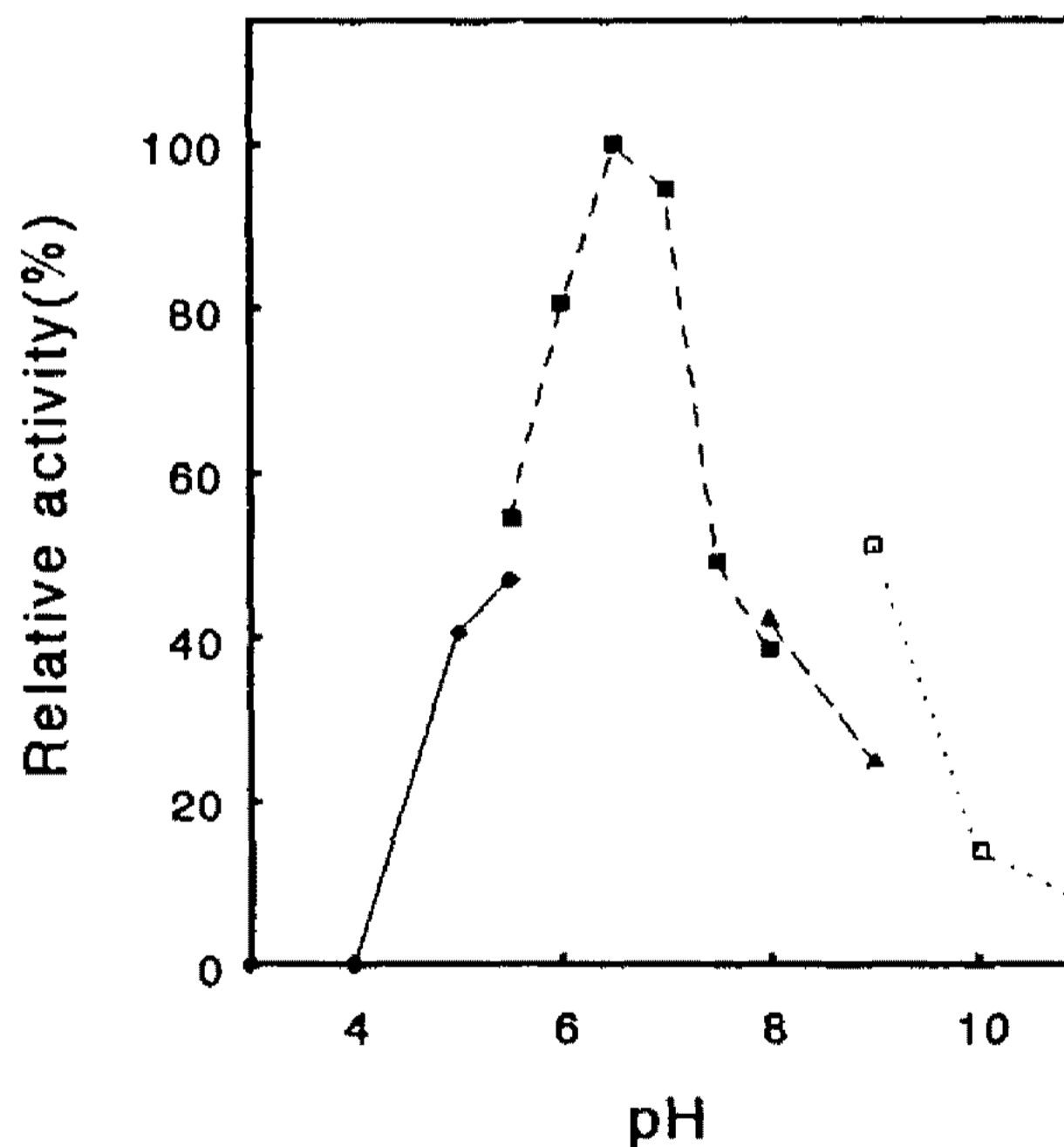


Fig. 4. Effect of pH on the activity of α -arabinofuranosidase. Enzyme reaction was carried out at 45 $^{\circ}$ C for 20 min in 0.05 M citrate-phosphate buffer (pH 3~5.5), 0.05 M phosphate buffer (pH 5.5~8), 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8~9), 0.05 M glycine-NaOH buffer (pH 9~11).
 ●: citrate-phosphate buffer, ■: phosphate buffer, Δ : Tris-HCl buffer, \square : glycine-NaOH buffer

Table 4. Properties of the purified α -arabinofuranosidase from *B. stearothermophilus* and other organisms

Organisms	M.W. (kd)	pH optimum	pH stability	pI	K_m^a	V_{max}^a	Polymers attacked ^b	References
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	289	6.5	9.0	4.7	3.0	319.7	AX, OX	this work
<i>Bacillus subtilis</i>	65	6.5	— ^c	5.3	—	—	BA	22
<i>Ruminococcus albus</i> 8	310	6.9	—	3.8	1.6	—	AH	24
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	94	5.0~5.5	5.5~8.0	8.5	4.0	36.4	BA	25
<i>Streptomyces purpurascens</i>	495	6.5	—	3.9	0.082	89.3	A2, A3	26
<i>Streptomyces</i> sp. strain 17-1	92	6.0	4.0~9.0	4.4	3.6	—	BA, AX, AG	27
<i>Aspergillus niger</i>	53	3.8~4.0	—	3.6	4.9	—	BA, AX	21
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	240	6.0~6.5	4.0~8.0	6.0	0.7	109	CX, OX, AX, BA	23
<i>Monilinia fructigena</i>	40	4.0	—	6.5	0.8	1.03	—	28

^aMeasured with pNPAf as the substrate; K_m is given in mM. V_{max} is given in $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$.

^bAX, arabinoxylan; CX, corn endosperm xylan; OX, oat spelt xylan; BA, beetarabinan; AH, alfalfa hemicelluloses; AG, arabinogalactan; A2, arabinobiose; A3, arabinotriose.

^c—, not determined.

pH 변화에 큰 영향을 받지 않았으며 pH 9 부근에서는 오히려 약간의 활성화 효과를 보였으나 현재로서는 그 원인을 정확히 설명할 수 없다.

최적 온도 및 열 안정성 본 효소의 활성 최적 온도는 *Asp. niger*(21), *B. subtilis*(22) 및 *Butyrivibrio fibrisolvens*(23) 등의 α -arabinofuranosidase와 마찬가지로 55°C 부근이었으며 온도에 매우 민감하여 최적 온도에서 5°C 정도만 차이가 나더라도 20% 이상의 활성 저하 현상이 관찰되었다(Fig. 5). 또한 본 효소는 열에 대해 비교적 안정하여 60°C에서 5시간 처리한 후에도 약 50%의 활성을 유지하고 있었다(Fig. 6).

기질 특이성 조효소 경우와 마찬가지로 정제 α -arabinofuranosidase 역시 매우 높은 기질특이성을 보였다. Table 3과 같이 합성기질 중에서는 pNPAf에 대해서만 높은 활성을 나타내고 o-nitrophenyl- β -xylopyranoside에 약간의 활성을 보일 뿐이었다. 자연 기질의 경우도 arabinoxylan에만 작용하였다. 한편, Lineweaver-Burk plotting을 하여 본 효소의 pNPAf에 대한 K_m 및 V_{max} 값을 측정해 본 결과, 각각

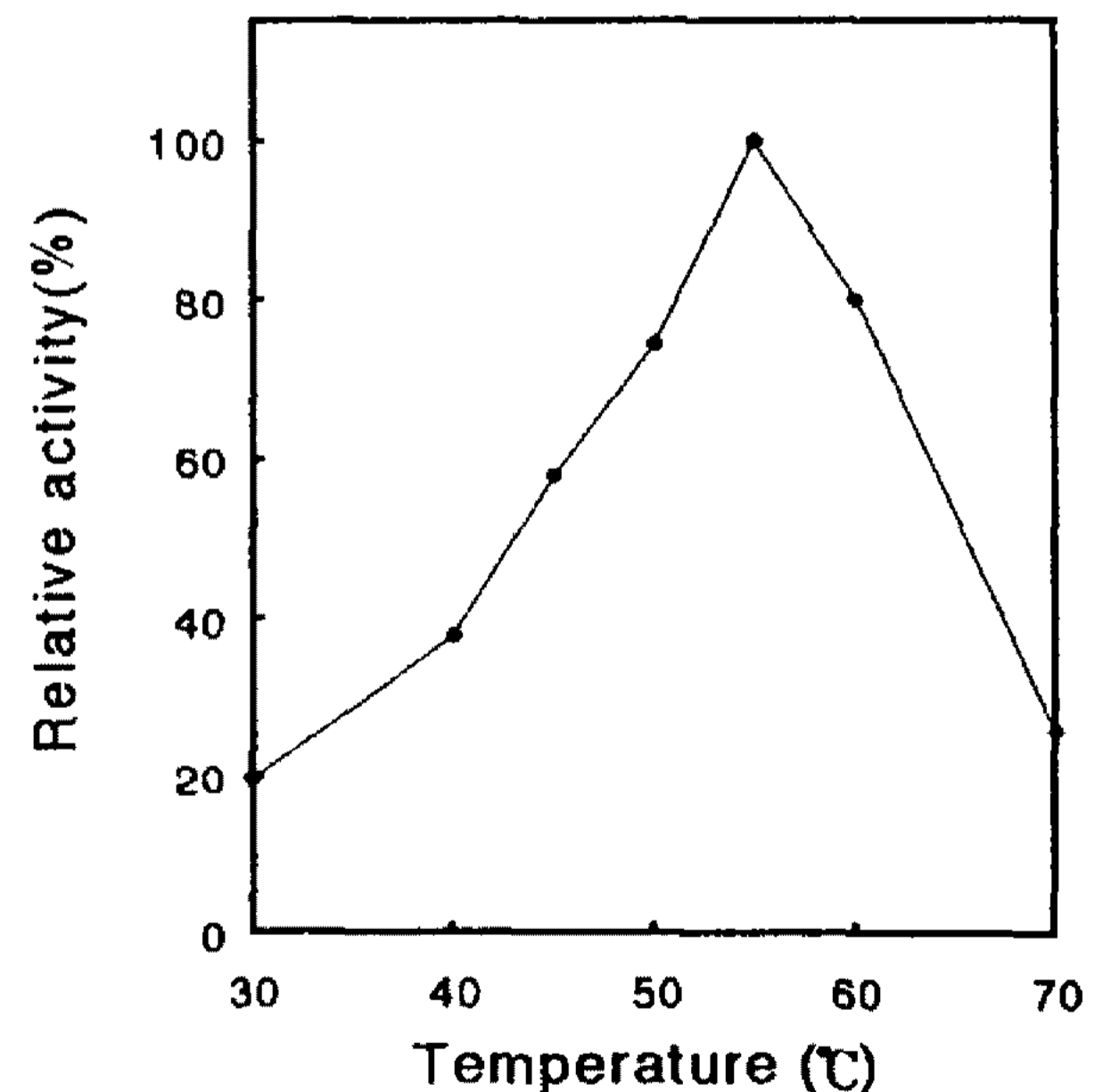


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of α -arabinofuranosidase.

Enzyme reaction was carried out at each temperature for 20 min in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5).

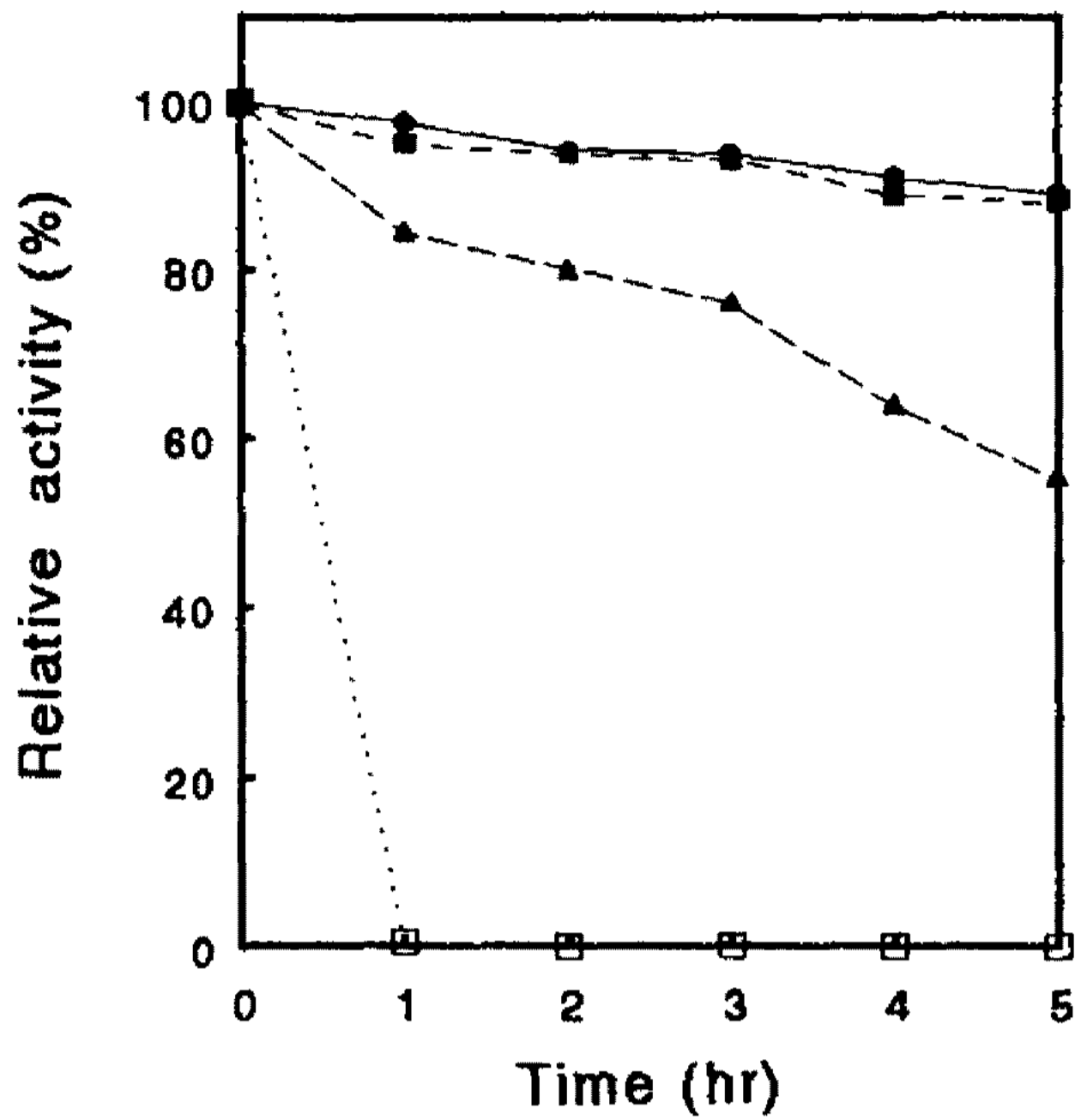


Fig. 6. Thermal stability of the α -arabinofuranosidase. Enzyme activity was measured under standard condition at 45°C for 20 min after allowing the reaction mixture stand in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) at various temperature indicated in the figure. Aliquots were taken at various times and the residual activities were assayed and represented as the percentage of untreated control.
 ●: 40°C, ■: 50°C, ▲: 60°C, □: 70°C

2.99 mM, 0.43 $\mu\text{mole}/\text{min}$ (319.74 $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$)으로 계산되었다.

Isoelectric point Bio-Rad의 IEF standard와 vertical slab gel을 이용한 isoelectric focusing 실험을 실시하여 본 α -arabinofuranosidase의 pI 값을 측정해 본 결과, Fig. 7과 같이 pH 4.5 부근에서 단백질 분리대를 확인할 수 있었다. 지금까지 보고되고 있는 각종 미생물 α -arabinofuranosidase의 pI 값은 pH 3.6~8.5 범위에서 균종에 따라 다양한 값을 보이고 있어 pI 값의 어떤 특별한 경향을 찾아볼 수 없었다(Table 4 참조).

분자량 α -Arabinofuranosidase의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel 전기 영동법으로는 약 108 kDa, gel filtration 법으로는 약 289 kDa으로 측정되었다(Fig. 8, 9 참조). 따라서 본 효소는 세개의 동일 subunit로 구성된 일종의 trimer의 구조를 가지고 있는 것으로 판단된다. 지금까지 보고되고 있는 미생물 생산 α -arabinofuranosidase 들은 100 kDa 이하의 작은 것과 240 kDa 이상의 큰 분자량의 효소로 대별되고 있어(Table 4 참조) 본 α -arabinofuranosidase는 분자량이 큰 부류에 속함을 알 수 있었다.

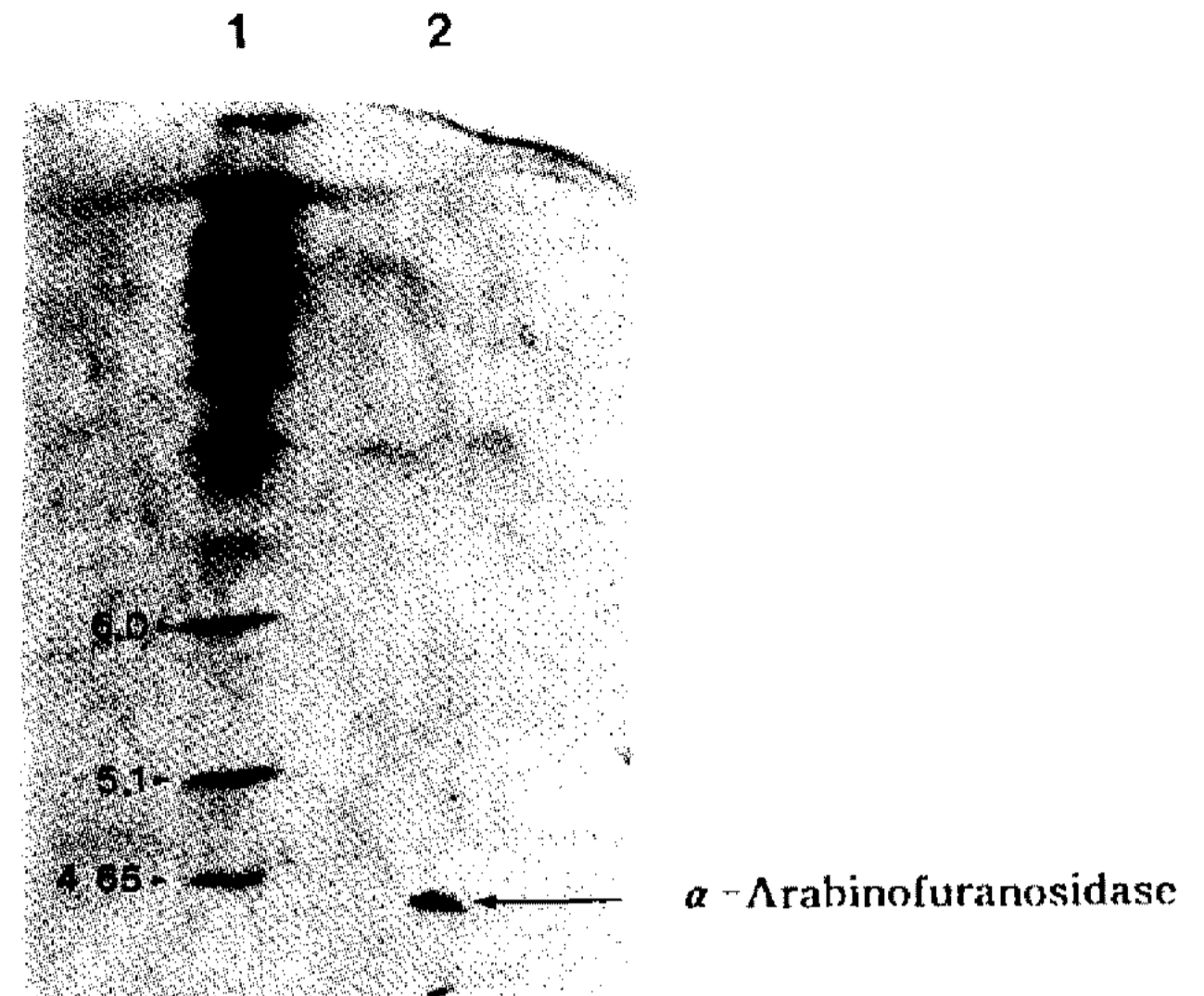


Fig. 7. Isoelectricfocusing (pH 3~10) of the α -arabinofuranosidase.

Focusing was carried out in 5% (w/v) polyacrylamide vertical gel containing biolyte 3/10 (pH 3~10) and biolyte 5/7 (pH 5~7), and it was run under constant voltage conditions in the stepped fashion at 200 V for 1.5 hour and 400 V for 1.5 hour.

Lane 1. Bio-Rad IEF standards (from top to bottom)

pI 9.6	Cytochrome C
7.8, 8.0, 8.2	Lentil lectin (3 bands)
7.5	Human hemoglobin C
7.1	Human hemoglobin A
7.0	Equine myoglobin
6.5	Human carbonic anhydrase
6.0	Bovine carbonic anhydrase
5.1	β -Lactoglobulin B
4.65	Phycocyanin

Lane 2. α -arabinofuranosidase

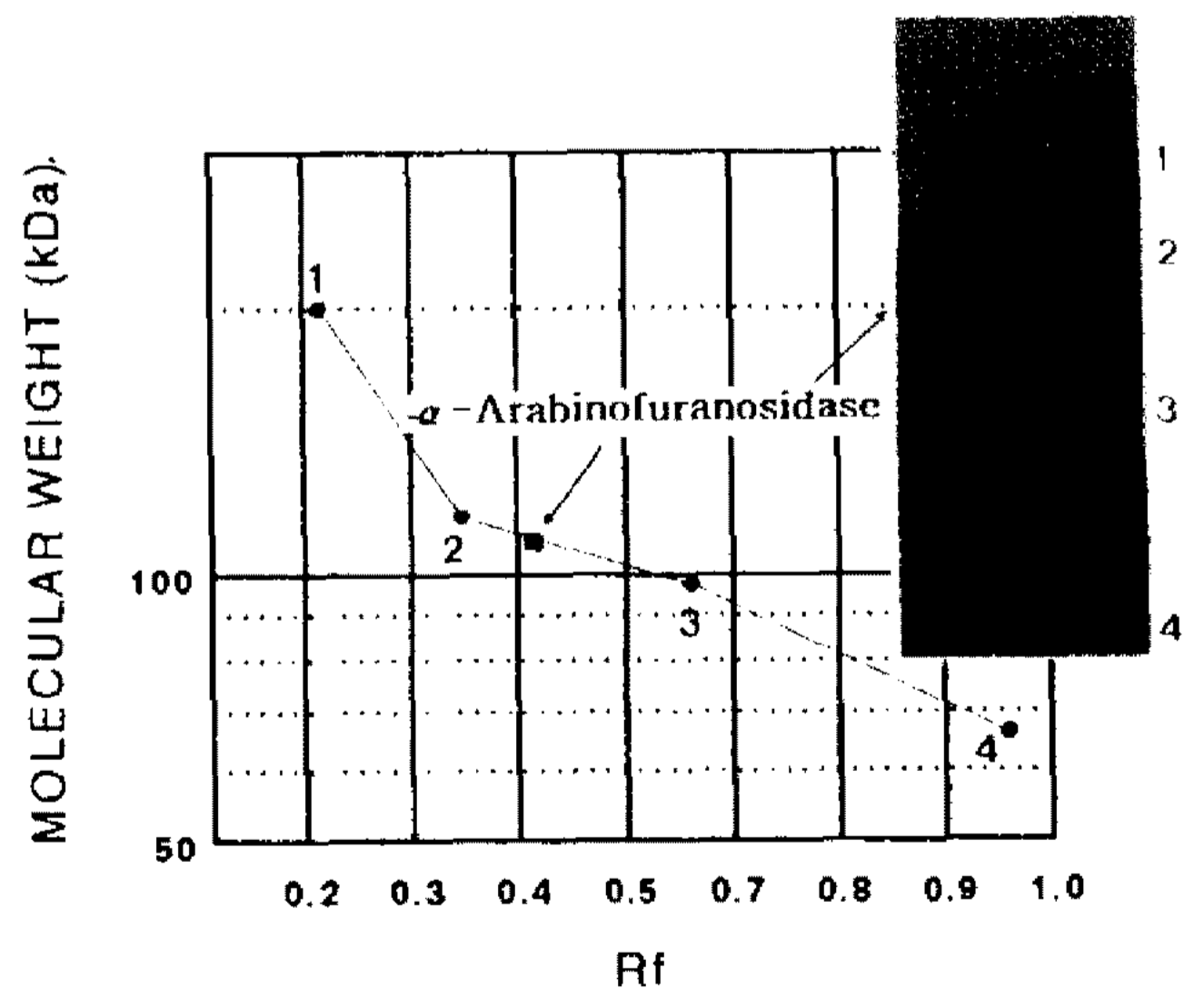


Fig. 8. Molecular weight estimation of the α -arabinofuranosidase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (log₁₀ molecular weight vs. relative mobility).

Size marker: 1. myosin 200 kDa, 2. β -galactosidase 116 kDa, 3. phosphorylase b 97 kDa, 4. albumin (bovine) 66 kDa

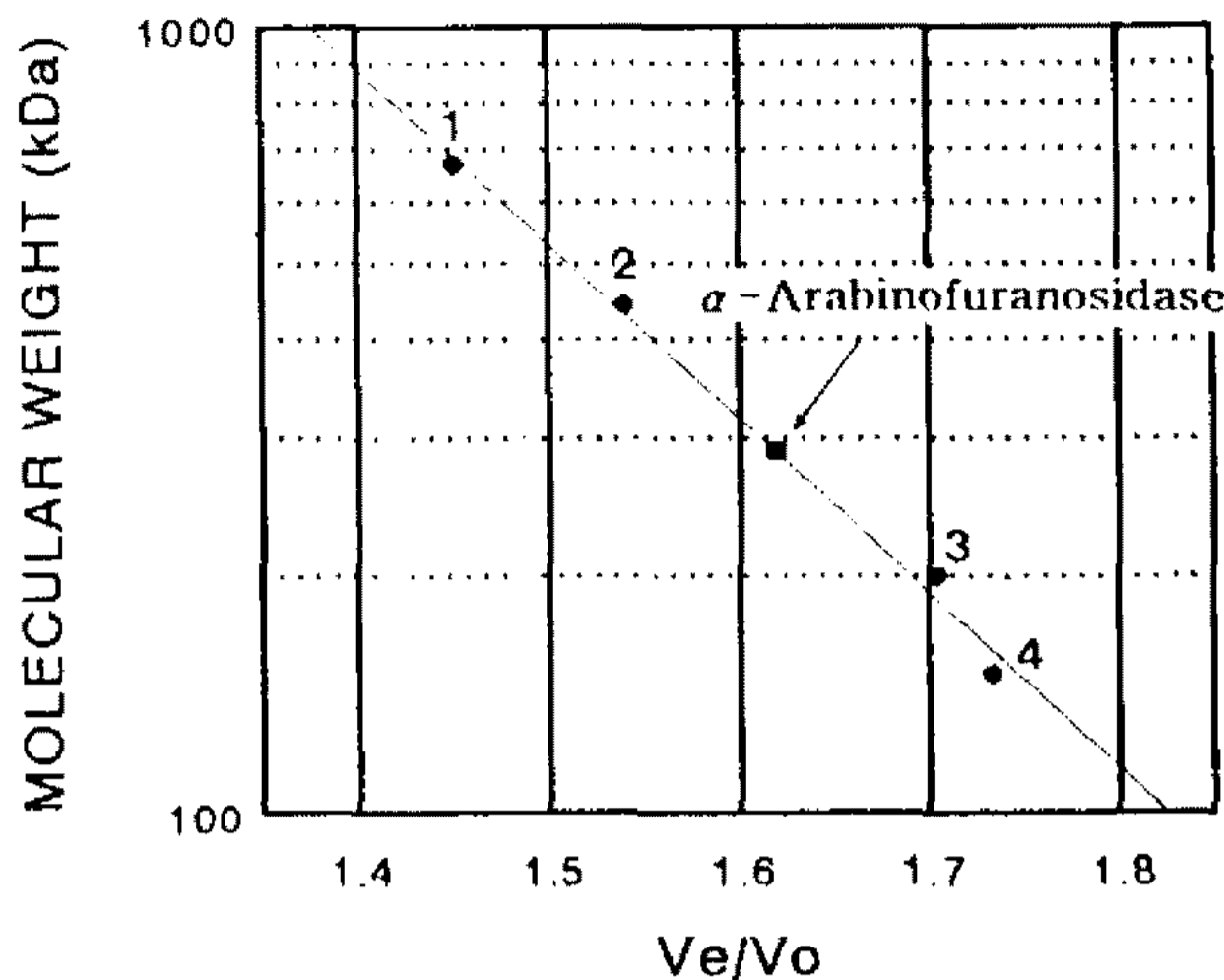


Fig. 9. Molecular weight estimation of the purified α -arabinofuranosidase by gel-filtration.

Sepharose 6B-100 was used for gel matrix. V_e : elution volume, V_o : void volume.

The standard proteins used were the following:

1. Thyroglobulin	669,000 dal.
2. Apo ferritin	443,000 dal.
3. β -Amylase	200,000 dal.
4. Alcohol dehydrogenase	150,000 dal.

N-말단 아미노산 서열 결정 Protein sequencer를 이용하여 본 효소의 N-말단 15개 아미노산의 서열을 결정해 본 결과 X-Ser-Thr-Ala-Pro-Arg(?)-Ala-Thr-Met-Val-Ile-Asp-X-Ala-Phe(X: 결과가 나오지 않은 경우, ? : 가능성은 있지만 확신할 수는 없음)로 분석되었다. 이와 같은 결과는 현재로서 이용할 수 있는 정보가 없기 때문에 다른 α -arabinofuranosidase의 아미노산 서열과 비교분석은 할 수 없으나 앞으로 본 효소 생산 유전자의 염기 서열 분석에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

*Bacillus stearothermophilus*의 α -arabinofuranosidase 생산 유전자(*arfI*)가 클로닝된 재조합 플라스미드 (pKMG11)를 가지고 있는 *E. coli* HB101/pKMG11 균주에 의한 α -arabinofuranosidase 생산 최적 배양 조건을 조사해 본 결과, 탄소원으로 0.5% arabinose를 첨가한 LB 배지에서 약 20시간 배양했을 때 가장 높은 생산량을 보였다. 또한 상기 배양 조건에서 다량의 효소를 생산하고 생산 α -arabinofuranosidase를 ammonium sulfate 분획, DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange column chromatography 및 Sepharose 6B-100 gel 여과 등의 과정을 거쳐 단일 단백질로 정제하였다. 정제 효소는 pH 6.5와 55°C에서 가장 높은

효소 활성을 보였고, 자연기질로는 arabinoxylan, 합성기질은 pNPAf에만 작용하는 매우 높은 기질특이성을 보이면서 pNPAf에 대한 K_m 값은 2.99 mM, V_{max} 값은 0.43 $\mu\text{mole}/\text{min}$ (319.74 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$)로 측정되었다. 또한 본 효소의 pI 값은 4.5 정도였으며 분자량은 SDS-polyacrylamide gel 영동법으로는 약 108 kDa, gel 여과법에 의해서는 약 289 kDa 정도로 측정됨으로써, *arfI* 생산 α -arabinofuranosidase는 trimer 인 것으로 확인되었으며 N-말단 아미노산 서열은 X-Ser-Thr-Ala-Pro-Arg(?)-Ala-Thr-Met-Val-Ile-Asp-X-Ala-Phe으로 결정되었다.

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.
- 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.
- Utt, E.A., C.K. Eddy, K.F. Keshav, and L.O. Ingram. 1991. Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens xylB* gene encoding a novel bifunctional protein with β -D-xylosidase and α -arabinofuranosidase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1227-1234.
- Biely, P., J. Pulse, 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.
- Song, H.S. and Y.J. Choi. 1989. Production of

- xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
10. 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.
 11. 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.
 12. Kim, H.S., S.J. Eom, S.G. Cho and Y.J. Choi. 1994. Molecular cloning and expression of the acetyl xylan esterase gene (*estII*) of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 599-606.
 13. 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.
 14. Eom, S.J., H.S. Kim, S.G. Cho, and Y.J. Choi. 1994. Molecular cloning and expression of the α -L-arabinofuranosidase gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 607-613.
 15. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426.
 16. 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.
 17. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
 18. Bollag, D.M. and S.J. Edelman. 1991. *Protein Methods*, Pp. 134. Wiley-Liss, Inc.
 19. Bollag, D.M. and S.J. Edelman. 1991. *Protein Methods*, Pp. 161-180. Wiley-Liss, Inc.
 20. Stryer, L. 1988. *Biochemistry*, Pp. 53. W.H. Freeman Company, New York.
 21. Kaji, A. and K. Tagawa. 1970. Purification, crystallization and amino acid composition of α -L-arabinofuranosidase from *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta.* **207**: 456-464.
 22. Weinstein, L. and P. Albersheim. 1979. Structure of plant cell walls. IX. Purification and partial characterization of a wall degrading end-arabinase and an arabinosidase from *Bacillus subtilis*. *Plant Physiol.* **63**: 425-432.
 23. Hespell, R.B. and P.J. O'bryan. 1992. Purification and characterization of an α -arabinofuranosidase from *Butyrivibrio fibrisolvens* GS113. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1082-1088.
 24. Greve, J.C., J.M. Labavitch, and R.E. Hungate. 1984. α -Arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1135-1140.
 25. Lee, S.F. and C.W. Forsberg. 1987. Purification and characterization of an α -arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Can. J. Microbiol.* **33**: 1011-1016.
 26. Komae, K., A. Kafi, and M. Sato. 1982. An α -L-arabinofuranosidase from *Streptomyces purpurascens* IFO 3389. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1899-1905.
 27. Kaji, A., M. Sato, and Y. Tsutsui. 1981. An α -L-arabinofuranosidase produced by wild-type *Streptomyces* sp. no. 17-1. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 945-931.
 28. Kelly, M.A., M.L. Sinnott, and M. Herrchen. 1987. Purification and mechanistic properties of an extracellular α -L-arabinofuranosidase from *Monilia fructigena*. *Biochem. J.* **245**: 843-849.

(Received 9 March 1995)