

재조합 균주 *Escherichia coli*가 생산하는 *Bacillus stearothermophilus* Acetyl Xylan Esterase II의 정제 및 특성

김희선 · 서정한 · 최용진*
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Purification and Characterization of Acetyl Xylan Esterase II from *Escherichia coli* Cells Harboring the Recombinant Plasmid pKMG7

Hee-Sun Kim, Jung-Han Suh and Yong-Jin Choi*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources,
Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — Acetylxylan esterase II was produced by *Escherichia coli* HB101 harboring the recombinant plasmid pKMG7 which contained the *estII* gene of *Bacillus stearothermophilus*. Optimal medium for the production of the acetylxylan esterase by *E. coli* HB101/pKMG7 was determined to contain 0.5% galactose, 1% yeast extract and 1% NaCl. The enzyme produced was purified to homogeneity using a combination of 20~50% ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose CL-6B chromatography and Sephacryl S-200 gel filtration. The temperature and pH optimum of the esterase were 45°C and pH 6, respectively. The essential amino acids for the esterase activity were found to be methionine, serine, and cysteine. Molecular weight of the esterase was determined to be 28 kDa by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and 120 kDa by gel filtration. This suggests that the functional enzyme is a homomeric tetramer. The esterase had an isoelectric point of pH 3.4. The N-terminal amino acid sequence of the enzyme was Ala-Leu-Phe-Glu-Ser-Arg-Phe-Phe-Ser-Glu-Val-Leu-Gly-Leu.

Bacillus stearothermophilus 토양 분리균(1)은 강력한 xylan 분해 균주로서 xylanase와 β -xylosidase의 주 xylan 분해 효소는 물론이고 acetyl xylan esterase, α -arabinofuranosidase 및 α -glucuronidase 등과 같은 탈축쇄 효소도 다량 생산하는 것을 확인하였고 또 이들 각종 xylan 분해 효소 생산 유전자들도 분리 클로닝하였다(2-6). 특히 acetyl xylan esterase의 경우는 두개의 서로 다른 효소 생산 유전자(*estI*과 *estII*)를 분리 클로닝(4,5)하였으며, *estI* 생산 esterase는 이미 그 특성을 조사하여 보고한 바 있다(7). 본 연구에서는 *estII* 유전자가 생산하는 esterase를 정제, 정제 효소의 일반 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 시약

Acetyl xylan esterase 생산 균주는 *Escherichia coli* HB101/pKMG7이었으며 pKMG7은 *Bacillus stearothermophilus*의 *estII* 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드이다(5). DEAE-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-200은 Sigma사 제품이었으며, 효소 기질인 methylacetylsalicylate(MAS)는 Tokyo Kasei Kogyo co(Tokyo, Japan), 그리고 p -nitrophenyl acetate는 Sigma사로 부터 구입하였다. 기타 일반 시약류는 시판 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다. Acetyl xylan의 경우에는 DMSO 200 ml에 xylan 10 g을 60°C에서 용해시킨 후 25~50%에 해당하는 dimethylaminopyridine을 acetic anhydride 200 ml과 함께 첨가하고 증류수로 24시간 투석시킨 후 여과시켜 남은 물질을 건조시켜 사용하였다.

Key words: Purification, characterization, acetylxylan esterase II, recombinant plasmid, *Bacillus stearothermophilus*

*Corresponding author

표준 효소 활성 측정 및 단백질 정량

효소 기질은 MAS 또는 p -nitrophenyl acetate를 사용하였으며 MAS를 사용한 경우는 Iwai 등의 방법

(8)에 따라 45°C에서 30분간 반응시킨 후 300 nm에서 반응 생성물을 정량하였다. 또한 *p*-nitrophenyl acetate(50 mM in 50 mM phosphate buffer, pH 6.5)는 기질 100 μ 에 동량의 효소액을 첨가하여 20분간 반응시킨 후 2 ml의 증류수를 첨가하여 반응을 정지시킨 다음 405 nm에서 비색정량하였다(3). 1분 동안에 각각 1 μ mole의 methylsalicylate, 또는 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다. 한편 β -D-xylose tetraacetate, β -D-glucose pentaacetate, triacetin (10 mg/ml in 50 mM phosphate buffer, pH 6.5) 및 acetylxylin(5 mg/ml in 50 mM phosphate buffer, pH 6.5)의 경우 기질용액 0.5 ml에 효소 0.5 ml를 첨가, 45°C에서 30분간 반응시킨 후 0.1 N H₂SO₄ 10 μ 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응정지 후 불용성 잔여물을 완전 제거하고 상등액의 일정량을 취하여 효소 반응에 의해 생성된 acetic acid을 HPLC를 이용하여 정량하였으며 1분 동안에 1 μ mole의 acetic acid를 생산할 수 있는 효소량을 1 unit로 표시하였다. HPLC분석은 HPX-87H column(7.8 \times 300 mm, Bio-Rad)과 mobile phase로 0.01 N H₂SO₄용액을 사용하여 0.5 ml/min의 속도로 용출시켜 분석하였다(9).

Column 용출액 중의 단백질량은 280 nm 자외선 흡광도법을, 기타 시료의 경우에는 bovine serum albumin을 표준 단백질로한 Lowry법(10)을 이용하여 측정하였다.

생산효소의 세포내 외 분포 분석

E. coli HB101/pKMG7이 생산하는 esterase의 세포내외의 분포는 Neu 등의 방법(11)에 기초한 Cornelis 등의 방법(12)에 따라 Osmotic shock을 이용하여 각 분획으로 분리, 측정하였다.

조효소액 조제

E. coli HB101/pKMG7 배양액을 원심분리하여 균체를 분리한 후 적당량의 인산 완충 용액(50 mM, pH 6.5)에 현탁시켜 소량의 경우는 초음파 처리(Suhill, 20 kHz)하고, 다량의 경우에는 French pressure cell press(SLM Instruments INC.)를 이용, 균체를 파쇄한 다음 원심분리(Sorvall A50 rotor, 5000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

Ammonium sulfate 분획

조효소액을 10% 간격으로 ammonium sulfate 분획을 실시, 효소 활성이 높았던 20~50%분획을 취한 후 Amicon(YM10)을 이용하여 ammonium sulfate를

제거함과 동시에 효소액을 농축하였다.

DEAE-Sepharose CL-6B chromatography

Ammonium sulfate 분획하여 분리한 효소액을 50 mM 인산 완충용액 (pH 6.5)으로 평형시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column(2.6 \times 20 cm)에 흡착시키고 동일 완충용액으로 세척하였다. 세척 후 column용적의 5배 NaCl 용액(0.1~0.6 M in 50 mM phosphate buffer(pH 6.5))을 사용하여 20 ml/hr의 용출속도(3 ml/tube)로 linear gradient elution을 실시하였다.

Sephacryl S-200 gel filtration chromatography

Ion exchange chromatography를 거쳐 부분 정제된 효소액을 인산 완충용액(50 mM, pH 6.5)으로 평형시킨 Sephacryl S-200 column(1.6 \times 75 cm)을 이용, 동일 완충용액으로 시간당 20 ml/hr(2 ml/tube)의 속도로 여과하였다.

정제효소의 순도 검정 및 분자량 측정

정제 효소의 순도 검정은 12% SDS-polyacrylamide gel과 Tris-glycine 완충용액(pH 8.3)을 사용한 Laemmli(13)법을 이용하였다. 또한 정제 효소의 분자량은 SDS slab gel 전기영동법(14)과 Sephacryl S-200(1.6 \times 75 cm)을 이용한 gel 여과법(15)으로 측정하였다.

화학적 수식 (Chemical modification)

정제효소에 각종 modifier 일정량을 첨가하고(Table 5 참조) 실온에서 30분간 반응시킨 후 잔여 효소 활성을 측정, 효소 활성화에 필수적인 역할을 하는 아미노산 잔기를 식별하였다.

N-말단 아미노산 서열 결정

정제 효소의 N-말단 아미노산 서열은 기초과학 지원 센타 서울분소에 의뢰하여 Edman degradation 방법에 원리한 Milligen 6600 B protein sequencer를 이용하여 결정하였다.

Esterase의 isoelectric point의 결정

정제한 esterase는 ampholyte(biolyte pH 3~10, 5~7, Bio-Rad, 최종 농도 2%)를 혼합한 5% polyacrylamide gel에서 100 V에서 15분, 200 V에서 15분, 450 V에서 1시간 동안 전개시켰다. 전개가 끝난 gel은 10% trichloroacetic acid(TCA) 용액에서 30분간, 1% TCA용액에서 24시간 세척한 다음 Coomassie blue로 염색하여 단백질대를 확인하였다(16). pI의 표준 물질로는 Bio-Rad의 IEF standards를 사용하였다.

결과 및 고찰

생산효소의 세포내 외 분포 분석

E. coli HB101/pKMG7가 생산하는 esterase의 세포내외의 분포를 osmotic shock을 이용(10)하여 extracellular, periplasmic, intracellular fraction으로 나누어 효소활성을 측정된 결과, 생산 esterase의 96% 이상이 세포내에 존재하는 것을 알 수 있었다(Table 1).

Esterase 생산을 위한 최적 배양 조건의 결정

다량의 효소를 생산, 정제 과정을 효율화하기 위하여 *E. coli* HB101/pKMG7에 의한 esterase 생산 최적 배지 조성과 배양시간을 조사하였다. 1% NaCl, 1% yeast extract 및 0.5% galactose의 배지에서 약 19시간 배양했을 때 최대의 효소 생산량을 얻었다.

효소 정제

Esterase 생산 최적 배지(2l)에서 19시간 배양하여 얻은 균체로부터 159 ml(109,429.4 units)의 조효소액

Table 1. Subcellular distribution of the estII esterase produced by *E. coli* HB101/pKMG7

Cell fraction	Enzyme activity (Units)*	Relative activity (%)**
Extracellular	82.01	2.87
Periplasmic	5.30	0.18
Intracellular	2771.43	96.95
Total	2858.74	100.00

*Enzyme reaction was carried out at 45°C for 30 minutes in the reaction mixture containing 3 ml of 10 mM methylacetylsalicylate and 550 µl of enzyme solution. One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme liberating 1 mole of methylsalicylate per min.

**The % of relative activity of each cell fraction was determined relative to the total enzyme activity.

Table 2. Summary of purification of esterase from *E. coli* HB101/pKMG7

Step	Volume (ml)	Total activity* (units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Cytoplasmic extract	159	109,429.4	1,912.3	57.2	100	1
Ammonium sulfate fractionation	16	101,011.8	1,176.6	85.9	92.3	1.5
DEAE-Sepharose CL-6B	5.5	2,808.7	25.4	110.6	2.6	1.9
Sephacryl S-200	2	190.1	1.1	170.4	0.2	2.9

*One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme liberating 1 µmole of methylsalicylate per min.

을 얻고 Table 2에 요약된 과정, 즉 20~50% ammonium sulfate, DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography(Fig. 1) 및 Sephacryl S-200 column gel filtration 과정(Fig. 2)을 거쳐 esterase를 단일 단백질로 분리 정제 하였다(Table 2, Fig. 3).

정제 효소의 일반 특성

효소 활성과 안정성에 대한 pH와 온도 효과

pH 4~9 범위에서 pH를 적당한 간격으로 조정된 각종 0.05 M의 완충용액을 이용, esterase 활성에 미치는 pH 효과를 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 6 부근에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편 esterase 활성에 미치는 온도의 영향은 45°C에서 최적을 나타내었다(Fig. 5). 또한 본 효소는 Fig. 6에 표시되어 있는 바와 같이 60°C에서 5시간 가열한 후

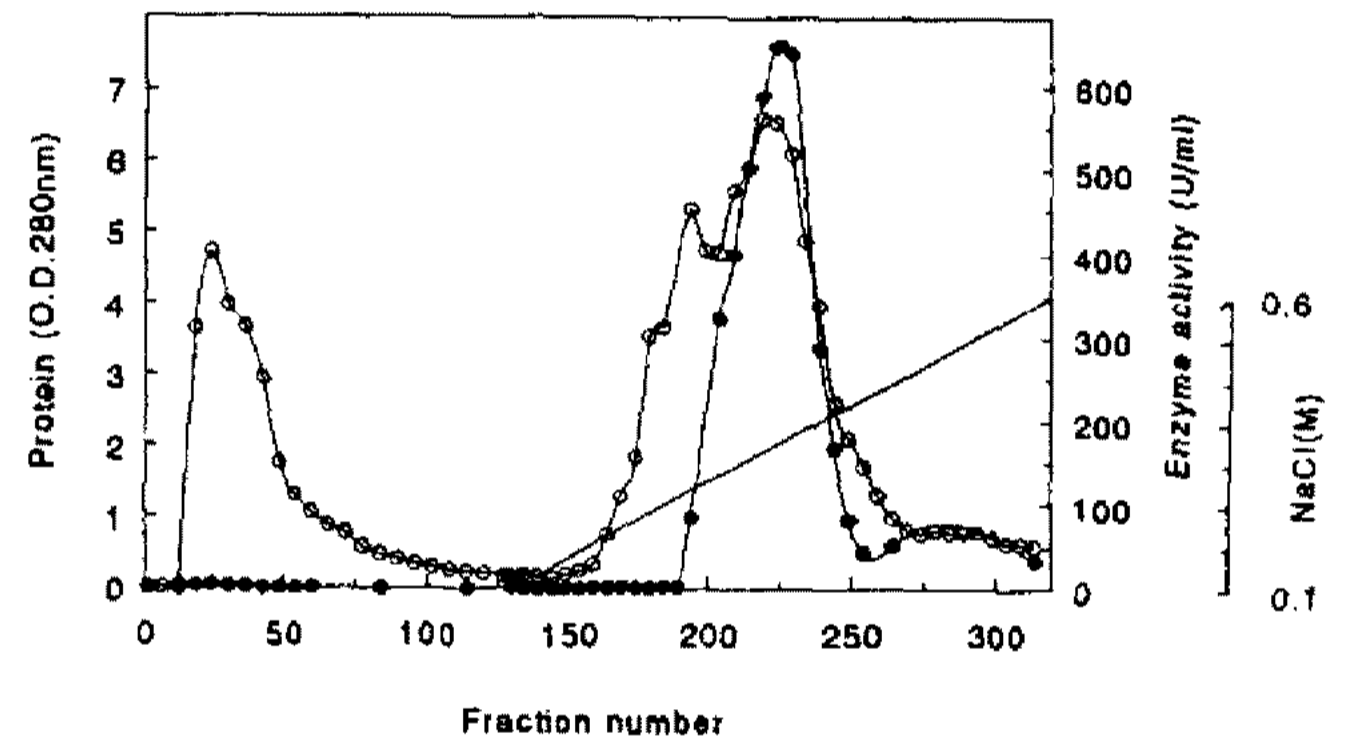


Fig. 1. Elution profile of the ammonium sulfate precipitate on DEAE-Sepharose CL-6B.

The ammonium sulfate precipitate was charged on DEAE Sepharose CL-6B column(2.6×75 cm). After washing with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.5), the column was eluted with a linear gradient of sodium chloride(0.1~0.6 M) at a flow rate of 20 ml/hr(3 ml/tube). Aliquots of each fractions were assayed to determine of the esterase activity and protein concentration. Substrate used for the esterase activity measurement was MAS in all of the purification steps. Fractions 224 and 225 were pooled.

○ absorbance at 280 nm, ● enzyme activity

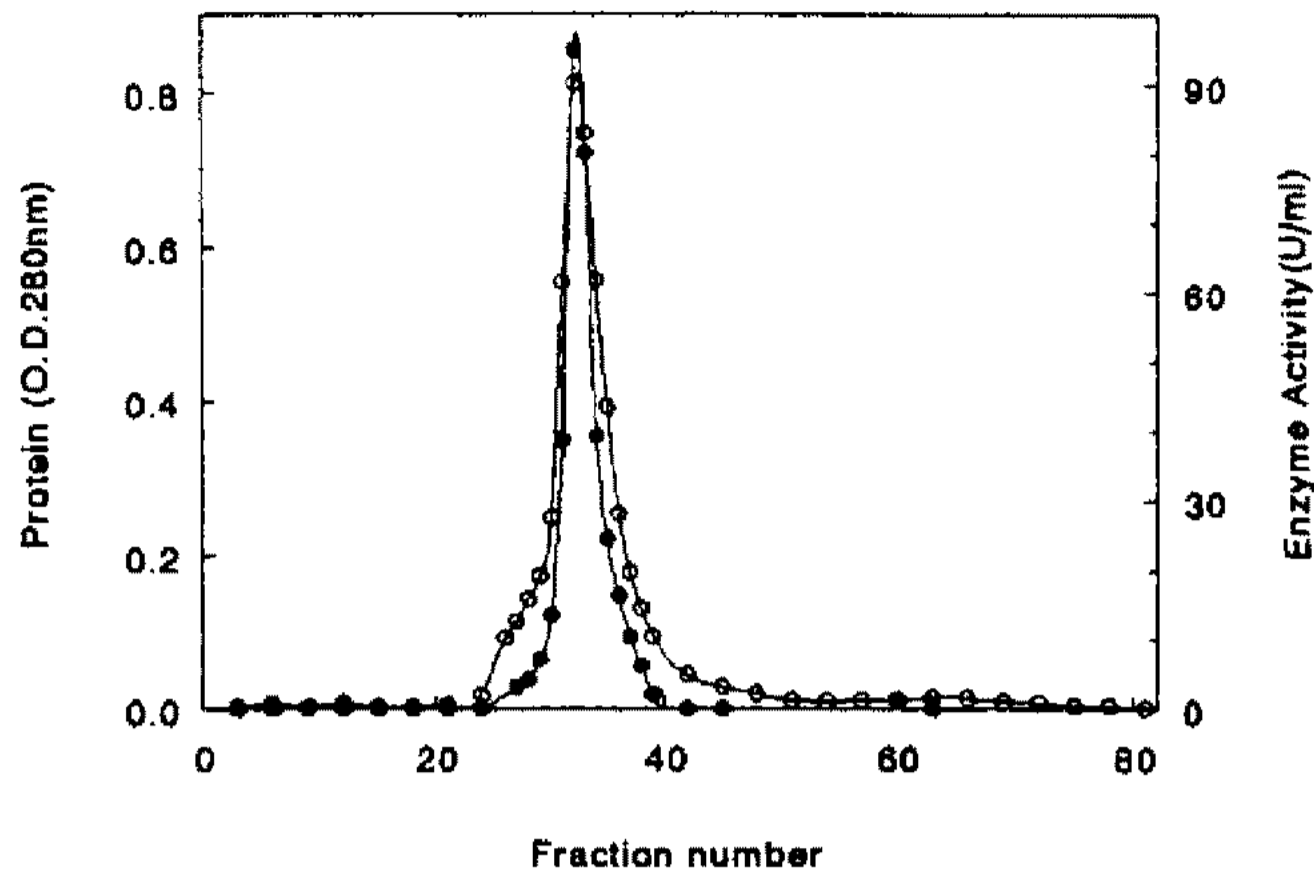


Fig. 2. Gel filtration of the pooled fraction from ion-exchange chromatography on Sephacryl S-200. The fractions obtained from DEAE-Sephacryl S-200 chromatography was applied to the gel filtration column(1.6×75 cm). Elution was performed with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) at a flow rate of 20 ml/hr(2 ml/tube). Fraction 32 was pooled. ○ absorbance at 280 nm, ● enzyme activity

1 2 3 4 5 1

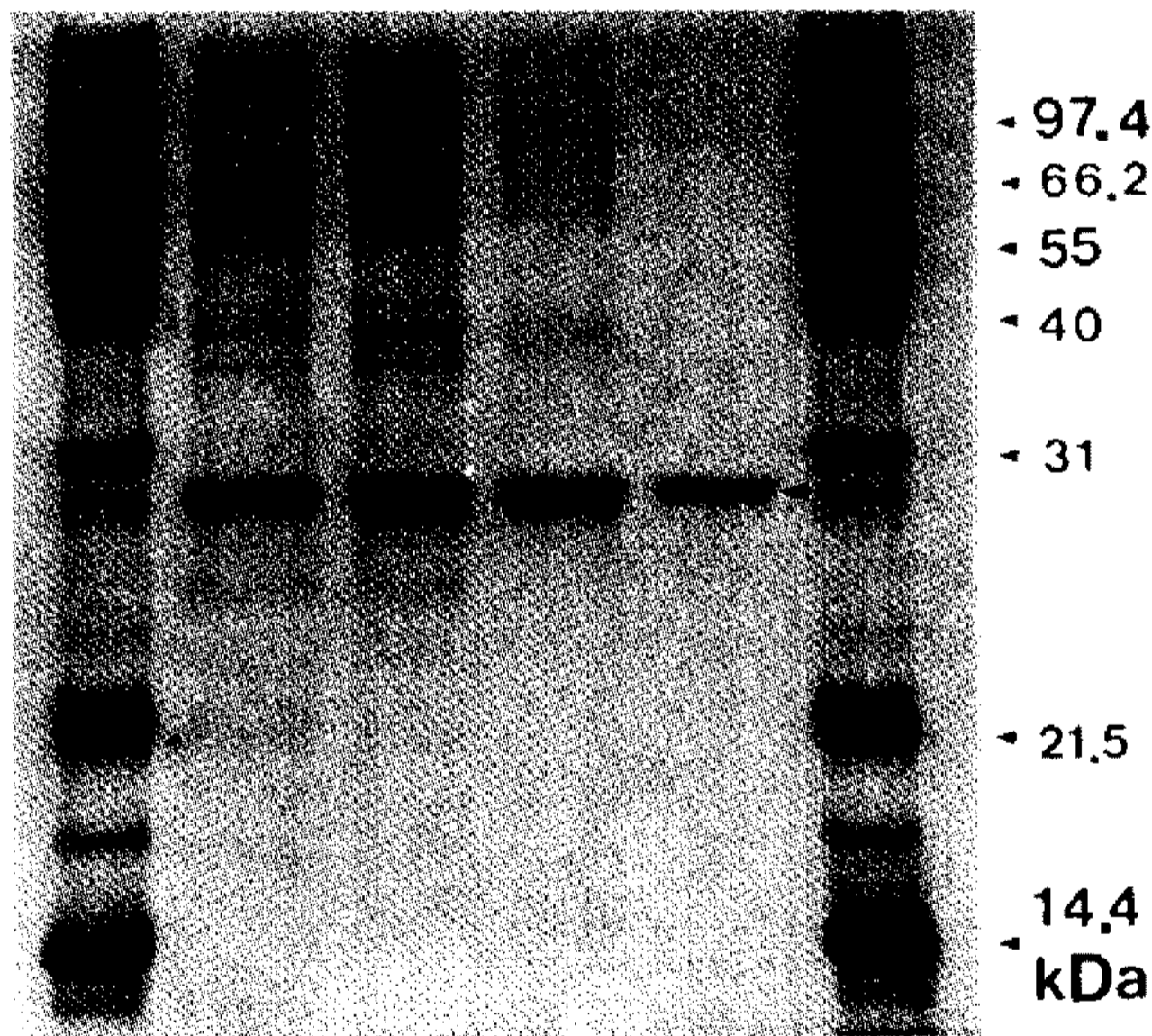


Fig. 3. 12% SDS-PAGE monitoring of the major steps of the esterase purification. Lane 1. Protein size markers Lane 2. Crude extract Lane 3. Ammonium sulfate precipitate Lane 4. Ion exchange column effluent Lane 5. Sephacryl S-200 gel filtrate Arrow indicates the esterase.

에도 약 70% 정도의 잔여 활성을 유지하는 열에 대해 비교적 높은 안정성을 보였다. 지금까지 보고되고 있는 대부분의 xylan 분해계 esterase는 본효소와 마찬가지로 약산성 또는 중성 pH, 그리고 40~50°C 에서 최고 활성 및 안정성을 보이고 있다.

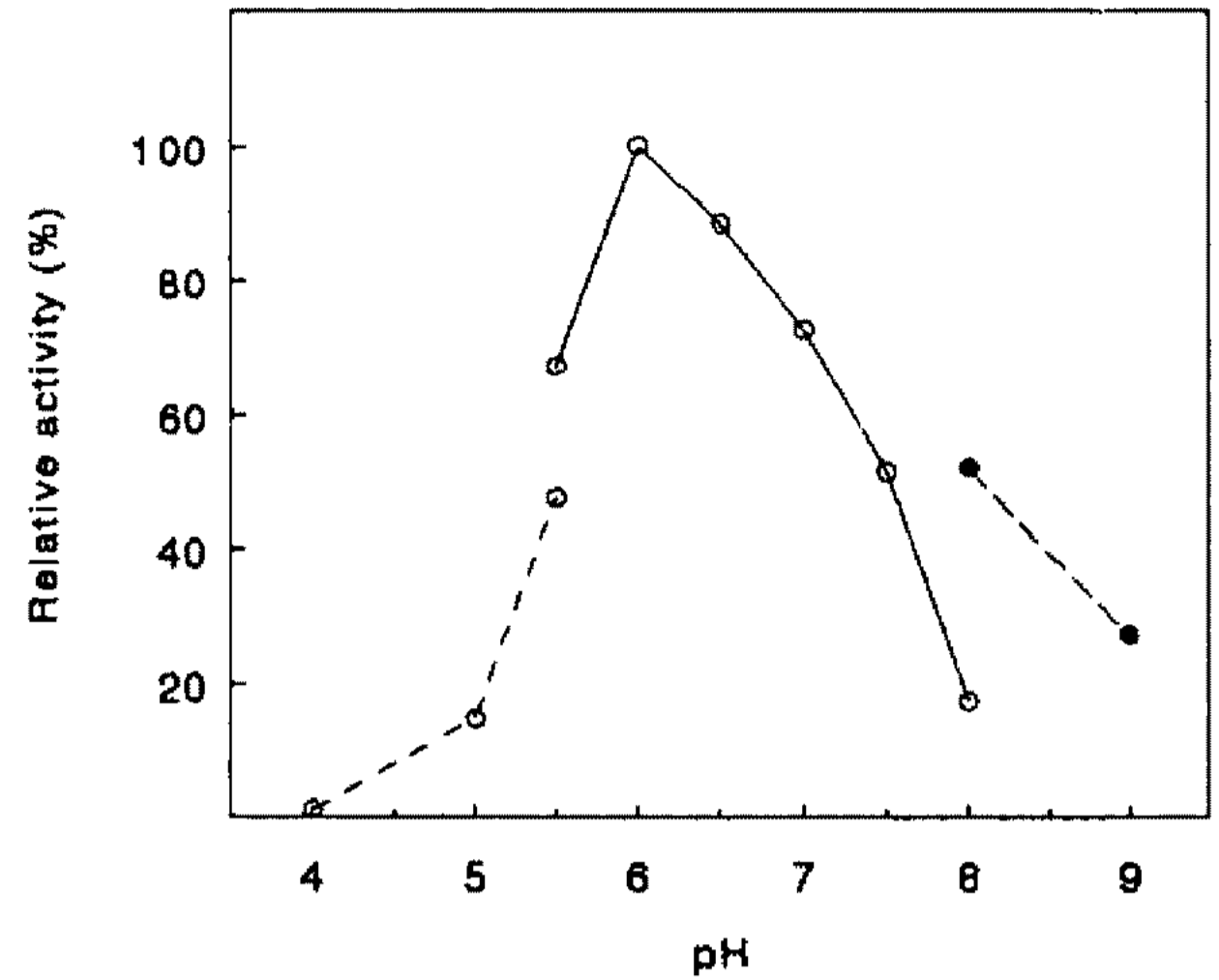


Fig. 4. Effect of pH on the esterase activity. Buffers(0.05 M) used were as follows; citrate-phosphate buffer at pH 4, 5, and 5.5; phosphate buffer at pH 5.5, 6, 6.5, 7, and 8; Tris buffer at pH 8 and 9. Substrate used for the esterase activity measurement was p-nitrophenylacetate in each buffer. Enzyme reaction was carried out at 45°C for 20 min. Relative activity was determined relative to the enzyme activity at pH 6. -○- Citrate-phosphate buffer, -○- Phosphate buffer, -●- Tris buffer

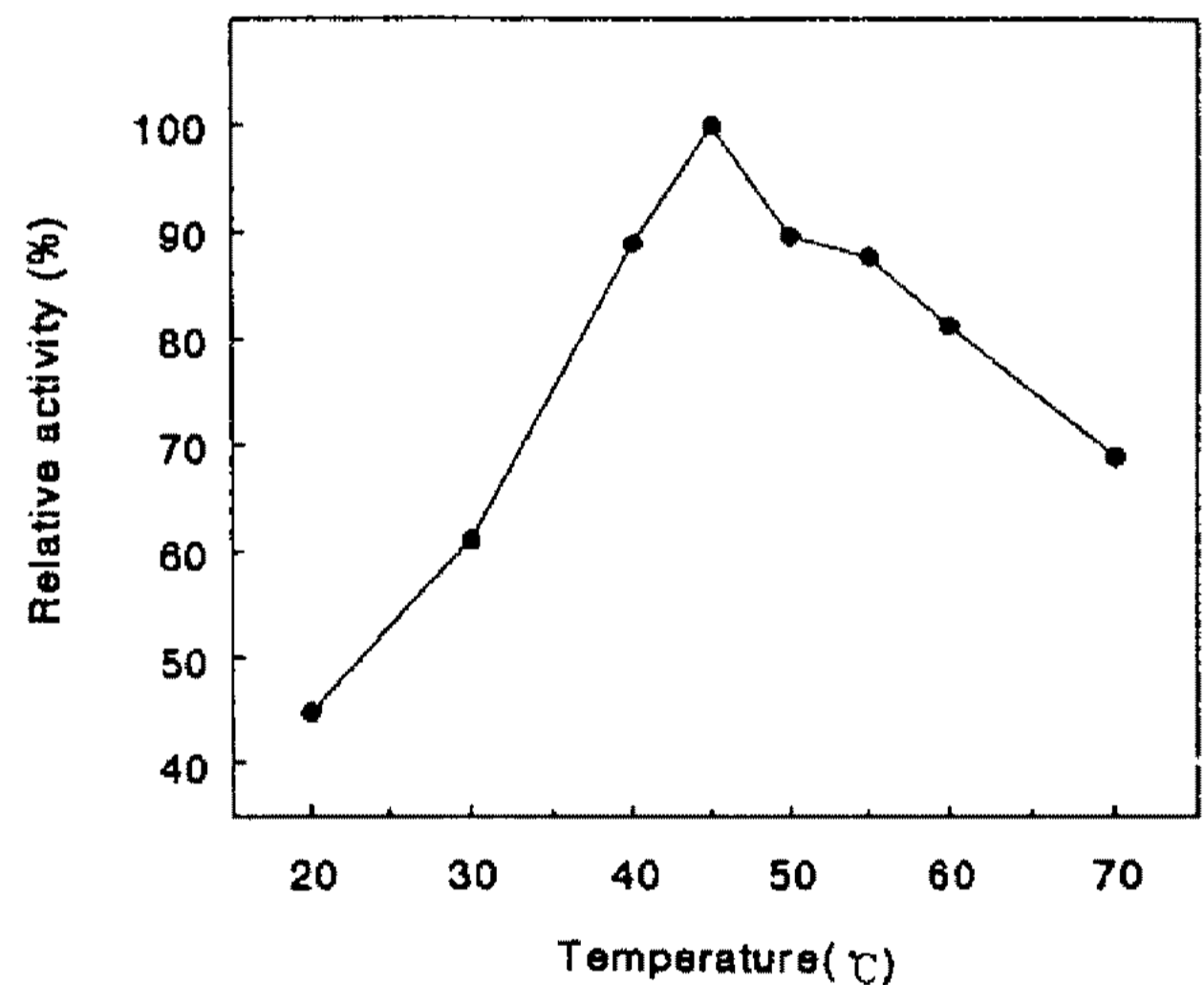


Fig. 5. Effect of temperature on the esterase activity. The enzyme reaction was carried out for 30 min at various temperatures indicated in the figure. Relative activity was determined as the percentage of the enzyme activity at 45°C.

기질 특이성

Table 3과 같이 *estII* 생산 esterase는 MAS 기질에 대해서는 월등히 높은 효소활성을 보이고 있으나 기타 합성기질에는 잘 작용하지 않는 경향을 나타내었는데 이는 *B. stearothermophilus*가 생산하는 또 다른 este-

rase인 *estI* esterase와 비슷한 결과라고 할 수 있다. 또한 acetylated xylan에도 비교적 높은 활성을 보임과 동시에 전보(5)에 보고한 바와 같이 xylanase에 의한 xylan 분해 반응에 상승효과를 나타내었다. 이상 *estII* esterase는 그 기질특이성은 물론이고, Table 4에서 보이는 바와 같이 기타 효소의 일반성질에 있어서 *estI* esterase와 매우 유사함을 발견할 수 있었다. 그렇다면 *B. stearothermophilus*는 어떠한 이유로 거의 동일한 기능을 가진 두개의 esterase를 생산하고 있

는지 매우 흥미로운 문제이나 현재로서는 만족스러운 해답을 할 수 없다.

Table 3. Substrate specificity of the *estI* esterase and the *estII* esterase

Substrate	Specific activity (U/mg)	
	<i>estII</i> esterase	<i>estI</i> esterase
MAS ¹	136.39	74.15
ρ -NPA ²	1.86	1.63
ρ -NPP ³	0.35	0.37
ρ -NPB ⁴	0.75	0.43
ρ -NPV ⁵	0.14	0.20
Glucose-pentaacetate	2.10	10.89
Xylose-tetraacetate	3.95	5.31
Triacetin	7.65	1.97

*1. methylacetylsalicylate 2. ρ -nitrophenylacetate 3. ρ -nitrophenylpropionate 4. ρ -nitrophenylbutyrate 5. ρ -nitrophenylvalerate

**Enzyme reactions were carried out as described in Materials and Methods.

Table 4. Comparison of the properties of the *estI* and the *estII* esterases

Properties	<i>estI</i>	<i>estII</i>
MW (kd)	60	120
pH optimum	6.5	6.0
pH stability	ND*	6~8
Temperature optimum	45°C	45°C
Temperature stability	35~45°C	40~60°C
pI	ND*	3.4
K _m (mM)	2.87	4.59
V _{max} (μ mole/min)	11.55	188.68

*Not detected

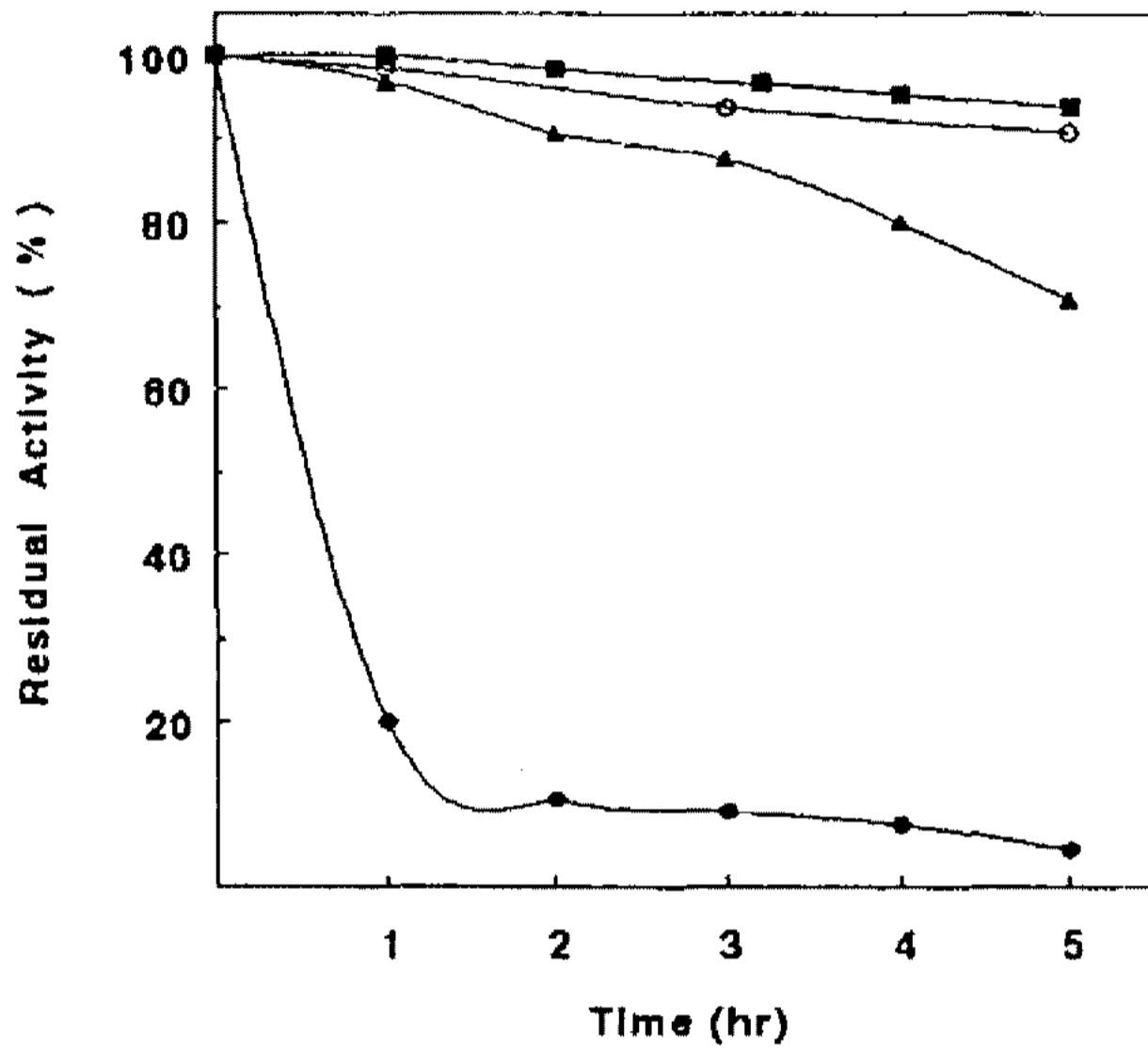


Fig. 6. Effect of temperature on the esterase stability. Substrate used for the esterase activity measurement was MAS. Enzyme activity was measured at 45°C for 30 min after allowing the enzyme solution stand at various temperatures in 1 hr interval for 5 hrs. Residual activity was determined as the percentage of the untreated control.

-■- 40°C, -○- 50°C, -▲- 60°C, -●- 70°C

Table 5. Effects of chemical modifiers on the esterase activity

Chemical	Target amino acid	Inhibitor concentration (mM)	Residual activity (%)
Diethyl pyrocarbonate	His	10	100
N-acetylimidazole	Tyr	10	100
Phenylmethyl sulfonyl fluoride	Ser	5	10
Phenylglyoxal	Arg	5	100
N-bromosuccinimide	Trp, Cys, Tyr	1	25
Chloramine T	Met	5	0
2-Hydroxy 5-nitrobenzyl bromide	Trp	5	100
ρ -Hydroxymercurybenzoate	Cys	0.5	20
Woodward's Reagent K	Asp, Glu	10	100
EDC*	Asp, Glu, Tyr, Cys	10	70

Enzyme solution was preincubated at room temperature for 30min in presence of each modifier before measuring the enzyme activity.

*1-[3-(di-ethylamino)-3-ethylcarbodi-imide]

화학적 수식 (Chemical modification)

효소 활성화에 관여하는 아미노산 잔기를 알아보기 위하여 정제효소를 Table 5에 표시되어 있는 각각의 chemical modifier로 반응시킨 후 잔여 활성을 조사하였다. 그 결과 methionine, serine 그리고 cysteine이 수식되었을 때 효소 활성이 크게 감소한 것을 보아 이 세 아미노산 잔기가 효소 활성화에 직접 또는 간접적으로 중요한 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있었다. 특히 serine은 현재까지 보고되고 있는 대다수 esterase의 촉매부위에 위치하고 있는 것으로 알려지고 있다(17). 그러므로 본 효소 역시 serine이 촉매활성에 중요한 아미노산 잔기임을 추정할 수 있으나 정확한 촉매 부위의 구조는 앞으로 더 많은 연구가 있어야 밝혀질 것 같다.

Isoelectric point

Isoelectric focusing을 실시하여 본 정제효소의 pI값을 측정해 본 결과 본 효소의 pI 값은 약 3.4 정도로 측정되었으며 이 값은 약산성 또는 중성의 pI 값을 보이는 xylan 분해 효소 esterase의 일반적 경향과 일치된다(18).

분자량

SDS-polyacrylamide gel 전기 영동법을 이용 측정 한 분자량은 약 28 kDa이었으며(Fig. 3) Sephacryl S-200을 이용한 분자량 측정에서는 120 kDa으로 측정되었다. 따라서 본 esterase는 4개의 subunit로 구성된 단백질인 것으로 생각되며 작은 분자량의 대다수 다른 xylan 분해 효소 esterase와는 다른 특징을 보였다.

N-말단 아미노산 서열 결정

본 esterase의 N-말단 아미노산 서열은 Ala-Leu-Phe-Glu-Ser-Arg-Phe-Phe-Ser-Glu-Val-Leu-Gly-Leu인 것으로 분석되었다. 본 실험 결과는 앞으로의 estII 유전자의 open reading frame 결정 내지는 post-translational modification의 분석 등에 유용하게 이용될 수 있으리라고 생각한다.

요 약

Bacillus stearothermophilus estII 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드인 pKMG7을 가지고 있는 *E. coli* HB101 균주로 부터 acetylxylan esterase를 다량 생산, 정제하여 그 특성을 조사하였다. 효소 생산 최적 배지는 0.5% galactose, 1% yeast extract 그리고 1% NaCl이었으며 37°C에서 19시간 배양했을 때 가장

높은 효소생산량을 보였다. 생산 esterase는 ammonium sulfate 분획, DEAE- Sepharose CL-6B ion exchange chromatography 및 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography 과정을 거쳐 단일 단백질로 정제하였다. 정제 효소는 pH 6, 45°C에서 가장 높은 활성을 보였고 열에 비교적 안정하였다. 또한 본 효소는 구성 아미노산 잔기 중 methionine, serine, cysteine이 촉매 활성화에 필수적인 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 분자량은 gel 여과법으로 약 120 kDa, SDS-polyacrylamide gel 전기 영동법에 의해서는 약 28 kDa으로 측정됨으로써 본 효소분자는 4개의 동일 subunit로 구성된 단백질인 것으로 생각되며 N-말단 아미노산 서열은 Ala-Leu-Phe-Glu-Ser-Arg-Phe-Phe-Ser-Glu-Val-Leu-Gly-Leu로 결정되었다.

감사의 말

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

참고문헌

1. Song, H.S., and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
2. 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. Biotech.* **20**: 271-279.
3. 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. Biotech.* **20**: 136-142.
4. 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.
5. 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.
6. Eom, S.J., H.S. Kim, S.G. Cho and Y.J. Cho. 1994. Molecular cloning and Expression of the α -L-arabinofuranosidase gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 608-613.
7. Kim, I.S., C.W. Lee and Y.J. Choi. 1994. Purifica-

- tion and Characterization the acetyl xylan esterase from *Escherichia coli* Cells harboring the recombinant plasmid pKMG6. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 507-514.
8. 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.
 9. Johnson, K.G., J.D. Fontana, and C.R. MacKenzie. 1988. Measurement of acetyl xylan esterase in *Streptomyces*. *Meth. Enzymol.* **160**: 551-560.
 10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 11. Neu HC, Heppel LA. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplast. *J. Biol. Chem.* **240**: 3685-3692.
 12. Cornelis, P., C. Digneffe, and K. Willemot. 1982. Cloning and Expression of a *Bacillus coagulans* Amylase Gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 507-511.
 13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly do the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**: 680-685.
 14. See, Y.P. and G. Jackowski. 1989. ppl-22 in *Protein structure: A practical approach*. T.E. Creighton, ed. IRL Press, Oxford, England.
 15. Whitaker, J.R. 1963. Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.* **35**: 1950-1953.
 16. Daniel M. Bollag and Stuart J. Edelstein. 1991. *Protein Method*. Wiley-Liss, Inc., New York.
 17. Yuji Shimada, T. Nagao, A. Sugihara and Yoshio T. 1993. Cloning and sequence analysis of an esterase gene from *Pseudomonas* sp KWI-56. *Biochem. et Biophys. Acta.* **1174**: 79-82.
 18. Lyudmil Pavlov Christov and Bernard Alexander Prior. 1993. Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 460-475.

(Received 9 March 1995)