

Saccharomyces cerevisiae에서 Trichoderma Endoglucanase의 발현과 분비

신동하 · 김재범 · 김병우 · 남수완* · 신지원¹ · 정대균¹ · 정춘수²

동의대학교 미생물학과, ¹경희대학교 유전공학과 및 유전공학연구소,
²울산대학교 미생물학과

Expression and Secretion of *Trichoderma* Endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. Shin, Dong-Ha, Jae-Bum Kim, Byung-Woo Kim, Soo-Wan Nam*, Ji-Won Shin¹, Dae-Kyun Chung¹, and Choon-Soo Jeong². Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea, ¹Institute and Department of Genetic Engineering, Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea, ²Department of Microbiology, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea - The endoglucanase gene, *egl6*, of *Trichoderma* sp. was connected with the yeast *ADH1* promoter, and the resultant plasmid, pVT-C4, was introduced into three *S. cerevisiae* host strains (YNN27, 2805, and SEY2102). Among each 80 transformants, the cell growth and expression level of endoglucanase were compared in test-tube cultivation, and three respective transformants for each host cells showing the highest expression level and cell growth were selected. When three recombinant yeast cells were batchwise cultivated for 48 hr in flask, the total activities of endoglucanase expressed were about 1140 unit/l with 2805/pVT-C4, 1020 unit/l with SEY2102/pVT-C4, and 590 unit/l with YNN27/pVT-C4. Irrespective of host strain, about 80% of the expressed endoglucanase was detected in the extracellular medium. In addition, it was also found that the recombinant enzyme was secreted into the culture medium as two major forms of lightly and heavily glycosylated proteins.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, expression, *Trichoderma* endoglucanase, *ADH1* promoter, glycosylation

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 식물성 원료물질인 전분이나 섬유소를 활용하는 다양한 생물공정분야에 이용되고 있다. 그러나 효모는 전분분해효소를 소량으로 분비생산하며 섬유소 기질을 전혀 분해할 수 없는 단점이 있다. 유전자 재조합 기술을 이용하여 섬유소 분해 효모를 새로이 육종하게 되면 양조, 제빵, 알콜생산, 생균제 개발 등에 많은 활용성이 기대된다. 섬유소 분해 효모 (cellulolytic yeasts)의 육종에는 효모에서의 외래 유전자의 발현과 분비에 대한 분자생물학적 지식이 요구되며 그 외에도 열안정성이 높거나 활성이 우수한 섬유소 분해 효소 (cellulase) 유전자의 확보가 요구된다.

곰팡이 *Trichoderma reesei*는 가장 연구가 많이 된 섬유소 분해 미생물이며 다양한 cellulase를 생산하는 것으로 알려져 있다. 이들 효소는 기질 특이성과 반응기작에 큰 차이를 보이지만 모두 β -1,4-glycoside 결합을 분해하며, 당단백질형으로 균체의 배지로 분비되는 특징이 있다[16]. 결정성 섬유소의 효과적인 분해에는 세가지 cellulases (endoglucanase, cellobiohydrolase 또는 exoglucanase, β -glucosidase)가 동시에 필요하며, 이들의 상승작용으로 섬유소 분해능이 크게 증가한다[7, 32, 36]. 현재까지 clon-

ing되어 염기서열이 밝혀진 *Trichoderma* cellulases는 두 종류의 cellobiohydrolase 유전자로 *cbh1*[26, 30]과 *cbh2*[3, 31], endoglucanase 유전자로 *egl1*[18, 33], *egl2*[21], *egl3*[35], *egl4*[23] 및 *egl5*[22], β -glucosidase 유전자로 *bg11*[1] 등이 보고되었다. 최근 본 연구진은 벗짚으로부터 분리한 *Trichoderma* sp. C-4 균주가 내산성 및 내열성이 우수한 endoglucanase를 생산함을 보고하였고[28] 그 유전자를 cloning하였다(그 유전자를 *egl6*라 명명한다).

본 연구에서는 새로이 분리된 *egl6*를 *S. cerevisiae*로부터 발현·생산하기 위해 alcohol dehydrogenase-1(*ADH1*) promoter를 이용하는 구성적 발현계를 구축하고, 이를 유전적 배경이 다른 세종류의 *S. cerevisiae* 숙주세포들에 도입시켜 얻어진 형질전환체들의 발현능을 비교·검토하였다. 즉, 형질전환 효모의 배양을 통해 균체증식, endoglucanase의 발현량, plasmid 안정성 및 분비효율 등에 미치는 숙주세포의 영향을 정밀 분석하여 재조합 효모 생균제 개발의 기초자료로 활용하고자 하였다. 또한, 효모에서 분비생산된 재조합 endoglucanase와 야생형 endoglucanase의 당쇄부가 양상을 비교하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 재조합 plasmid 제작

*Corresponding author
Tel. 82-51-890-1537, Fax. 82-51-891-7740
E-mail: swnam@hyomin.dongueui.ac.kr

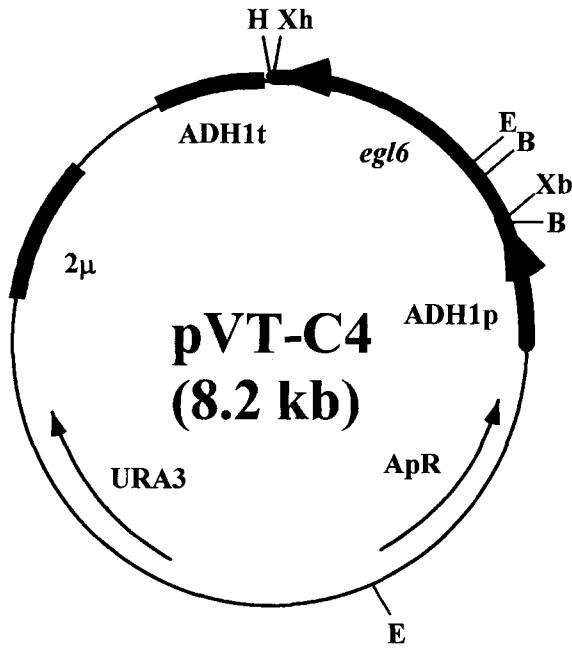


Fig. 1. Schematic diagram of pVT-C4 plasmid.
 Restriction enzymes: B, *Bam* HI; E, *Eco* RI; H, *Hind* III; Xb, *Xba* I; Xh, *Xho* I.

본 연구에 사용한 효모 숙주세포는 *Saccharomyces cerevisiae* YNN27(*MATα trp1-289 ura3-52 gal2*), 2805(*MATα pep4::HIS3 prb1-1.6R can1 GAL2 his3-200 ura3-52*), 그리고 SEY2102(*MATα ura3-52 leu2-3, 112 his4-419 suc2-Δ9*)이며, 이들은 uracil 영양 요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid이다[4]. Plasmid 구축을 위해 *E. coli* JM109를 사용하였다.

pBluescript-KS에 cloning된 *Trichoderma* sp. C-4 endoglucanase 유전자(*egl6*)를 *Xho*I과 *Xba*I으로 절단한 뒤 *E. coli*-*S. cerevisiae* shuttle vector인 pVT103-U[34]에 subcloning하였다. 구축된 재조합 plasmid pVT-C4(Fig. 1) 내의 *egl6*는 *ADH1* promoter와 *ADH1* terminator에 의해 전사가 조절된다.

형질전환, 형질전환체 선별 및 배양 조건

Plasmid pVT-C4의 효모 숙주세포(YNN27, 2805, 및 SEY2102)로의 형질전환은 LiCl 법[8]을 사용하였다. 효모 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 0.5% Casamino acid)를 사용하였고, 숙주세포 및 재조합 효모의 배양을 위해서는 YPD 배지(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)를 사용하였다.

시험관(2.5×19 cm) 배양(10 mL YPD 배지)을 통해 형질전환체들 사이의 균체증식 및 *egl6* 발현량을 비교하였다. 효모 숙주세포의 영향은 플라스크 회분배양을 통

해 분석하였다. SD 배지상의 colony를 10 ml SD 배지에서 24시간 전배양한 후 플라스크(500 mL baffled-flask, 50 mL YPD 배지 함유, 30℃, 180 rpm)에 접종(5%, v/v)하였다. 모든 배양의 초기 pH는 5.5로 하였다.

균체 농도, 포도당 및 plasmid 안정성 측정

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD₆₀₀)로 측정하였다. 배양액을 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[14]을 사용하여 잔존 포도당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100~200개의 colonies를 SD 선별배지로 tooth-picking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

균체분획 및 endoglucanase 활성 측정

균체 침전물을 Zymolyase 100T(Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads (0.4~0.5 mm)를 사용하여 periplasmic space 분획과 전세포분획을 얻었으며[15], 이들 분획과 상등액을 사용하여 각 분획에서의 효소활성을 측정하였다. Endoglucanase 활성은 1% carboxymethyl cellulose(CMC, Wako社)를 기질로 사용하여 측정하였으며 pH 5.0(0.2 M Na·acetate buffer), 50℃에서 1분당 1 μmole의 환원당(glucose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 비활성도(specific activity)는 각 효소활성을 균체농도(OD₆₀₀)로 나누어서 계산하였다. 활성 측정시 환원당의 정량은 DNS법[14]을 사용하였다. 각 효소들의 분비효율(secretion efficiency)은 전체 효소활성(세포외 활성+세포내 활성)에 대한 세포외 효소 활성비를 백분율로 나타내었다.

SDS-PAGE 및 nondenaturing-PAGE와 활성 염색

Laemmli 법[10]에 따라 0.1% SDS 존재하에서 polyacrylamide gel(10%) 전기영동을 수행하였으며, 전기영동 후 gel은 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였다. Nondenaturing-PAGE(8% gel)는 running buffer와 loading buffer에서 SDS를 뺀 것과 시료를 열처리하지 않은 것 외에는 SDS-PAGE와 동일한 방법으로 수행하였다. Nondenaturing-PAGE 후 gel은 50 mM 초산완충용액(pH 5.0)에 10분 동안 담그어 pH를 보정하고 잠시 표면을 건조시킨 뒤 1% CMC와 1.5% agar(50 mM, 초산완충용액, pH 5.0)를 섞어 녹인 slab gel을 중층하여 37℃에서 15분 동안 반응시켰다. 반응 후 agar gel은 Congo red 염색으로 endoglucanase 활성을 갖는 단백질 band를 확인하였다[28].

단백질 전기영동에 사용한 야생형 endoglucanase는 *Trichoderma* sp. C-4 배양액을 15-70% 황산암모늄 침전, Sephacryl S-200 gel filtration chromatography, DEAE- Sepharose ion exchange chromatography 등의 순서로 분리정제한 것을 사용하였으며, 재조합형 endoglucanase는 형질전환 효모균주의 배양 상등액을 한외 여과와 투석을 통해 농축한 효소액을 사용하였다.

결과 및 고찰

egl6 발현 재조합 plasmid의 구축 및 효모 형질전환체의 선별

재조합 효모의 균체증식과 동시에 외래 유전자가 발현 (growth-associated expression)되는 구성적 발현계를 구축하기 위해 효모의 구성적 promoters 중 plasmid 안정성을 고려하여 *ADH1* promoter를 선정하였다[4]. *Trichoderma* sp. C-4 유래 endoglucanase 유전자(*egl6*)의 ORF(1.254 kb)를 함유한 약 1.4 kb 단편을 pVT103-U vector에 subcloning하여 재조합 plasmid인 pVT-C4(8.2 kb)를 제작하였다(Fig. 1). Plasmid pVT-C4를 uracil 영양요구성 변이주(*ura3*)인 효모숙주세포 3종(*S. cerevisiae* YNN27, 2805, SEY2102)에 각각 형질전환시켰다.

Uracil 결핍 SD 배지로 효모 형질전환체를 1차 선별한 다음, 100~200개의 colony를 1% CMC 함유 평판배지에 옮겨 Congo-red 염색을 통하여 비교적 큰 투명환을 보이는 colony 80개씩의 총 240개(숙주세포 3종×80개=240개) 형질전환체를 2차 선별하였다(data not shown).

최적 형질전환체의 선별

사용하는 숙주세포에 따라 또한 하나의 숙주세포에서 얻어진 형질전환체들 사이에서도 외래 유전자의 발현은 크게 달라짐이 보고되고 있어[2, 25, 27], 상기 3종의 숙주세포로부터 얻은 형질전환체들 사이에도 이러한 발현량 차이가 있는지를 먼저 조사하였다. Congo-red 염색으로 2차 선별된 각각의 형질전환체를 10 ml 시험관 배양을 통해 배양 48시간 때의 균체농도 및 endoglucanase 활성을 측정하였다. 숙주세포 각각에 대한 80개의 형질전환체 중에서 대표적으로 10개에 대한 최종 균체농도와 세포의 endoglucanase 활성을 Fig. 2A(YNN27/pVT-C4), Fig. 2B(2805/pVT-C4), Fig. 2C(SEY2102/pVT-C4)에 각각 나타내었다. 균체 증식을 비교해 볼 때 SEY2102(17~25 OD₆₀₀)와 2805(20~29 OD₆₀₀) 균주에 비해 YNN27 균주가 낮은 균체농도(9~19 OD₆₀₀)을 보였다. 균체농도가 높을수록 endoglucanase 활성도 대체로 높아 2805 균주가 130~590 unit/l, SEY2102 균주가 263~424 unit/l, YNN27 균주가 97~233 unit/l를 보였

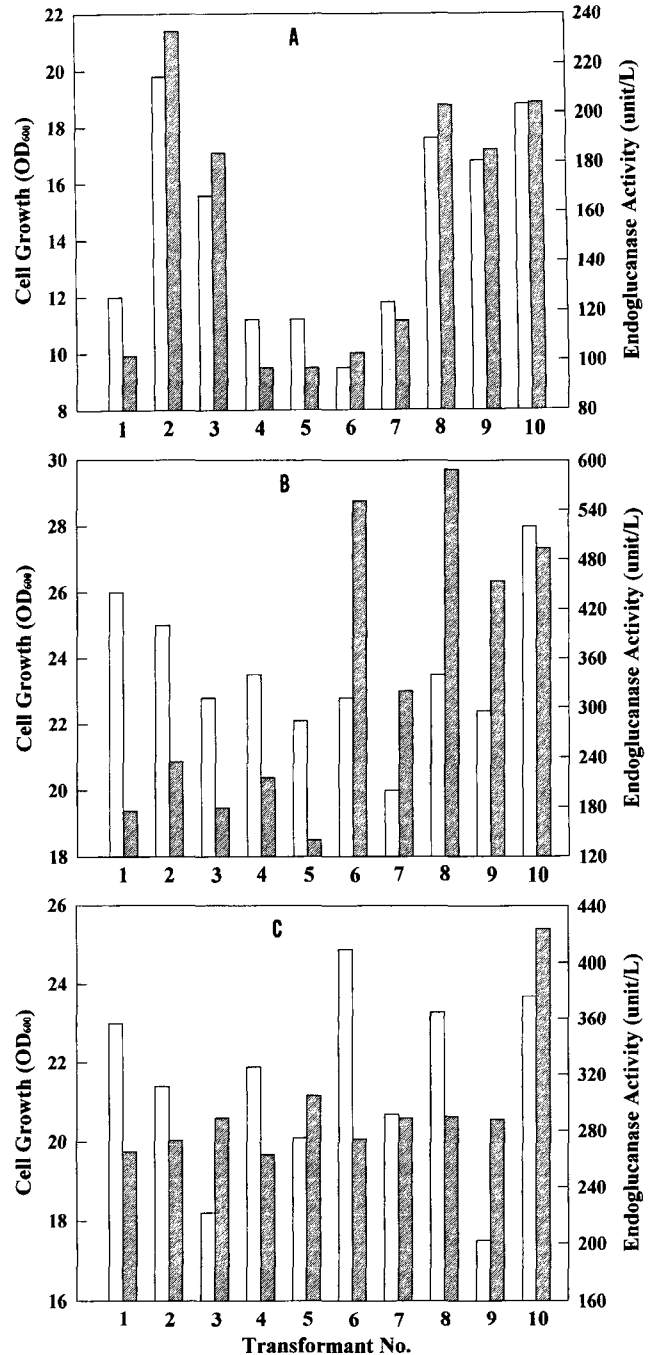


Fig. 2. Cell growth and endoglucanase expression between *S. cerevisiae* YNN27/pVT-C4 (A), 2805/pVT-C4 (B), and SEY2102/pVT-C4 (C) transformants.

Open bar (□), cell growth; hatched bar (▨), endoglucanase activity.

다. YNN27/pVT-C4 균주의 경우 균체농도가 높을 수록 endoglucanase 활성도 높은 반면에, 2805/pVT-C4와 SEY2102/pVT-C4 균주의 경우는 각 형질전환체 사이에서도 endoglucanase 활성은 균체농도에 크게 좌우되지 않음을 알 수 있었다.

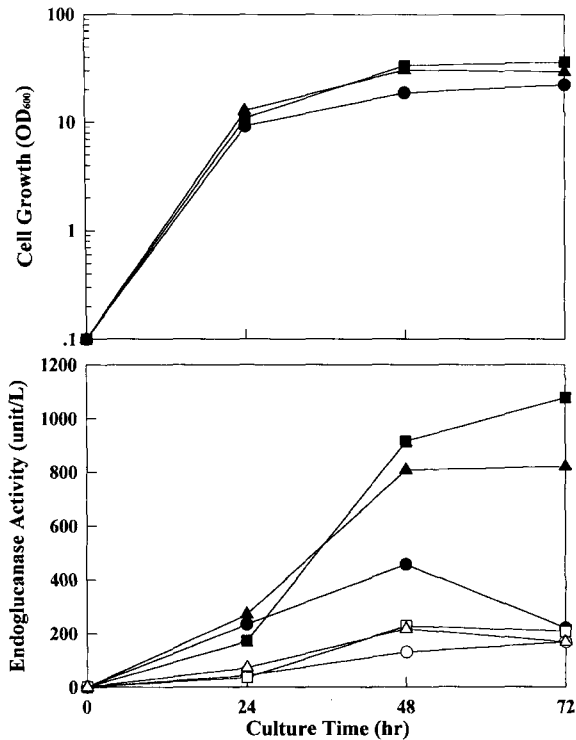


Fig. 3. Comparison of cell growth and endoglucanase activity between *S. cerevisiae* transformants.
 Symbols are: (●, ○), YNN27/pVT-C4; (■, □), 2805/pVT-C4; (▲, △), SEY2102/pVT-C4. In bottom figure: (closed symbols), extracellular endoglucanase activity; (open symbols), intracellular endoglucanase activity.

이상의 시험관 배양을 통해 비교적 높은 균체농도와 endoglucanase 발현을 나타내는 형질전환체, 즉 YNN 27/pVT-C4 #2(233 unit/l, 19.8 OD₆₀₀), 2805/pVT-C4 #8(589 unit/l, 23.5 OD₆₀₀) 및 SEY2102/pVT-C4 #10(424 unit/l, 23.7 OD₆₀₀)의 세 균주를 최적 형질전환체로 선별하여 이후의 실험에 사용하였다.

발현된 endoglucanase의 분비국재성과 plasmid 안정성

선별된 3종의 형질전환체를 플라스크 회분배양을 통해 균체증식에 따른 endoglucanase 분비 국재성을 조사하였다(Fig. 3). 대수증식기 구간인 24시간까지 균체증식

은 큰 차이를 보이지 않으나, 배양 24시간 이후의 정지기 부터 형질전환체에 따라 균체증식은 약간의 차이를 보이며 최종 균체농도는 2805/pVT-C4 균주가 가장 높았다. *egl6*의 발현은 배양 24시간까지 균체증식에 따라 약간의 차이를 보이다가 24시간 이 후 급격한 발현양상을 보였다. YNN27/pVT-C4 균주는 예외적으로 급격한 발현의 증가를 보이지 않았으며 2805/pVT-C4 균주가 가장 빠른 발현속도를 보였다. 세포의 발현량이 높을수록 세포 내 잔존하는 endoglucanase 활성도 높았다. 배양 48시간 이후의 endoglucanase 활성감소는, 균체증식이 느리지만 계속되고 있고 세포내 endoglucanase 활성도 크게 감소 하지 않기 때문에, proteases에 의한 분해로 판단된다. Protease에 의한 분해가 2805/pVT-C4 균주에서 보이지 않는 것은 2805 숙주세포의 proteases 결손(*pep4::HIS3 prb1*) 때문인 것으로 사료된다. 대수증식기에 낮은 발현량(약 200 unit/l)과 정지기 초기구간인 24~48시간 사이에서의 급격한 발현(200 unit/l에서 800 unit/l까지 증가)은 세포농도의 차이에 의한 것으로 생각되며, 포도당이 고갈(12시간 이내)되고 에탄올 소모 기간(12~48시간)에서도 높은 발현속도를 보이는 것은, 다른 구성적 promoter인 PGK promoter에 의한 mouse α -amylase 발현[17]과 *CYC1* promoter에 의한 *E. coli* β -galactosidase의 발현[6]에서도 관찰된 바 있다. 즉, 소모할 탄소원이 에탄올이라도 증식저해농도 이하로 존재하여 균체증식이 어느 정도 유지되면 구성적 promoter의 전사능은 계속 효율적으로 발휘되는 것으로 추정된다.

정지기에서의 endoglucanase 분해를 고려하여 배양 48시간 때의 배양결과와 endoglucanase 분비 국재성을 Table 1에 요약하였다. YNN27 균주가 가장 낮은 균체농도(OD₆₀₀=19)를, 2805 균주가 가장 높은 균체농도(OD₆₀₀=33)를 보였으며, 총 발현된 endoglucanase 활성은 균체농도에 의존적인 양상으로 나타나 YNN27의 경우 586 unit/l, SEY2102의 경우 1023 unit/l, 2805의 경우 1142 unit/l 순서로 증가하였다. 비활성(균체농도당 endoglucanase 활성)은 세 균주 모두 31~34 unit/l/OD₆₀₀ 값을 보여 단위 균체당 발현능 차이는 크게 나타나지 않았다. Plasmid 안정성은 배양 72시간에서 세 균주 모두 80% 이상의 높은 값을 보였다.

Table 1. Cell growth, plasmid stability, and localization of endoglucanase activity in three yeast transformants grown on YPD medium for 48 hr

| Host strain | Cell growth (OD ₆₀₀) | Plasmid stability* (%) | Endoglucanase activity (unit/l) | | | | Secretion efficiency (%) |
|-------------|----------------------------------|------------------------|---------------------------------|-----------|-----------|-------|--------------------------|
| | | | Medium | Periplasm | Cytoplasm | Total | |
| YNN27 | 18.7 | 83 | 456 | 74 | 56 | 586 | 78 |
| 2805 | 33.4 | 80 | 914 | 130 | 98 | 1142 | 80 |
| SEY2102 | 30.5 | 86 | 807 | 132 | 84 | 1023 | 79 |

*Plasmid stability at 72 hr cultivation.

발현된 endoglucanase의 분비 국제성은 세포밖 배지에 약 80%, 세포내 잔존 활성중 periplasmic space 잔존 활성이 11~13%, 세포질 분획에서의 활성이 8~10% 정도로 세 균주에서 모두 비슷한 분포를 보였다. 즉, 본 연구에서 사용한 세가지 숙주세포는 *Trichoderma* sp. C-4 endoglucanase 분비능에 큰 차이를 보이지 않으며, endoglucanase의 signal peptide는 *S. cerevisiae*에서 단백질 분비 기능을 효과적으로 발휘함을 알 수 있었다. *Trichoderma* 유래의 cellulases 외에도 α -L-arabinofuranosidase, β -xylosidase, β -xylanase, endochitinase, β -mannanase 등의 유전자도 cloning되어 *S. cerevisiae*에서 발현되었는데 이들 균체의 효소는 효모에서도 효율적으로 분비되었다[11, 13, 19, 20, 29].

이상의 결과로부터 *Trichoderma* endoglucanase의 발현·분비수율을 향상시키기 위한 유가식 배양(공급 탄소원이 포도당)에는 빠른 균체증식속도와 높은 증식수율을 보이는 *S. cerevisiae* 2805/pVT-C4 균주가 가장 적합할 것으로 판단된다.

발현된 endoglucanase의 전기영동 분석

3종의 효모 형질전환체에서 세포밖으로 분비된 단백질을 전기영동으로 분석했을 때, 정제된 야생형 endoglucanase(SDS-PAGE에서의 분자량은 약 63 kDa)와 동일한 위치에 뚜렷한 band의 확인은 곤란하였다(Fig. 4A). 그러나, nondenaturing-PAGE에서는 endoglucanase 활성 band가 두개로 나타났으며 당단백질의 전형적인 disperse band를 보였다(Fig. 4B). 세가지 숙주세포에 따른 재조합 endoglucanase 활성 band들의 이동상의 차이는 거의 나타나지 않았지만 야생형과 비교해서는 큰 차이를

보이고 있다. *Trichoderma* sp. C-4 *egl6*의 결정된 염기서열로부터 ORF는 1254 bp이며 예상 아미노산 417개(분자량은 약 46 kDa)를 고려하면, 야생형에 부가되었던 당쇄(당쇄함량 약 40%)가 재조합형에도 상당한 비율로 발생했고, *Trichoderma* 균주와는 다른 훨씬 더 복잡하고 불균일하게 당쇄가 부가되었음을 알 수 있다. 이와 같은 당쇄부가 차이는 *egl1*, *egl4*, *cbh1*, *cbh2* 등을 효모에서 발현시켰을 때도 관찰되며[19, 20, 23, 33], 특히 *Trichoderma* CBHI(*cbh1* 산물)과 EGI(*egl1* 산물)의 경우 N-linked 당쇄부가 위치 중에 N-acetylglucosamine unit가 하나인 곳도 보고되었고(효모에서는 두 개), 핵심당쇄(core glycosylated moiety)의 구조가 효모와 다름도 밝혀졌다[9, 12, 24]. 즉, 당쇄합성과 절단에 관련된 효소로써, 효모의 endoglycosidase F 또는 H와 α -1,2-mannosidase와는 특이성이 틀린 효소들이 *Trichoderma* 균주에 존재하며[9], 이와 같은 당쇄절단기작(glycosylation trimming mechanism) 관련 효소들의 작용에 의해 당쇄에 차이가 발생하는 것으로 추정된다. 효모에서 발현된 재조합 endoglucanase에 발생한 정확한 당쇄부가 형태(N-linked 또는 O-linked)와 당쇄량 및 효소학적 제 특성(K_m , V_{max} , 열안정성, protease 저항성 등)에 대한 연구는 계속 진행되고 있어 추후 보고할 예정이다.

요 약

Trichoderma sp. C-4 유래의 endoglucanase 유전자(*egl6*)를 ADH1 promoter 하류에 연결하여 구성적 발현 plasmid인 pVT-C4를 제작하였다. 이를 3종의 *S. cerevisiae* 숙주세포(YNN27, 2805, SEY2102)에 형질전환시켜 각 숙주세포당 80개의 형질전환체를 시험배양하여, 균체증식과 endoglucanase 발현량이 뛰어난 형질전환 효모 균주를 선별하였다. 3종의 재조합 효모를 YPD 배지에서 희분배양했을 때, YNN27 균주가 가장 낮은 균체농도($OD_{600}=19$)를, 2805 균주가 가장 높은 균체농도($OD_{600}=33$)를 보였으며, 총 발현된 endoglucanase 활성은 균체농도에 의존적인 양상으로 나타나 YNN27의 경우 586 unit/l, SEY2102의 경우 1023 unit/l, 2805의 경우 1142 unit/l 순서로 증가하였다. 비활성(균체농도당 endoglucanase활성)은 세 균주 모두 31~34 unit/l/ OD_{600} 값을 보여 단위 균체당 발현능 차이는 거의 없었다. Plasmid 안정성은 배양 72시간에서 세 균주 모두 80% 이상의 높은 값을 보였다. 발현된 endoglucanase의 분비 국제성은 세포밖 배지에 약 80%, periplasmic space 잔존 활성이 11~13%, 세포질 분획에서의 활성이 8~10% 정도로 세 균주에서 모두 비슷한 분포를 보였다. 즉, *egl6*의 분비신호는 *S. cerevisiae*에서도 매우 효율적으로 분비 기능을 발휘하였다. 재조합 endoglucanase는 nondena-

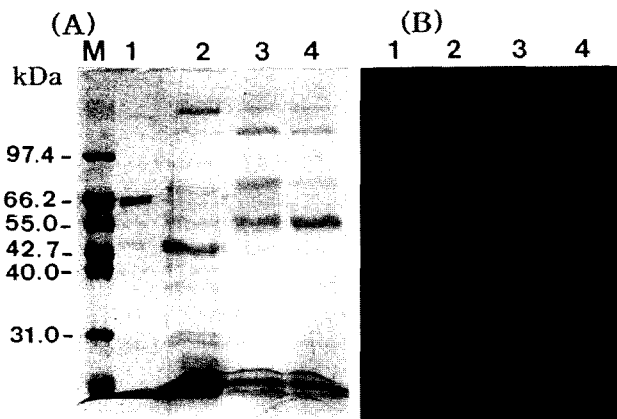


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and nondenaturing-PAGE (B) analyses of wild-type and recombinant endoglucanases.

SDS- and nondenaturing-polyacrylamide gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 and Congo-red, respectively. Lane M, protein molecular weight marker (Mid-Range, Promega); lane 1, purified wild-type endoglucanase; lane 2, YNN27/pVT-C4; lane 3, 2805/pVT-C4; lane 4, SEY2102/pVT-C4.

turing-PAGE 상에서 전형적인 당단백질의 disperse band를 두개 보였다. 세가지 숙주세포에 따른 재조합 endoglucanase 활성 band들의 이동상의 차이는 거의 나타나지 않고, 당쇄부가 양상은 야생형보다 훨씬 더 복잡하고 불균일하게 발생했음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 1997년 교육부 학술연구조성비(유전공학)와 일부 1996년 농림수산기술관리센타의 농림수산기술개발 연구비에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Barnett, C. C., R. M. Berka, and T. Fowler. 1991. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: Evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technol.* **9**: 562–567.
- Broker, M., O. Bauml, A. Gottig, J. Ochs, M. Bodenbenner, and E. Amann. 1991. Expression of the human blood coagulation protein factor XIIIa in *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence of the expression levels from host-vector systems and medium conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 756–764.
- Chen, C. M., M. Gritzali, and D. W. Stafford. 1987. Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technol.* **5**: 274–278.
- Chung, D. K., D. H. Shin, B. W. Kim, J. K. Nam, I. S. Han, and S. W. Nam. 1997. Expression and secretion of *Clostridium thermocellum* endoglucanase A gene (*celA*) in different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Lett.* **19**: 503–508.
- Draborg, H., S. Christgau, T. Halkier, G. Rasmussen, H. Dalboge, and S. Kauppinen. 1996. Secretion of an enzymatically active *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**: 404–409.
- Hardjito, L., P. F. Greenfield, and P. L. Lee. 1993. Recombinant protein production via fed-batch culture of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **15**: 120–126.
- Henrissat, B., H. Driguez, C. Viet, and M. Schulein. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technol.* **3**: 722–726.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163–168.
- Klarskov, K., K. Piens, J. Stahlberg, P. B. Hoj, J. Van Beeumen, and M. Claeysens. 1997. Cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*: Identification of an active-site nucleophile and additional information on sequence including the glycosylation pattern of the core protein. *Carbohydr. Res.* **304**: 143–154.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- La Grange, D. C., I. S. Pretorius, and W. H. van Zyl. 1996. Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase (*XYN2*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1036–1044.
- Maras, M., A. De Bruyn, J. Schraml, P. Herdewijn, M. Claeysens, W. Fiers, and R. Contreras. 1997. Structural characterization of N-linked oligosaccharides from cellobiohydrolase I secreted by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* RUTC 30. *Eur. J. Biochem.* **245**: 617–625.
- Margolles-Clark, E., M. Tenkanen, T. Nakari-Setälä, and M. Penttilä. 1996. Cloning of genes encoding α -L-arabinofuranosidase and β -xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3840–3846.
- Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethyl-cellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**: 127–132.
- Nam, S. W., K. Yoda, and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 1049–1054.
- Nevalainen, H. and M. Penttilä. 1995. Molecular biology of cellulolytic fungi, pp. 303-319. In U. Kuck(ed.), *The Mycota II. Genetics and Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Park, Y. S., S. Shiba, S. Iijima, T. Kobayashi, and F. Hishinuma. 1993. Comparison of three different promoter systems for secretory α -amylase production in fed-batch cultures of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 854–861.
- Penttilä, M., P. Lehtovaara, H. Nevalainen, R. Bhikhabhai, and J. K. C. Knowles. 1986. Homology between cellulases genes of *Trichoderma reesei*: Complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* **45**: 253–263.
- Penttilä, M., L. Andre, M. Saloheimo, P. Lehtovaara, and J. K. C. Knowles. 1987. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**: 175-185.
- Penttilä, M., L. Andre, P. Lehtovaara, M. Bailey, T. T. Teeri, and J. K. C. Knowles. 1988. Efficient secretion of two fungal cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **63**: 103–112.
- Saloheimo, M., P. Lehtovaara, M. Penttilä, T. T. Teeri, J. Stalberg, G. Johansson, G. Pettersson, M. Claeysens, P. Tomme, and J. K. C. Knowles. 1988. EGIII, a new endoglucanase from *Trichoderma reesei*: The characterization of both gene and enzyme. *Gene* **63**: 11–21.
- Saloheimo, A., B. Henrissat, A. -M. Hoffren, O. Teleman,

- and M. Penttila. 1994. A novel, small endoglucanase gene, *egl5*, from *Trichoderma reesei* isolated by expression in yeast. *Mol. Microbiol.* **13**: 219–228.
23. Saloheimo, M., T. Nakari-Setälä, M. Tenkanen, and M. Penttila. 1997. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. *Eur. J. Biochem.* **249**: 584–591.
24. Salovuori, I., M. Makarow, H. Rauvala, J. K. C. Knowles, and L. Kaariainen. 1987. Low molecular mass high-mannose type glycans in a secreted protein of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technol.* **5**: 152–156.
25. Schultz, L., H. Z. Markus, K. J. Hofmann, D. L. Montgomery, C. T. Dunwiddie, P. J. Kniskern, R. B. Freedman, R. W. Ellis, and M. F. Tuite. 1994. Using molecular genetics to improve the production of recombinant proteins by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. NY Acad. Sci.* **721**: 148–157.
26. Shoemaker, S., V. Schweickart, M. Ladner, D. Gelfand, S. Kwok, K. Myambo, and M. Innis. 1983. Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technol.* **1**: 691–695.
27. Shuster, J. R. 1991. Gene expression in yeast: Protein secretion. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2**: 685–690.
28. Son, Y. J., O. J. Sul, D. K. Chung, I. S. Han, Y. J. Choi, and C. S. Jeong. 1997. Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C-4 producing cellulases. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 346–353.
29. Stalbrand, H., A. Saloheimo, J. Vehmaanpera, B. Henriksat, and M. Penttila. 1995. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* β -mannanase gene containing a cellulose binding domain. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1090–1097.
30. Teeri, T. T., I. Salovuori, and J. K. C. Knowles. 1983. The molecular cloning of the major cellulase gene from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technol.* **1**: 696–699.
31. Teeri, T. T., P. Lehtovaara, S. Kauppinen, I. Salovuori, and J. K. C. Knowles. 1983. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulytic enzymes: Gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene* **51**: 43–52.
32. Tomme, P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* **37**: 1–81.
33. Van Arsdell, J. N., S. Kwok, V. L. Schweickart, M. B. Ladner, D. H. Gelfand, and M. A. Innis. 1987. Cloning, characterization, and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of endoglucanase I from *Trichoderma reesei*. *Bio/Technol.* **5**: 60–64.
34. Vernet, T., D. Dignard, and D. Y. Thomas. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage ϕ 1 intergenic region. *Gene* **52**: 225–233.
35. Ward, M., S. Wu, J. Dauberman, G. Weiss, E. Larenas, B. Bower, M. Rey, K. Clarkson, and R. Bott. 1993. Cloning, sequence and preliminary structural analysis of a small, high pI endoglucanase (EGIII) from *Trichoderma reesei*, pp. 153–158. In P. Suominen and T. Reinikainen (eds.), *Proceedings of the Second TRICEL Symposium Trichoderma reesei cellulases and other hydrolases Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research*. Helsinki.
36. Woodward, J., M. K. Hayes, and N. E. Lee. 1988. Hydrolysis of cellulose by saturating and non-saturating concentrations of cellulase: Implications for synergism. *Bio/Technol.* **6**: 301–304.

(Received May 26, 1998)