

## *Saccharomyces cerevisiae*에서 *Thermomonospora fusca* Exoglucanase의 발현 및 Cellulose 분해에의 응용

박현순<sup>1</sup> · 김현철<sup>2</sup> · 신동하<sup>3</sup> · 김종균<sup>1</sup> · 남수완\*

동의대학교 생명공학과, <sup>1</sup>부경대학교 생물공학과, <sup>2</sup>동의대학교 바이오물질제어학과, <sup>3</sup>(주)인섹트바이오텍

**Expression of *Thermomonospora fusca* Exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Application to Cellulose Hydrolysis.** Park, Hyun-Soon<sup>1</sup>, Hyun-Chul Kim<sup>2</sup>, Dong-Ha Shin<sup>3</sup>, Joong-Kyun Kim<sup>1</sup>, and Soo-Wan Nam\*. Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, <sup>1</sup>Department of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, <sup>2</sup>Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, <sup>3</sup>Insect Biotech Co. Ltd, Daejeon 305-811, Korea - To develop effective and powerful probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* strains producing cellulolytic enzymes were genetically bred. For the production of exoglucanase, the plasmid pVT-TExo (8.8 kb) was constructed, in which *Thermomonospora fusca* exoglucanase gene (*E3*) was under the control of *ADHI* promoter, and introduced into *S. cerevisiae* SEY2102. When the transformant, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo, was cultivated on YPD medium, the total expression level of avicelase reached about 190 unit/l. The secretion efficiency and plasmid stability were about 50% and 91%, respectively. Recombination exoglucanase enzyme bound to avicel better than *Clostridium* endoglucanase (*CelA*) and *Trichoderma* endoglucanase (*C4*) enzymes. The mixing ratio of *E3* and *CelA* displaying the best synergistic hydrolysis for avicel was observed at 4:1. The mixture of endoglucanase (*CelA*) and exoglucanase (*E3*) resulted in 3.2-fold increase of avicelase activity and 2.5-fold enhanced production of sugar production from avicel, compared to the single enzyme treatment.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, exoglucanase, endoglucanase synergistic hydrolysis, cellulose

효모 *Saccharomyces cerevisiae*는 식물성 원료물질인 전분이나 섬유소를 활용하는 다양한 생물공정분야에 이용되고 있다. 그러나, 효모는 전분 분해효소를 소량으로 분비생산하며 섬유소 기질을 전혀 분해할 수 없는 단점이 있다. 유전자 재조합 기술을 이용하여 섬유소 분해 효모를 새로이 육종하게 되면 양조, 제빵, 알콜 생산, 생균제 개발 등에 많은 활용성이 기대된다. 섬유소 분해 효모(cellulolytic yeasts)의 육종에는 효모에서의 외래 유전자의 발현과 분비에 대한 분자생물학적 지식이 요구되며 그 외에도 열 안정성이 높거나 활성이 우수한 섬유소 분해 효소(cellulase) 유전자의 확보가 요구된다. 또한, 효모 *S. cerevisiae*는 인체에 비병원성이며 미국 FDA에서 허가한 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물이며 고등동물세포와 유사한 번역후 수식계(post-translational modification system)가 있어 folding, disulfide 결합 등 단백질의 구조와 기능이 천연 상태로 생산된다.

Cellulase는 중요한 산업적 효소로, 산업적 공정에서 적용되는 것을 찾아볼 수 있다[2, 4]. 최근 20년간 *Trichoderma reesei*와 다른 *Trichoderma* 속에서 분리된 cellobiohydrolase I

과 II 및 endoglucanase I이 연구되었고[10], 현재까지 가장 강력한 cellulase 분해 균주는 *Trichoderma reesei*에서 분리한 cellobiohydrolase I과 II 및 endoglucanase I 등으로, 효모에서 효율적으로 발현, 분비된다고 보고되었다[16, 17].

섬유소 분해에는 섬유소에 작용하여 이것을 절단하여 직쇄분자를 생성하는 C1 효소, 즉 exoglucanase(cellobiohydrolase)와 직쇄분자나 modified cellulose에 작용하는 Cx, 즉 endoglucanase, 그리고 cellobiose에 작용하여 glucose를 생성하는  $\beta$ -glucosidase가 필요하다. 이들 섬유소 분해효소들 사이에는 상승작용(synergism)이 보고되어 있다[1, 19, 21, 25]. 상승작용은 endoglucanase와 exoglucanase 및  $\beta$ -glucosidase들이 단독으로 결정형 섬유소를 분해하지 못하지만 이들을 혼합하였을 경우 효소들의 공동작용으로 결정형 섬유소를 분해하는 것을 의미한다. 천연 섬유소는 먼저 exoglucanase 효소의 작용에 의하여 어느정도 저분자화 되고 동시에 수화성을 갖게 된다. 다음에 이들은 endoglucanase 효소에 의하여 급속히 저분자화 되어 cellobiose까지 분해된다. 따라서 천연 cellulose를 분해하기 위해서는 상기한 3종의 효소가 고루 함유되어야 한다. 이러한 상승작용은 *T. reesei*, *T. koningii* 등 많은 균주에서 확인되었다[12, 23, 25]. 섬유소 분해에서의 상승작용은 같은 균주 유래의 효소 뿐 아니라 다른 균주 유래 효소들 사이에서도 보고되어 있다. 다

\*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2276, Fax: 82-51-890-1619

E-mail: swnam@deu.ac.kr

른 균주에서 분비되는 endoglucanase와 exoglucanase사이의 상승작용은 그 종류에 따라 큰 차이를 보인다. 예를 들어, *T. koningii*에서 분리한 exoglucanase는 자신의 endoglucanase보다 *Fusarium solani*에서 분리되는 endoglucanase와 반응시켰을 때와 *Clostridium thermocellum*에서 분리되는 cellulase와 반응시켰을 때, 더 높은 상승효과를 보이는 한편 *Ruminococcus albus*의 endoglucanase와는 전혀 상승작용을 보이지 않았다[25]. *Thermomonospora fusca*의 exoglucanase는 55°C, 16시간 동안에서도 모든 활성이 남아 있을 만큼 뛰어난 열안정성을 가지며, pH 6-10의 범위에서 최대 활성의 90%를 유지한다. 또한 cellulose binding을 하며 섬유소 분해 효소 사이의 상승작용을 가지고 있다[20, 26].

본 실험에서 내산성 및 내열성이 우수한 *T. fusca* 유래의 exoglucanase 유전자(*E3*)를 구성적 promoter인 *ADH1* promoter 하류에 subcloning하여 효모 *S. cerevisiae*로부터 생산하고, 효모에서 생산된 재조합 endoglucanases(*C. thermocellum* 및 *Trichoderma* sp. C-4)와의 상승효과를 조사하여 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 재조합 Plasmids

본 연구에 사용한 효모 숙주세포는 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102(*MAT $\alpha$*  *ura3-52 leu2-3, 112 his4-419 suc2- $\Delta$ 9*), 2805(*MAT $\alpha$*  *pep4::HIS3 prb1-1.6R can1 GAL2 his3-200 ura3-52*)를 사용하였다. 이들은 uracil 영양 요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid이다. Plasmid 구축을 위해 *E. coli* JM109를 사용하였다. *E. coli*-*S. cerevisiae* shuttle vector로 사용한 pVT103-U[22]는 *ADH1*(alcohol dehydrogenase I) promoter를 함유하고 있으며 선택표지로 *URA3*(orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자를, 효모 복제원으로 2- $\mu$ m replication origin을 함유하고 있다. Exoglucanase의 cellulose 가수분해, avicel binding과 synergism 효과를 알아보기 위해서 *ADH1* 구성적 promoter 하류에 *Clostridium thermocellum*의 endoglucanase A 유전자(*celA*)가 subcloning된 pVT-CT1 plasmid[14] (8.3 kb)를 사용하였다. 또 다른 endoglucanase 원으로, *Trichoderma* sp. C-4 유래 endoglucanase 유전자(*egl6*)의 ORF(1.254 kb)를 함유한 약 1.4 kb 단편을 pVT103-U vector에 subcloning한 pVT-C4 plasmid [17] (8.2 kb)를 사용하였다.

### 형질전환, 형질전환체 선별 및 배양 조건

*E. coli*의 형질전환은 CaCl<sub>2</sub> 방법을, 효모의 형질전환체는 LiCl 법[7]으로 수행하였다. 효모 형질전환체의 선별 배지로는 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, 0.5% Casamino acids)를 사용하였고, 숙주세포 및 재조합 효모의 플라스크와 발효조 배양을

위해서는 YPD 배지(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose)를 사용하였다. 또한 효모 형질전환체로부터 exoglucanase의 발현 유무를 조사하기 위해서는 1 mM 4-methylumbelliferyl cellobiose(MUC)를 함유한 SD 평판배지를 사용하였다.

시험관(2.5 × 19 cm) 배양(10 ml YPD 배지)을 통해서 형질전환체들 사이의 균체증식 및 exoglucanase의 발현량을 비교하였다. 플라스크 배양은 500 ml baffled-flask(working volume: 50 ml)로 30°C, 170~200 rpm에서 48~72시간 배양하였다.

### 균체 농도, 잔존환원당 및 Plasmid 안정성

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD<sub>600</sub>)로 측정하였다. 배양액을 5,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid(DNS)[13] 방법을 사용하여 잔존 포도당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100~200개의 colonies를 SD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

### 균체분획 및 활성 측정과 분비효율

균체 침전물을 Zymolyase 100T(Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads(0.4~0.5 mm)를 사용하여 주변 세포질 분획과 전세포 분획을 얻었으며[15], 이들 분획과 배양 상등액을 사용하여 각 분획에서의 효소활성을 측정하였다. Endoglucanase 활성은 carboxy methylcellulose(CMC; Wako, Japan)를 기질로 사용하여 측정하였으며 pH 5.0(0.1 M Na·acetate buffer), 50°C에서 1분간 1  $\mu$ mol의 환원당(glucose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. Exoglucanase 활성 측정은 CMC(Sigma, low viscosity)와 avicel(Flucka, PH101, USA), avicel을 수화시킨 swelon cellulose,  $\alpha$ -cellulose(Sigma), 그리고 filter paper(Whatman #1)를 기질로 하여 측정하였다. 활성 측정 시 환원당의 정량은 DNS 방법을 사용하였다. 각 효소들의 분비효율(secretion efficiency)은 전체 효소활성(세포외 활성 + 세포내 활성)에 대한 세포외 효소 활성비를 백분율로 나타내었다. 비활성도(specific activity)는 각 효소활성을 단백질 농도 또는 균체 농도(OD<sub>600</sub>)로 나누어서 계산하였다.

### Colony 활성 염색

효모 형질전환체로부터 endoglucanase의 발현 유무를 Congo-red 염색법[17]으로 확인하였다. 즉, 1% CMC(Sigma, high viscosity) 함유 SD 평판배지에서 48시간 자란 효모 형질전환체 colony들을 증류수로 세척한 후 Congo-red(2 mg/ml)로 15분간 반응시켰다. 1 M NaCl로 세척 후 colony 주

위의 염색되지 않는 흰 부분은 효모에 의해 발현된 endoglucanase에 의해 CMC가  $\beta(1-4)$  glucan으로 가수분해되었음을 나타낸다. Exoglucanase의 발현 유무는 SD 평판 배지에서 48시간 자란 효모 형질전환체를 증류수로 세척한 후, 평판배지에 1 mM MUC 용액으로 증첩한 후 50°C에서 1~3시간 반응시키고 UV 조사해서 발광으로 조사하였다[24].

#### Avicel Binding 측정

0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/ml의 avicel에 조효소액을 넣고 50°C에서 1시간 반응시킨 다음, 원심 분리하였다. 상등액으로부터 avicel의 분해에 의한 당의 생성과 효소 활성을 측정 후 반응전의 효소활성과의 차이에 의해서 avicel에 binding한 효소활성의 비(%)를 조사하였다.

### 결과 및 고찰

#### 재조합 Plasmid의 구축 및 최적 형질전환체의 선별

pVT103-U의 구성적 promoter인 *ADHI* promoter 하류에 *T. fusca* exoglucanase 유전자(*E3*)를 subcloning하여 구성적 발현제인 plasmid pVT-TExo(8.8 kb)를 제작하였다. 재조합된 plasmid를 *S. cerevisiae* SEY2102와 2805에 각각 형질 전환시켰다. Uracil 결핍 SD 평판 배지로 효모 형질전환체를 1차 선별한 후, 선별한 형질전환체 100~200 colony를 SD 평판 배지로 옮긴 다음에 48시간 동안 배양하였다. 효모 형질전환체를 증류수로 세척 후 MUC 용액을 증첩시키고 50°C에서 1~2시간 반응후, UV 조사에 의한 발광의 강도 (Fig. 1)에 의해 효모 형질전환체 중 10개의 형질전환체를 선별하였다.

#### Exoglucanase의 발현·분비 및 Plasmid 안정성

선별된 형질전환체 가운데 시험관 배양을 통하여 높은 균체량과 exoglucanase(avicelase) 활성을 보이는 균주를 선별하여 플라스크 배양을 하였다(Fig. 2). 균체 증식은 배양 12시간에서 정지기에 들어갔으며 배양 말기의 균체 증식은 SEY2102가 25 OD<sub>600</sub>, 2805가 26 OD<sub>600</sub>였으며, 탄소원은 배양 12시간에 거의 모두 소모되는 양상을 보였다. SEY2102/pVT-TExo의 배지 분획과 세포내 분획에서의 exoglucanase 활성은 60시간 때를 제외하고는 거의 비슷한 반면, 2805/pVT-TExo는 배지 분획에서의 활성이 세포내 분획보다 높게 나타났다. 총 생산된 exoglucanase는 SEY2102와 2805 균주에서 각각 190 unit/l와 143 unit/l로, 분비효율은 50%와 36%, 그리고 비활성은 7.6 unit/l·OD<sub>600</sub>와 5.6 unit/l·OD<sub>600</sub>로 각각 나타났다. 배양 72시간째의 plasmid 안정성은 각각 91%와 80%로 측정되었으며(data not shown), 분비효율 및 비활성 그리고 plasmid 안정성을 고려해 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo를 섬유소 분해 생균제 개발의 최적 host-vector계로 선별하였다. *Trichoderma* 유래 및

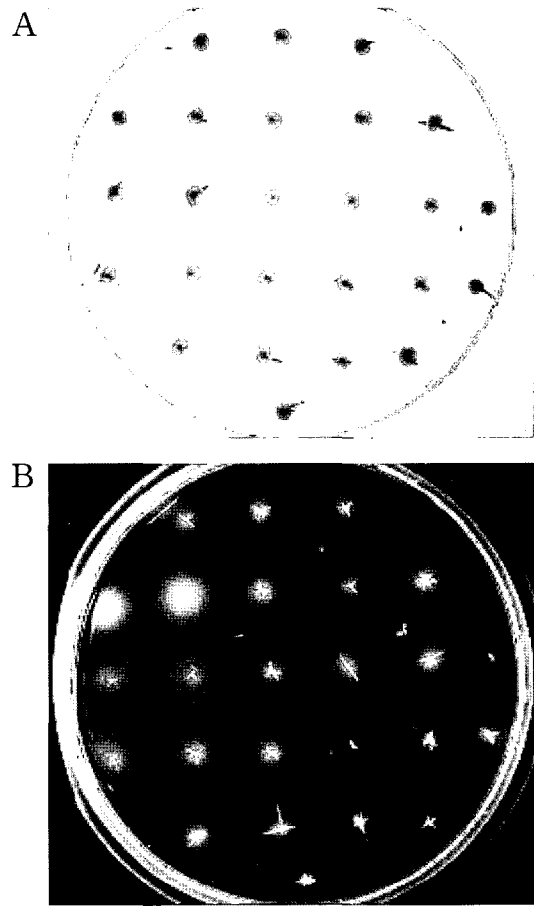
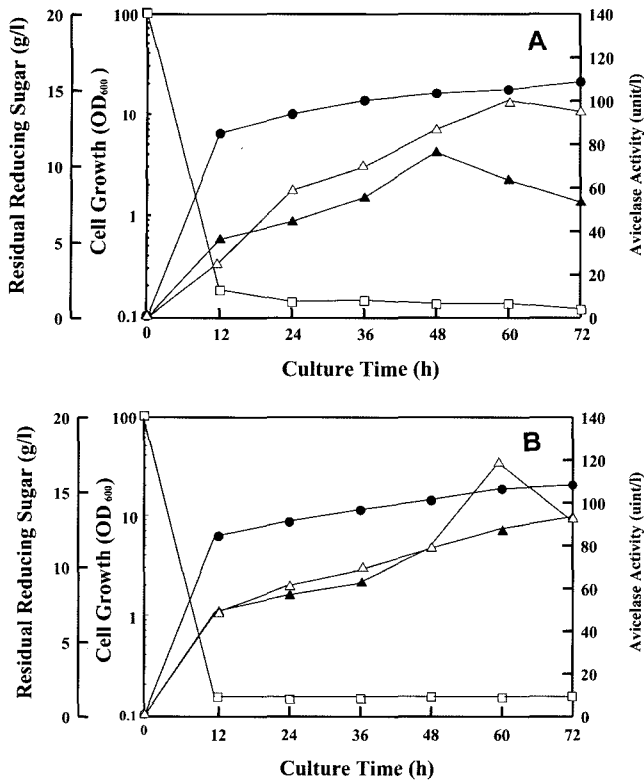


Fig. 1. Active staining of yeast transformants grown on selective SD medium. (A), Grown on SD medium; (B), UV irradiation after MUC addition.

*Clostridium* 유래 균체의 효소 유전자를 *S. cerevisiae*에서 발현·생산할 경우, 효모 분비신호를 도입하지 않고도, 그 유전자 자체 분비신호에 의해 세포밖으로 잘 분비됨은 여러 cellulases와 endochitinase 등에서 관찰된 바 있다[3, 18, 24].

#### Exoglucanase의 기질 특이성

*S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1과 SEY2102/pVT-C4에서 생산된 재조합 endoglucanases(편의상 각각 균주에서 발현된 조효소액을 CelA와 C4로 약칭)와 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo에서 생산된 exoglucanase(E3로 약칭)에 대해서 CMC 함유 평판배지와 MUC 함유 평판배지에서의 활성 염색을 행하였다(Fig. 3A, B). CMC 함유 평판배지에서는 숙주세포 SEY2102와 형질전환체 SEY2102/pVT-TExoE3는 흰 환을 형성하지 않은 반면, SEY2102/pVT-CT1과 SEY2102/pVT-C4는 흰 환을 형성하였다. 또한, 흰 환의 크기에 따른 정성적 비교를 해 보면 SEY2102/pVT-C4가 SEY2102/pVT-CT1 보다 높은 CMC 분해능을 가지고 있음을 알 수 있었다. MUC에 의한 UV 발광을 보았을 때 숙주세포를 제외한 모든 형질전환체에서 발광이 나타났다.



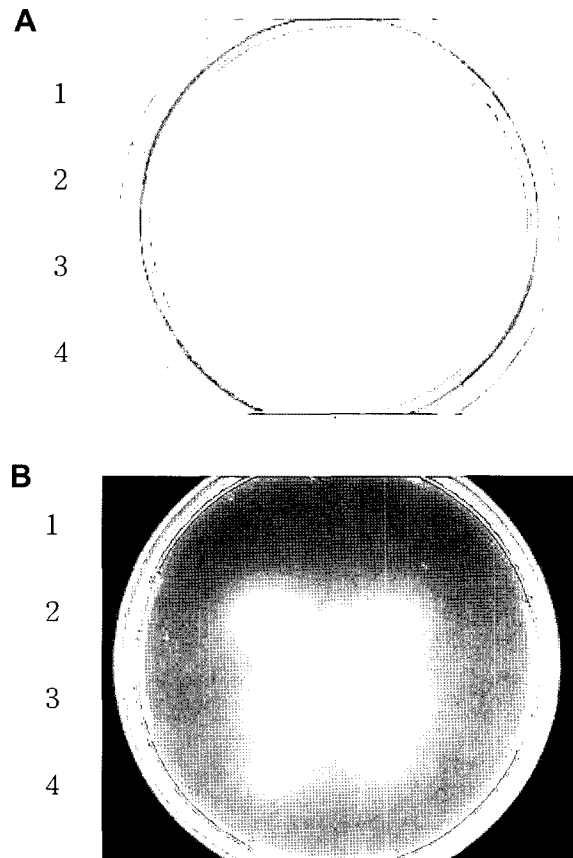
**Fig. 2.** Comparison of cell growth and exoglucanase expression between *S. cerevisiae* 2805/pVT-TExo (A) and SEY2102/pVT-TExo (B). Symbols : (●), cell concentration (OD<sub>600</sub>); (□), glucose concentration (g/l); (▲), endoglucanase activity in extracellular medium; (△), endoglucanase activity in cell lysate.

Endoglucanases(CelA와 C4)는 CMC와 MUC를 함유한 평판배지에서 기질 분해 활성을 보인 반면, exoglucanase(E3)는 MUC만을 함유한 평판배지에서 활성을 보였다. 이와 같은 결과는 exoglucanase의 일반적인 기질 특이성으로 사료된다[24].

수용성과 불수용성의 기질에 대한 분해능을 조사한 결과 (Table 1), 수용성 cellulose(celldextrin, swollen cellulose)의 경우에는 endoglucanase가 높은 분해능을 보여 주었지만, 불수용성 cellulose(native cellulose, crystalline cellulose)에 대해서는 exoglucanase의 분해능이 높았다. E3는 수용성 기질인 CMC에서 C4와 CelA에 비교해 각각 40배와 2.6배의 낮은 분해능을 보인 반면, 불수용성 기질에 대해 C4와 CelA보다 높은 분해능을 보였다.

**Exoglucanase의 Avicel Binding과 Synergism**

Avicel에 대한 binding과 avicel 분해에 의한 당 생성을 Fig. 4에 나타내었다. Avicel 분해에 의한 당 생성은 C4가 가장 높았고, 다음으로 CelA, E3 순이었다. E3 경우 C4에 비해 3.7배 낮은 당 생성을 보였다. 그러나, avicel에 대한 binding을 보았을 때 100 mg-avicel/ml에서의 E3 결합능을 100%로 보았을 때 CelA는 42%의 결합능을 보였으며 C4는



**Fig. 3.** Active staining of recombinant yeasts grown on CMC-containing medium (A) and MUC-containing medium (B). (A), Congo-red staining; (B), UV irradiation after MUC addition. 1, Host (*S. cerevisiae* SEY2102); 2, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1; 3, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-C4; 4, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo.

전혀 binding을 하지 않음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때 E3는 불수용성 기질에 높은 결합능을 가지고 있음을 알 수 있었다. E3의 경우 avicel에 대한 결합능은 높으나 결합능이 낮은 C4나 CelA에 비해 당 생성이 낮은 이유는 E3에 의한 생성물질인 cellobiose의 저해(inhibition)를 받은 것으로 추정된다. 그 예로, *C. thermocellum*의 exoglucanase인 CelA에서도 cellobiose의 저해를 보였으며[9], *T. fusca*의 cellulase와 *T. reesei* CBH I 사이에서의 상승작용에서도 cellobiose에 의한 저해가 보고되었다[11].

**Cellulose 가수분해에 대한 Endoglucanase와 Exoglucanase의 Synergism**

Cellulose 가수분해에 대한 endoglucanase와 exoglucanase의 상승효과(synergistic effect)를 조사하기 위해 endoglucanase로는 CelA를, exoglucanase는 E3를 조효소액으로 사용하였다(Fig. 5). Exoglucanase와 endoglucanase는 효소의 혼합비율에 따라, 그리고 섬유소의 결정도에 따라 효소가 가수분해 반응속도가 영향을 받는다는 보고가 있다[5, 6, 8, 12].

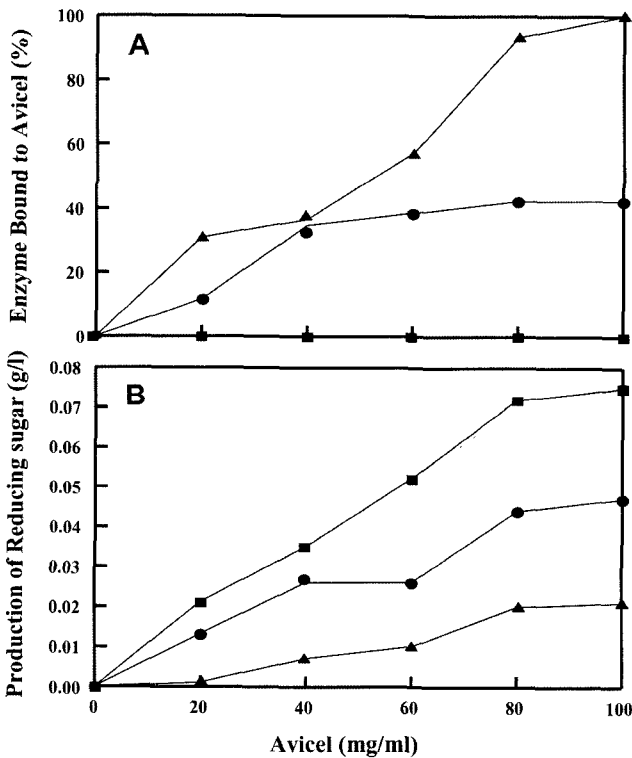
**Table 1. Cellulase activity of endoglucanases and exoglucanase against different soluble and insoluble celluloses.**

Cellulases <sup>a</sup>	Enzyme Activity (unit/l) <sup>b</sup>					
	Soluble <sup>c</sup>			Insoluble <sup>c</sup>		
	CMC (Sigma, low viscosity)	CMC (Wako)	Swollen Cellulose	Avicel	$\alpha$ -Cellulose	Filter paper
Cel A (Endoglucanase)	29	30	49	50	21	4
C4 (Endoglucanase)	446	361	136	56	14	2
E3 (Exoglucanase)	11	9	38	57	26	11

<sup>a</sup> Each cellulase was incubated with various substrates for 30 min.

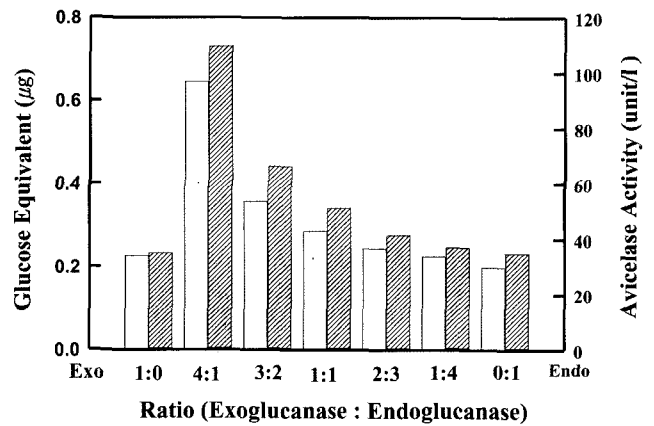
<sup>b</sup> Enzyme Activity : 1.0 unit = an amount of enzyme liberating 1  $\mu$ mole reducing sugar (glucose equivalent) from different substrate per min at 50°C, pH5.0.

<sup>c</sup> 1.0 mg of each substrate was used for the assay of enzyme activity.

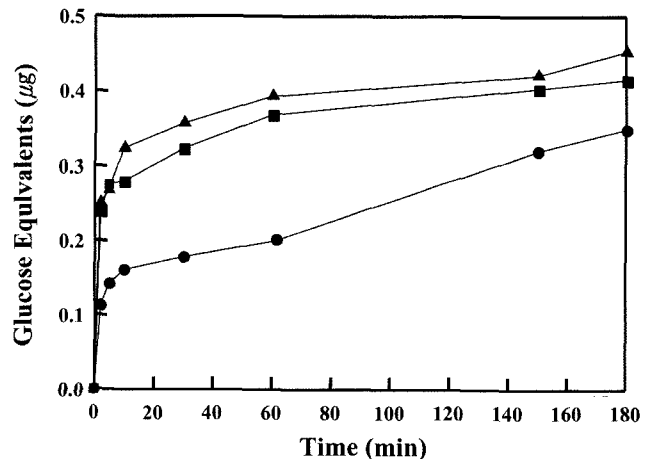


**Fig. 4. Binding to avicel (A) and production of residual reducing sugar (B) by recombinant endoglucanases and exoglucanase. Symbols : (●), CelA; (■), C4; (▲), E3.**

섬유소 가수분해를 위한 최적의 E3와 CelA 효소의 혼합비를 조사하기 위해 E3와 CelA의 일정량(avicelase 활성; 3.6 unit/l)을 섞어 각 혼합비에 대한 avicel 분해에 대한 상승효과와 당 생성을 보았다(Fig. 5). 가장 좋은 포도당 생성은 E3와 CelA의 혼합비가 4:1일 때 관찰되었으며 이때의 avicelase 활성도 가장 높았다. 각 cellulase를 단독으로 사용했을 경우와 가장 높은 상승효과를 보여준 혼합비에 대한 시간별 avicel 분해 양상을 보았다(Fig. 6). Endoglucanase(CelA) 단독으로 작용을 한 것이 가장 낮은 분해능을 나타냈으며, E3와 CelA를 혼합 시에는 초기 10분 동안의 분해능은



**Fig. 5. Synergistic degradation of insoluble CMC(avicel) by mixture of endoglucanase (CelA) and exoglucanase (E3). Symbols : (□), Glucose equivalent; (▨), Avicelase activity.**



**Fig. 6. Cooperative actions of endoglucanase, exoglucanase, and their mixture on the hydrolysis of avicel. Symbols : (●), endoglucanase; (■), exoglucanase; (▲), endoglucanase + exoglucanase.**

exoglucanase(E3)단독으로 사용한 것과 비슷한 당 생성을 보였으나 10분 이후로는 E3와 CelA에 의한 상승효과로 인해서 보다 높은 당 생성을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 exoglucanase인 E3의 insoluble cellulose에 대한 분해능과 높은 avicel 결합능, 그리고 endoglucanase와 exoglucanase에 의한 상승 작용을 이용하면 섬유소(crystalline cellulose)로 이루어진 볏짚이나 옥수수 껍질 같은 사료의 분해 효율을 크게 높일 수 있는 효모 생균제로 개발될 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

효과적이고 강력한 효모 생균제를 개발하기 위해, *Saccharomyces cerevisiae* 균주들에서 섬유소 분해효소를 유전공학적 방법으로 생산하였다. *Thermomonospora fusca* 유래의 exoglucanase 유전자(E3)를 구성적 *ADH1* promoter 하류에 subcloning하여 구성적 발현체인 plasmid pVT-TExo(8.8 kb)를 제작하였고, 이를 *S. cerevisiae* 숙주세포 SEY2102에 형질전환 시켜, YPD에서 배양한 결과, 총 생산된 exoglucanase의 avicelase 활성은 190 unit/에 도달하였고, 분비효율은 50%, plasmid 안정성은 91%로 나타났다. 재조합 exoglucanase의 양은 *Clostridium endoglucanase*(CelA)와 *Trichoderma endoglucanase*(C4) 보다 더 높은 avicel 결합능을 나타냈다. 각 혼합비에 대한 avicel 분해에 대한 상승효과와 당 생성은, E3와 CelA의 혼합비가 4:1일 때 가장 좋은 포도당 생성이 관찰되었으며, endoglucanase(CelA)와 exoglucanase(E3)의 혼합물은, 단독으로 처리했을 때보다, 포도당의 생산은 2.5배 향상되었고, avicelase 활성은 결과적으로 3.2배 증가하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부 목적기초연구(과제번호: R01-2004-000-10221-0) 지원으로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Barnett, C. C., R. M. Berka, and T. Fowler. 1991. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. *Bio/Technol.* **9**: 562-567.
- Correa, M. G. and R. P. Tengerd. 1997. Production of cellulase on sugar cane bagasse by fungal mixed culture solid substrate fermentation. *Biotechnol. Lett.* **19**: 665-667.
- 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.
- Esterbauer, H., W. Steiner, I. Labudova, A. Hermann, and M. Hayn. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot plant. *Biores. Technol.* **36**: 67-76.
- Hoshino, E., M. Shiroshi, Y. Amano, M. Nomura, and T. Kanda. 1997. Synergistic action of exo-type cellulase in the hydrolysis of cellulase with different crystallinities. *J. Ferment. Bioeng.* **84**: 300-306.
- Irwin, D. C., M. Speaiw, L. P. Walker, and D. B. Wilson. 1993. Activity studies of eight purified cellulase: specificity, synergism, and binding effect. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 1002-1013.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
- Kim, D. W., Y. H. Jang, and Y. K. Jeong. 1997. Adsorption behaviours of two cellobiohydrolase and thier core proteins from *Trichoderma reesei* on avicel PH101. *Biotechnol. Lett.* **19**: 893-897.
- Kruus, K. and A. Andreacchi. 1995. Product inhibition of the recombinant CelS, an exoglucanase component of the *Clostridium thermocellum* cellulosome. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**: 399-404.
- Mach R. L. and S. Zeilinger. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi, *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 515-522.
- 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.
- Medve, J., J. Karlsson, D. Lee, and F. Tjerneld. 1998. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzyme. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 621-634.
- 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., D. K. Chung, and B. H. Chung. 1997. Constitutive expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**: 430-437.
- Nam, S. W., K. Yoda, and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 1049-1504.
- Penttila, M., L. Ander, M. Saloheimo, P. Lehtovaara, and J. K. C. Knowles. 1987. Expression of two *Trichoderma reesei* endoglucanase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**: 175-185.
- Shin, D. H., J. B. Kim, B. W. Kim, and S. W. Nam. 1998. Expression and secretion of *Trichoderma* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 406-412.
- Skipper, N., M. Sutherland, R. W. Davies, D. Kilburn, R. C. Miller, Jr., A. Warren, and R. Womg. 1985. Secretion of a bacterial cellulase by yeast. *Science* **230**: 958-960.

19. Son, M. I. and J. O. Kim, 1998 Optimum condition of cellulose hydrolysis reaction with mixed enzymes of cellulase and  $\beta$ -glucosidase. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**: 20-25.
20. Suvajittanont, W., J. McGuire, and M. K. Bothwell. 2001. Adsorption of *Thermomonospora fusca* E(5) cellulase on silanized silica. *Biotechnol. Bioeng.* **67**: 12-18.
21. Teeri, T. T., P. Lehtovaara, S. Kauppinen, I. Salovuori, and J. K. C. Knowles. 1983. Homologous domains in *Trichoderma reesei* cellulolytic enzymes: gene sequence and expression of cellobiohydrolase II. *Gene* **51**: 43-52.
22. Vernet, T., D. Dignard, and D. Y. Thomas. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**: 225-233.
23. Wang, T., L. Xiangmei, Y. Qian, Z. Xi, Q. Yinbo, G. Peiji, and W. Tianhong. 2005. Directed evolution for engineering pH profile of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biomol. Eng.* **22**: 89-94.
24. Wong, W. K. R., C. Curry., R. S. Parekh., S. R. Parekh., M. Wayman., R. W. Davies., D. G. Kilburn, and N. Skipper. 1988. Wood hydrolysis by *Cellulomonas fimi* endoglucanase and exoglucanase coexpressed as secreted enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technol.* **6**: 713-719.
25. Wood, T. M. and S. I. McCrae. 1978. The cellulase *Trichoderma koningii*: purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when action along in synergism with the cellobiohydrolase. *J. Biochem.* **171**: 61-72.
26. Zhang, S., G. Lau, and D. B. Wilson. 1995. Characterization of *Thermomonospora fusca* exoglucanase. *Biochemistry* **34**: 3386-3395.

(Received Oct. 5, 2005/Accepted Dec. 16, 2005)