

Application of  $\beta$ -1,3-Glucanase from *Pyrococcus furiosus* for Ethanol Production using LaminarinDong-Gyun Kim<sup>1</sup>, Eun-Young Kim<sup>1</sup>, Yu-Ri Kim<sup>1</sup>, Joong Kyun Kim<sup>1</sup>, Han-Seung Lee<sup>2</sup> and In-Soo Kong<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea<sup>2</sup>Department of Bio-Food Materials, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received September 27, 2010 / Accepted November 10, 2010

$\beta$ -1,3-glucanase from *Pyrococcus furiosus* was applied for the saccharification of laminarin, which is a major oligo-saccharide component of brown algae, and the reaction mixture produced from laminarin was utilized as a substrate for alcohol fermentation using yeast. To prepare the recombinant  $\beta$ -1,3-glucanase, a  $\beta$ -1,3-glucanase gene was overexpressed in *Escherichia coli* and purified. Laminarin was degraded to an oligo- and mono-saccharide, such as glucose, after reaction with the purified recombinant  $\beta$ -1,3-glucanase, and the products after enzymatic treatment were confirmed by TLC and HPLC analysis. Decomposed laminarin after enzyme reaction was only added to the medium as a C-source for yeast alcohol production reaction. 0.3% alcohol production was detected from the cultured broth by gas chromatography after 48 hr of incubation. Further evaluation for optimal conditions of saccharification and alcohol fermentation can be suggested, as well as the possibility of using this enzymatic method to produce ethanol using laminarin.

**Key words** :  $\beta$ -1,3-glucanase, *Pyrococcus furiosus*, laminarin, ethanol

## 서 론

현재 전 세계는 화석연료의 지속적인 사용으로 인한 환경오염 및 지구 온난화를 겪고 있으며, 그리고 이러한 화석연료의 고갈을 맞이하여 화석연료의 사용규제 및 대체 에너지원의 개발에 몰두하고 있다. 다양한 대체 에너지 중에서 바이오 디젤, 바이오 수소 및 바이오 에탄올 등의 바이오 에너지에 관한 연구가 각광을 받고 있으며, 이미 미국, 브라질 및 유럽 등에서 휘발유를 대체 할 수 있는 연료로써 바이오 에너지의 실용화에 성공하였다[3]. 그러나 미국과 브라질에서 개발된 바이오 에탄올의 경우 옥수수나 사탕수수라는 당질 또는 전분질 식량 작물을 이용한 방법을 사용하기 때문에 원료 곡식가격의 증가로 인한 식량난과 원료가격의 상승으로 인한 원료 공급의 안정성 감소라는 문제점이 있다[3,16]. 이러한 문제를 해결하기 위하여 비식량성 원료를 이용한 바이오 에탄올의 생산이 필요하게 되었다. 이러한 원료로써, 목질계와 해조류가 주목 받고 있으며, 특히 해조류를 이용한 연구의 경우 해양을 이용한 해조류 양식으로 인한 원료의 공급이 원활하며, 해조류의 높은 CO<sub>2</sub> 흡수효율을 이용한 CO<sub>2</sub> 감소라는 환경 문제의 해결 등의 경제적, 환경적 장점이 있다[16].

다당류 복합체를 분해하여 단당체를 얻는 방법은 물리적 공정, 산과 알칼리를 이용하는 화학적 공정, 그리고 효소를 이용하는 효소적 공정으로 분류된다. 그러나 이러한 방법을

이용하여 alcohol 발효를 위한 glucose 형태의 다당류를 획득하기 위해서는 물리적, 효소적 공정과정의 효율의 증가와 비용절감, 그리고 화학적 공정 과정 후 산 또는 알칼리의 완벽한 회수라는 문제가 있다[3]. 또한 분해산물을 이용한 고농도 alcohol 생산을 위한 alcohol 발효 과정의 공정 또는 균주의 개발 및 alcohol 발효 후 배양액에서 순수 alcohol만을 효율적으로 정제하는 기술 개발 확립이 필요하다[3].

해조류 유래의 다당류는 이러한 공정으로써 glucose 수준의 단당 형태의 저단위체로의 분해가 어려우며 또한 분해된 다당류를 이용한 alcohol 발효 효율이 매우 낮다는 문제가 있다[3,16]. 따라서, 해조류 유래의 다당류를 효과적으로, 그리고 alcohol 발효가 용이한 형태의 단당체 형태로의 분해 기술의 개발을 위한 연구가 필요하다.

갈조류가 생산 또는 저장하는 탄수화물 중에서 laminarin이라는 다당류는 *Laminaria* sp.의 갈조류에서 풍부하게 존재하는 저장성 다당류이며, glucose가  $\beta$ -1,3과  $\beta$ -1,6 glucosidic bond가 3:1의 비율로 결합된 다당류이기 때문에 결합상태인  $\beta$ -glucosyl linkage를 효율적으로 분해한다면 다른 해조류 유래의 다당류에 비하여 glucose의 형태로의 분해가 쉬우며, 분해 후 alcohol 발효를 위한 기질로 사용이 용이하다[21].

해조류 유래의 laminarin을 이용한 다당류를 획득하기 위해서는 주요 결합인 1,3- $\beta$ -glucosyl linkage 결합들을 효과적으로 분해하여야 하며, 이러한 1,3- $\beta$ -glucosyl linkage를 분해하는 대표적인 효소로는 exo- 또는 endo- $\beta$ -1,3-glucanase가 잘 알려져 있다[11]. *Bacillus* species [1,2,7,10,12,13,17,18,20,2,29], *Fibrobacter succinogenes* [5,15], *Cellvibrio mixtus* [23],

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5865, Fax : +82-51-629-5863

E-mail : iskong@pknu.ac.kr

*Thermotoga neapolitana* [4], *Ruminococcus flavefaciens* [8,9], *Oerskovia xanthineolytica* [6], *Clostridium thermocellum* [25,26,27,30], 그리고 *Rhodothermus marinus* [28] 등의 다양한 미생물에서  $\beta$ -1,3-glucanase (laminarinase)에 대한 연구 및 보고가 있으며, 이러한  $\beta$ -1,3-glucanase 중에서 *Pyrococcus furiosus*라는 초호열성 고세균의 laminarinase의 경우 최적 반응온도가 100-105°C이며, 매우 넓은 범위의 heat 및 pH stability가 있으며, laminarin과  $\beta$ -glucan 등을 분해하여 glucose, laminaribiose, 그리고 laminaritriose 등으로 다양한 분해산물을 생산함이 밝혀졌다[11]. 본 연구에서는 호열성 세균인 *P. furiosus*의  $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 대장균에서 대량 발현 시킨 후 정제 효소를 사용하여 laminarin을 분해하였으며, 분해 산물을 기질로 alcohol 생산 효모인 *Pichia angophorae*를 이용한 alcohol 발효를 통하여 에탄올 생산에 관한 결과를 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Bacterial strains, culture conditions and vector

Cloning host로써 Novagen에서 구입한 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 와 BL21(DE3)을 Luria-Bertani (LB) broth (Difco, USA)에서 37°C로 배양하였으며, pET-22b(+)를 cloning vector로 사용하였다. Yeast (*Pichia angophorae* CBS5830와 *Saccharomyces cerevisiae* (JENICO, Korea))를 alcohol 발효 균주로써 150 rpm, 30°C 조건 하에서 Horn 등[14]의 방법을 사용하여 배양하였으며, 에탄올 생산에 사용한 배지는 0.02% urea와 0.006% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 basal medium으로 하였으며 배지의 pH는 McIlvaine [19]의 방법에 따라 조정하였다. 그리고 각각의 균주는 glycerol을 이용하여 -80°C에서 보존하였다.

### Overexpression of $\beta$ -1,3-glucanase of *P. furiosus*

본 연구에서 template로 사용한 DNA는 Georgia대학 생화학과 Dr. M. Adams로부터 받아 사용하였으며, endo-1,3- $\beta$ -glucanase (accession number: AF013169)의 증폭을 위한 주형으로 사용하였다. 모든 분자생물학적 실험방법은 Sambrook 등[24]의 방법을 따랐다. Glucanase의 ORF를 각각 *Nde*I과 *Xba*I site가 존재하는 forward primer (5'-GGCCCATATGAAAAAGAAGCCTTGTTGTTTC-3')와 reverse primer (5'-GCCCTCGAGACCACTAACGAATGAGTAAAC-3')를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭한 endo-1,3- $\beta$ -glucanase는 pET-22b(+) vector와 ligation 한 뒤 *E. coli* BL21 (DE3)에 transformation시켰다. 1 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 이용하여 대량발현을 유도 후 Ni-NTA affinity column을 이용하여 순수하게 정제 하였다. 정제한 목적 단백질의 유무와 정제도는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 수행 후 coomassie brilliant blue로 염색하여 확인하였다.

### Analysis of $\beta$ -1,3-glucanase activity using laminarin

정제한  $\beta$ -1,3-glucanase의 활성은 50mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer에 laminarin을 첨가하여 100°C에서 3hr 반응 하였다. 반응 후 생성된 유리환원당의 유무는 thin layer chromatography (TLC) 법과 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 확인하였다. TLC는 Silica gel 60 F<sub>254</sub>를 사용하였다. 전개용매는 n-butanol: acetic acid: DW=2:1:1의 비율로 사용하였으며, 유리환원당의 유무는 10% 황산 용액을 뿌린 뒤 110°C에서 반응 후 spots의 생성을 관찰함으로써 확인하였다. HPLC를 이용하여 glucose의 유무를 동시에 확인하기 위하여 aqueous GPC columns (8.0 mm i.d. x 300 mm) (SUGAR KS-802; Shodex; Showa-Denko K.K.; Japan)을 사용하여 isocratic 으로 100% water 를 유속 0.5 mL min<sup>-1</sup>로 refractive index detector (RI-102; Shodex; Showa-Denko K.K.; Japan)로 검색하였다.

### Alcohol fermentation with laminarin degradation products

Laminarin 분해산물을 culture media의 유일한 carbon source로 하여 alcohol 발효를 수행하였다. Alcohol 발효에 사용한 균주는 *P. angophorae*와 *S. cerevisiae*로써 각각 150 rpm, 30°C 조건 하에서 24 hr 또는 48 hr 동안 배양 후 생산된 에탄올의 성분과 함량을 gas chromatography로써 분석하였다. 발효 후 배양액에 존재하는 에탄올 함량은 flame ionization detector (FID)에 ZB-WAX plus column (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m) (Polyethylene glycol; Zebron, USA)을 사용하여 gas chromatography (Agilent model 6890N Series)로 확인하였다. 에탄올 함량은 에탄올 표준곡선과 비교하여 확인하였다. Gas chromatography 분석에 사용된 gas는 모두 99.999%의 고순도를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Construction of plasmid DNA and purification of recombinant $\beta$ -1,3-glucanase of *P. furiosus*

PCR 반응으로써 894 bp의  $\beta$ -1,3-glucanase ORF 유전자 증폭산물을 성공적으로 얻어 낼 수 있었으며, 이를 pET-22b (+) vector와 ligation 후 대량발현 host인 *E. coli* BL21 (DE3)에 transformation하였다. Plasmid 내  $\beta$ -1,3-glucanase ORF는 sequencing을 통하여 삽입된 정확한 염기서열을 확인한 뒤, IPTG를 이용한 유도발현을 수행하였다. Fig. 1에 나타낸 것처럼 host *E. coli*의 배양과정 중 IPTG를 이용한 대량유도 발현이 성공적임을 확인하였으며, 약 33 kDa의 대량발현 된 재조합  $\beta$ -1,3-glucanase는 대부분 inclusion body의 형태로 cytoplasm내에서 존재함을 확인하였다. 초음파로 처리하여 cell을 파쇄 후 inclusion body를 얻었으며, 6 M urea가 첨가된 20

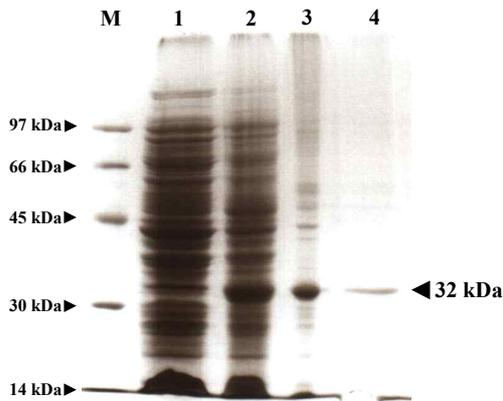


Fig. 1. SDS-PAGE of purified recombinant  $\beta$ -1,3-glucanase. Lane M, protein marker; lane 1, crude *E. coli* lysate; lane 2, induced *E. coli* lysate; lane 3, cytoplasmic protein of inclusion body; lane 4, purified  $\beta$ -1, 3-glucanase.

mM Tris-HCl (pH 8.0)을 이용해 denaturation 하였으며, 20mM Tris-HCl (pH 8.0)로 하룻동안 투석하여 re-folding 시킨 뒤 Ni-NTA affinity column 정제 방법으로 his-tag이 부가된 순수한 재조합  $\beta$ -1,3-glucanase만을 정제 할 수 있었다.

Analysis of  $\beta$ -1,3-glucanase activity

정제한 재조합 $\beta$ -1,3-glucanase 5  $\mu$ g을 laminarin이 0.5% 첨가된 50 mM Tris-HCl (pH8.0) 1 ml에 넣어 반응시켰다.  $\beta$ -1,3-glucanase와 laminarin의 반응 후 반응액을 TLC를 통하여 laminarin의 분해 및 분해된 환원당의 유무를 확인하였다. 전개용매를 따라 이동한 spot들의 위치를 분석한 결과, 정제한  $\beta$ -1,3-glucanase이 첨가되지 않고 laminarin만을 첨가한 control 용액의 spot은 전개용매에 의한 이동이 거의 없었으나,  $\beta$ -1,3-glucanase와 반응한 laminarin 용액은 다양한 종류의 저분자 올리고당 또는 단당의 형태로 분해됨을 알 수 있었으며 glucose의 Rf치와 동일한 spot도 존재하고 있었다(Fig. 2).

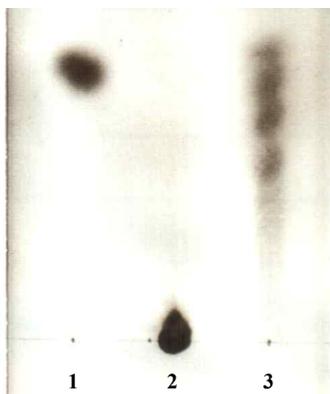


Fig. 2. TLC analysis of hydrolyzed laminarin product. Lane 1, glucose; lane 2, laminarin; lane 3, laminarin incubated with recombinant  $\beta$ -1, 3-glucanase.

HPLC를 사용한 분석에서도 TLC의 결과와 마찬가지로 standard 물질로 주입한 glucose와 retention time이 같은 peak가 존재하였으며, 다른 retention 시간에서 나타나는 peak들이 있는 것으로 보아 고분자의 laminarin이 glucose 및 glucose 이외의 올리고당으로 분해 되었음을 알 수 있었다(Fig. 3).

이와 같은 결과는 해조류 다당인 laminarin을 분해할 수 있는 유용효소로 이용 할 수 있음을 보여 주었다.

Alcohol fermentation with laminarin degradation products

에탄올 생산을 위하여 Mcilvaine [19]의 방법에서 사용한 배지의 모든 C-source를 배제하고 laminarin을  $\beta$ -1,3-glucanase로 처리한 반응액을 C-source로써 첨가하였다. 이렇게 만든 배지에 *P. angophorae*와 *S. cerevisiae*를 접종하여 alcohol 발효를 수행하였다. 배양 후 gas chromatography로 확인한 결과 *S. cerevisiae*에서는  $\beta$ -1,3-glucanase에 의한 laminarin의 분해 산물을 C-source로써 사용하여 생산한 에탄올의 함량이 배지 성분내에 매우 소량이었으며, *P. angophorae*의 경우 *S. cer-*

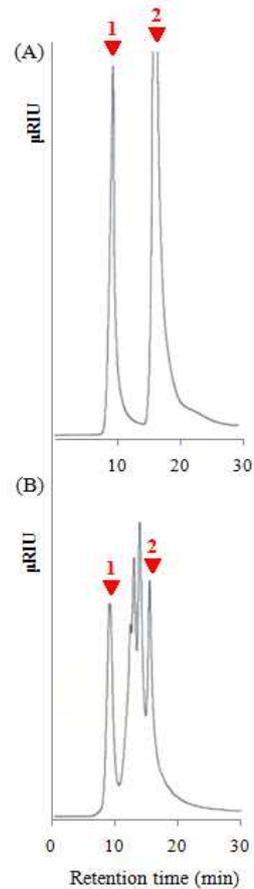


Fig. 3. Typical HPLC chromatograms of standard glucose (A) and enzyme treated sample (B). Peak 1 means glucose and peak 2 means Tris-HCl buffer.

*avisia*보다는 많은 양의 에탄올을 생산 함을 알 수 있었다(data not shown). 따라서 본 연구에서는  $\beta$ -1,3-glucanase에 의한 laminarin의 분해산물을 C-source로 이용한 bio-ethanol 생산을 위한 균주로서 *P. angophorae*를 사용하였다.

Laminarin 분해산물을 유일한 C-source로써 *P. angophorae*를 접종한 후 배양 과정 중 생산된 에탄올은 laminarin분해 반응에 첨가된 laminarin의 농도에 따라서 생산량이 증가하였다(Table 1). 효소반응을 위해 첨가된 laminarin의 농도가 0.5%일 경우 24시간에서 48시간까지 배양하였을 때 alcohol의 생산이 약간 증가하는데 비해 2% laminarin의 분해산물을 첨가했을 경우 0.5%에 비해서 alcohol의 생산이 현저하게 증가하고 있었으며 시간에 따라서도 48시간 배양 시 24시간 배양하여 얻은 alcohol 생산량의 2배가 되는 것을 알 수 있었다. 그러나 48시간 이후에는 생산량의 변화에 차이를 보이지 않았다(Table 1). 이와 같은 결과는 laminarin의 분해 농도가 높을수록 *P. angophorae*가 알코올 발효반응에 사용할 수 있는 분해되어 생산되는 glucose의 함량이 많다는 것을 알 수가 있었다. 하지만 동일한 비율의 laminarin 분해산물과 glucose를 이용하여 각각의 에탄올 생산량을 비교하였을 때에는 glucose보다는 현저하게 낮은 수율의 에탄올 생산량을 laminarin 분해물에서 나타냈다. 이와 같은 결과는 laminarin이  $\beta$ -1,3-glucanase에 의해 생산되는 효모 이용성 glucose의 농도가 비교대상의 glucose의 농도보다 낮음을 알 수 있었으며, TLC 실험 및 HPLC 분석에서도 보여주고 있듯이 laminarin 분해 산물에는 glucose이외의 분해 다당 또는 단당류가 존재함을 알 수가 있었다(Table 1). 따라서 보다 많은 에탄올을 생산하기 위해서는 laminarin과  $\beta$ -1,3-glucanase의 반응 시간, 최적 조건 및 기질과 효소의 첨가 비율 등과 같은 반응 조건을 확립하여 *P. angophorae* 균주가 에탄올 생산에 사용할 수 있는 glucose를 최대한 많이 laminarin으로부터 생산함이 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

현재 다양한 방법을 통하여 biomass를 이용한 bio-ethanol의 생산에 관한 연구가 활발하게 수행되고 있다. 하지만 대부분의 bio-ethanol 생산 방식은 목질계나 해조류, 또는 이러한 biomass를 다양한 방법으로 분해한 분해산물을 직접적인 탄소원으로써 이용한 alcohol 발효 방법을 사용하고 있으며, 이러한 분해산물의 생산 시에 발생하는 독성물질 또는 분해산물의 bio-conversion의 효율 등이 최종생산 수율에 문제가 되고

있다[3]. 따라서 본 연구에서는 미생물을 alcohol 발효에 사용할 수 있으며, 반응에 첨가되는 유해물질이 없는 방법을 위하여, 해조류 유래의 laminarin이라는 다당을 사용하여  $\beta$ -1,3-glucanase과 반응하여 분해 산물이 alcohol 발효에 이용할 수 있는지를 확인한 결과 재조합  $\beta$ -1,3-glucanase는 laminarin을 glucose 수준의 단당을 부분적으로 생산하였으며, 이러한 분해 단당을 이용한 alcohol 발효과정을 통하여 bio-ethanol을 생산할 수 있는 가능성이 있음을 증명하였다. 앞으로 분해 과정과 공정의 최적화를 통하여 더 높은 수율의 에탄올 생산에 관한 연구를 수행할 예정이다.

## 감사의 글

이 논문은 2009학년도 부경대학교 기성회 학술연구비의 지원을 받아 수행된 연구임(PK-2009-20).

## References

- Borriess, R., K. Buettner, and P. Maentsaelae. 1990. Structure of the  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene of *Bacillus macerans*: homologies to other  $\beta$ -glucanases. *Mol. Gen. Genet.* **222**, 278-283.
- Bueno, A., C. R. Vazquez de Aldana, J. Correa, T. G. Villa, and F. del Rey. 1990. Synthesis and secretion of a *Bacillus circulans* WL-12 1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 2160-2167.
- Chung, J. H., G. S. Kwon, and H. S. Jang. 2008. Development of transportation bio-energy and its future. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 1-5.
- Dakhova, O. N., N. E. Kurepina, V. V. Zverlov, V. A. Svetlichnyi, and G. A. Velikodvorskaya. 1993. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Thermotoga neapolitana* genes coding for enzymes of carbohydrate substrate degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1359-1364.
- Erfle, J. D., R. M. Teather, P. J. Wood, and J. E. Irvin. 1988. Purification and properties of a 1,3-1,4-3-D-glucanase (lichenase, 1,3-1,4-13-D-glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.73) from *Bacteroides succinogenes* cloned in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **255**, 833-841.
- Ferrer, P., T. Halkier, L. Hedegaard, D. Savva, I. Diers, and J. A. Asenjo. 1996. Nucleotide sequence of a  $\beta$ -1,3-glucanase isoenzyme *I*A gene of *Oerskovia xanthineolytica* LL G109 (*Cellulomonas cellulans*) and initial characterization of the recombinant enzyme expressed in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **178**, 4751-4757.
- Fiske, M. J., K. L. Tobey-Fincher, and R. L. Fuchs. 1990. Cloning of two genes from *Bacillus circulans* WL-12 which encode 1,3- $\beta$ -glucanase activity. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2377-2383.
- Flint, H. J., C. A. McPherson, and J. Bisset. 1989. Molecular cloning of genes from *Ruminococcus flavefaciens* encoding xy-lanase and  $\beta$  (1-3,1-4) glucanase activities. *Appl. Environ.*

Table 1. Ethanol production with different concentration of laminarin degrading product

Carbon source	Ethanol concentration (% v/v)	
	24 hr	48 hr
0.5 % laminarin	0.04 %	0.05 %
2 % laminarin	0.15 %	0.30 %
2 % glucose	0.80 %	

- Microbiol.* **55**, 1230-1233.
9. Flint, H. J., J. Martin, C. A. McPherson, A. S. Daniel, and J. X. Zhang. 1993. A bifunctional enzyme, with separate xylanase and  $\beta$  (1,3-1,4)-glucanase domains, encoded by the *xynD* gene of *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bacteriol.* **175**, 2943-2951.
  10. Gosalbes, M. J., J. A. Perez-Gonzalez, R. Gonzalez, and A. Navarro. 1991. Two  $\beta$ -glycanase genes are clustered in *Bacillus polymyxa*. molecular cloning, expression, and sequence analysis of genes encoding a xylanase and an endo- $\beta$ -(1,3)-(1,4)-glucanase. *J. Bacteriol.* **173**, 7705-7710.
  11. Gueguen, Y., Voorhorst, W. G., Van der Oost, J., and De W. M. Vos. 1997. Molecular and biochemical characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glucanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **12**, 31258-31264.
  12. Hofemeister, J., A. Kurtz, R. Borriss, and J. Knowles. 1986. The  $\beta$ -glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* shows extensive homology with that of *Bacillus subtilis*. *Gene* **49**, 177-187.
  13. Horikoshi, K., H. Koffler, and K. Arima. 1963. Purification and properties of  $\beta$ -1,3-glucanase from the "lytic enzyme" of *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **11**, 267-275.
  14. Horn, S. J., I. M. Aasen, and K. Østgaard. 2000. Ethanol production from seaweed extraction. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 249-254.
  15. Irvin, J. E. and R. M. Teather. 1988. Cloning and expression of a *Bacteroides succinogenes* mixed-linkage  $\beta$ -glucanase (1,3-1,4- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohydrolase) gene in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2672-2676.
  16. Lee, S. M., I. S. Choi, S. K. Kim, and J. H. Lee. 2009. Production of bio-ethanol from brown algae by enzyme hydrolysis. *Korean Sci. Biotechnol. Bioeng. J.* **24**, 483-488.
  17. Lloberas, J., J. A. Perez-Pons, and E. Querol. 1991. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo- $\beta$ -1,3-1,4-D-glucanase gene from *Bacillus licheniformis*. Predictive structural analyses of the encoded polypeptide. *Eur. J. Biochem* **197**, 337-343.
  18. Louw, M. E., S. J. Reid, and T. G. Watson. 1993. Characterization, cloning and sequencing of a thermostable endo-(1,3-1,4)  $\beta$ -glucanase-encoding gene from an alkalophilic *Bacillus brevis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 507-513.
  19. Mcilvaine, T. C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem* **49**, 183-186.
  20. Murphy, N., D. J. McConnell, and B. A. Cantwell. 1984. The DNA sequence of the gene and genetic control sites for the excreted *Bacillus subtilis* enzyme  $\beta$ -glucanase. *Nucleic Acids Res.* **12**, 5355-5367.
  21. Nisizawa, K., T. Yamaguchi, N. Handa, M. Maeda, and H. Yamazaki. 1963. Chemical nature of a uronic acid-containing polysaccharide in the peritrophic membrane of the silkworm. *J. Biochem* **54**, 419-426.
  22. Rombouts, F. M. and H. J. Phaff. 1976. Lysis of yeast cell walls. Lytic  $\beta$ -(1 leads to 3)-glucanases from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Biochem* **16**, 121-130.
  23. Sakellaris, H., J. M. Pemberton, and J. M. Manners. 1993. Characterization of an endo-1,3(4)- $\beta$ -D-glucanase gene from *Cellvibrio mixtus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**, 269-272.
  24. Sambrook, J. and D. W. Russell. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  25. Schimming, S., W. H. Schwarz, and W. L. Staudenbauer. 1991. Properties of a thermoactive  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase (lichenase) from *Clostridium thermocellum* expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 447-452.
  26. Schimming, S., W. H. Schwarz, and W. L. Staudenbauer. 1992. Structure of the *Clostridium thermocellum* gene *licB* and the encoded  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase. A catalytic region homologous to *Bacillus lichenases* joined to the reiterated domain of clostridial cellulases. *Eur. J. Biochem* **204**, 13-19.
  27. Schwartz, W. H., S. Schimming, and W. L. Staudenbauer. 1988. Isolation of a *Clostridium thermocellum* gene encoding a thermoactive  $\beta$ -1,3-glucanase (Laminarinase). *Biotechnol. Lett.* **10**, 225-230.
  28. Spilliaert, R., G. O. Hreggvidsson, J. K. Kristjansson, G. Eggertsson, and A. Palsdottir. 1994. Cloning and sequencing of a *Rhodothermus marinus* gene, *bglA*, coding for a thermostable  $\beta$ -glucanase and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem* **224**, 923-930.
  29. Yahata, N., T. Watanabe, Y. Nakamura, Y. Yamamoto, S. Kamimiya, and H. Tanaka. 1990. Structure of the gene encoding  $\beta$ -1,3-glucanase A1 of *Bacillus circulans* WL-12. *Gene* **86**, 113-117.
  30. Zverlov, V. V., D. A. Laptev, V. I. Tishkov, and G. A. Velikodvorskaja. 1991. Nucleotide sequence of the *Clostridium thermocellum* laminarinase gene. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **181**, 507-512.

초록 : *Pyrococcus furiosus*의  $\beta$ -1,3-glucanase를 처리한 laminarin 분해 산물을 이용한 바이오에탄올의 생산

김동균<sup>1</sup> · 김은영<sup>1</sup> · 김유리<sup>1</sup> · 김종균<sup>1</sup> · 이한승<sup>2</sup> · 공인수<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부경대학교 생물공학과, <sup>2</sup>신라대학교 의생명과학대학 바이오식품소재학과)

갈조류 유래의 다당류인 laminarin을 기질로써 호열성 미생물인 *Pyrococcus furiosus*의  $\beta$ -1,3-glucanase와 반응시킨 뒤, 분해산물을 yeast를 이용한 알코올 발효과정을 통하여 에탄올을 생산하고자 하는 연구를 수행하였다. 33 kDa (297 a.a, 894 bp)의 재조합  $\beta$ -1,3-glucanase를 대장균에게 발현 후 순수하게 정제 하였으며, 정제한  $\beta$ -1,3-glucanase와 laminarin을 반응시킨 결과 단당을 포함하여 oligo당 형태로 분해됨을 TLC와 HPLC로써 확인하였다. 그리고 이러한 분해산물을 에탄올 생산 배지의 유일한 탄소원으로써 첨가하여 yeast를 배양한 결과 48시간 뒤에는 세포 외로 최소 0.3%의 알코올을 생산함을 gas chromatography로써 확인하였다. 따라서  $\beta$ -1,3-glucanase와 laminarin의 최적 분해반응 및 yeast의 최적 알코올 발효 조건을 확립한다면 본 연구의 방법을 이용한 해조류로부터의 bio-ethanol의 생산을 성공적으로 수행 할 수 있으리라고 판단된다.