J. Korean For. Soc. Vol. 105, No. 2, pp. 261~267 (2016)
http://dx.doi.org/10.14578/jkfs.2016.105.2.261

한국임학회지
JOURNAL OF KOREAN FOREST SOCIETY
ISSN 0445-4650(Print), ISSN 2289-0904(Online)
http://e-journal.kfs21.or.kr

효모에 발현된 북방수염하늘소(*Monochamus saltuarius*) Cellulase gene MsGHF45의 특성에 관한 연구

고현진 · 고현준 · 홍순관 · 박용철*
강원대학교 의생명과학과

Characterization of Cellulase Gene (MsGHF45) from *Monochamus saltuarius* Expressed in Yeast

Hyeon-Jin Ko, Hyunjun Ko, Soon-Kwan Hong and Yong Chul Park*
Department of Biomedical Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea

요 약: 화석연료의 고갈 문제로 인하여 다양한 대체에너지가 개발 중이며 본 연구에서는 바이오에탄올 연구의 초석으로 사용하기 위해 곤충의 효소를 연구하였다. 북방수염하늘소(*Monochamus saltuarius* Gebler)가 지닌 cellulase (MsGHF45) 유전자를 *Kluyveromyces lactis*에 형질전환 시켰다. 형질전환 된 효모는 활성이 있는 cellulase 효소를 성공적으로 생산하였다. 재조합 MsGHF45의 분자량은 SDS-PAGE와 western blot을 통하여 확인하였다. 효소의 활성은 기질로써 carboxymethyl cellulose를 첨가한 native-PAGE를 통해서 검증하였다. 효소 활성의 최적조건을 알아본 결과, pH는 5에서, 온도는 40ºC에서 나타났다. 바륨이온(Ba^{2+})과 철이온(Fe^{2+})은 효소활성을 저해하지 않았으나, 칼슘이온(Ca^{2+}), 코발트이온(Co^{2+}), 구리이온(Cu^{2+}), 수은이온(Hg^{2+}), 마그네슘이온(Mg^{2+}), 망간이온(Mn^{2+}) 그리고 아연이온(Zn^{2+})은 활성을 저해하였다. 특히, 수은이온은 효소활성을 66.5% 감소시켰다. 본 연구는 다양한 효소를 이용한 biofuel 연구에 참고자료로 사용될 것이다.

Abstract: In this study, the cellulase of *Monochamus saltuarius* (MsGHF45) gene was introduced in *Kluyveromyces lactis*, successfully. The molecular weight of recombinant enzyme was determined by SDS-PAGE and western blotting. The enzymatic activity was confirmed by native-PAGE containing carboxymethyl cellulose as a substrate. The optimul pH and temperature of recombinant MsGHF45 was pH5 and 40ºC. The barium (Ba^{2+}) and ferrous (Fe^{2+}) enhanced enzyme activity, and the mercuty (Hg^{2+}) inhibited its activity.

Key words: Monochamus saltuarius, *cellulase, heterologous expression, yeast*

서 론

세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 연료인 화석연료의 사용은 대기오염이나 지구온난화 등 많은 환경적인 문제들을 야기할 뿐만 아니라, 매장량에 한계가 있고, 그나마도 일부지역에 편중되어 있어 수급이 불안정하다는 큰 단점이 있다(Dresselhaus and Thomas, 2001).

이로 인해 다양한 대체 에너지에 대한 연구가 세계적으로 진행되고 있으며, 특히 생산 재료가 다양한 바이오에탄올에 대한 연구가 확대되는 추세이다. 에탄올은 전 세계적으로 가장 넓게 사용되는 biofuel이다. 이는 주로 밀, 옥수수, 사탕무, 사탕수수, 당밀, 과일, 채소와 같은 다양한 작물들로부터 직접 유래된 당과 탄수화물의 발효에 의한 first-generation 과정을 사용하여 생산된다(Fischer et al., 2013).

Cellulase에 의해 분해된 cellulose 반응산물은 yeast나 E. *coli* 등의 미생물들에 의해서 에탄올을 생산하기도 한다(Maki et al., 2009). 그중 lignocellulosic 바이오에탄올은 쉽게 가솔린을 대체할 수 있기 때문에 가장 각광받고 있다. 또한 lignocellulosic 바이오매스는 식품산업과 경쟁할 필요도 없다(Lynd et al., 1991). Lignocellulosic 바이오에탄올의 제조비용을 감소시키기 위한 핵심 과정은 cellulase에 의한 cellulose 분해과정이다(Wyman, 2007). 따라서 lignocellulosic 바이오에탄올의 생산이 지속 가능하고 효율적인 생산을 위해 더 효율적이며 안정적인 효소를 찾기 위한 연구가 진행 중이다(Willis et al., 2010).

*Corresponding author
E-mail: ycpark@kangwon.ac.kr

본 연구에서는 북방수염하늘소(*Monochamus saltuarius* Gebler)가 지니는 glycoside hydrolase family 45 (MsGHF45) 효소를 *Kluyveromyces lactis*에 형질전환 시켰다. 형질전환된 *K. lactis*로부터 단백질 생산을 유도하였고, 그 결과 분비된 단백질의 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 효모 형질전환 발현 카세트의 구성

MsGHF45의 주형가닥 유전자는 MsGHF45가 형질전환된 *E. coli* [RosettaBlue™ (DE3) pLysS, Novagen®]로부터 분리시켰다. 세포를 LB broth 배지에서 하룻밤 배양시켰고, MsGHF45 유전자가 포함된 플라스미드는 HiYield™ Plasmid Mini Kit (RBC, New Taipei City, Taiwan)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 분리시켰다. 분리된 플라스미드는 효모에서의 발현을 위한 주형가닥으로써 사용되었다.

효모 발현 카세트 구성을 위해, 프라이머(5'-GCAGCGC-TCGAGAAAAGAATGAAGCTGTTGATA-3', 5'-TAATA-ATGCGGCCGCTCAAAGTCCAAGAGAACA-3')는 특정한 제한효소(F'-*Xho*I, R'-*Not*I), kex site(AAAAGA), 종결코돈을 포함하여 디자인하였다.

PCR 결과물과 pKLAC2 벡터는 *Xho*I과 *Not*I로 처리하였고, QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 정제하였다. 정제된 insert gene과 벡터는 T4 DNA ligase (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 결합시켰다. 결합된 결과물은 HIT Competent cells™-DH5a (RBC, New Taipei City, Taiwan)와 혼합하였고, 혼합액은 얼음 상에 20분 동안 처리한 후에 42°C로 열 충격을 준 후, LB broth 배지 안에서 배양하였다. Pre-incubation 후에 세포 혼합액은 항생제 ampicillin이 포함된 LB agar plate에서 배양하였다.

2. *K. lactis*의 형질전환

발현 카세트를 *K. lactis* 유전체의 LAC4 지역 내로 효모와 통합시키기 위해서, 제한효소 *Bst* (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 선형화시켰다. 선형화된 결과물의 1 μg을 *K. lactis* GG799 competent cell, NEB Yeast transformation Reagent (New England Biolabs, Massachusetts, USA)와 함께 혼합하였다. 그리고 혼합물은 42°C로 40분 동안 열 충격을 주었고, 7,000 rpm으로 2분 동안 원심분리를 하였다. 얻어진 pellet cell은 YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose)에 부유시켰고, 30°C로 4시간 동안 250 rpm으로 배양하였다. 그 후 혼합액을 1X PBS에 부유시켰다. 부유시킨 세포는 10, 50, 100 μl를 취하여 각각 50 μl의 멸균증류수가 들어있는 1.5 ml tube에 옮긴 후 섞어주었다. 각각의 혼합액을 5 mM의 acetamide가 포함된 YCB agar plates (New England Biolabs, Massachusetts, USA) 위에 도말하였고 30°C에서 colony가 형성될 때 까지 4일 동안 배양하였다.

형질전환 되어진 *K. lactis*의 screening을 위해서 형성된 colony를 YPCMC agar plate (1% yeast extract, 1% peptone, 1% carboxymethyl cellulose)로 옮긴 후에 30°C로 2일 동안 배양하였다. 배양 후에 plate는 증류수로 헹구고, 0.5% congo red solution으로 염색 후, 1 M NaCl로 탈색하여 확인하였다.

3. 이종발현과 단백질 분석

형질전환 되어진 colony를 YPGlu medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)에서 배양하여 scale up 시킨 후에, 원심분리를 하여 얻어진 pellet을 YPGal medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% galactose)에 배양하였다. 재조합 MsGHF45는 배양하는 동안 배지로 분비된다. 시간이 진행됨에 따라서 배지를 취하여 원심분리를 하였고 상층액만 취하여 단백질 분석의 샘플로 사용하였다.

재조합 MsGHF45의 분자량은 SDS-PAGE, Western blot에 의해서 확인하였다(Laemmli, 1970).

효소의 활성은 resolving gel에 기질로써 0.1%의 carboxymethyl cellulose를 포함하고 SDS처리와 sample boiling 같은 단백질 변성과정 없이 진행한 native-PAGE 분석을 통해서 확인하였다. 전기영동 후에 겔을 20 mM phosphate buffer에 넣고 37°C에서 3시간 동안 효소반응을 하였고, 배양 후에 증류수로 세척 후, 0.5% congo red, 1 M NaCl로 염색/탈색하였다.

4. 효소의 특성 확인

단백질은 Amicon® Ultra-2 ml Centrifal Filters를 사용하여 농축시킨 후 사용하였다.

재조합 MsGHF45의 최적 pH조건을 알아보기 위하여 농축된 단백질에 기질로써 1% carboxymethyl cellulose를 첨가하고, 각각 다른 pH의 buffer를 넣어서 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. Buffer는 pH 2부터 1단위로 pH 10까지 만들어 총 9가지를 사용하였다. 배양된 혼합물은 DNS assay를 사용하여 활성도를 체크하였다(Miller, 1959).

재조합 MsGHF45의 최적 온도조건을 알아보기 위하여 농축된 단백질에 1% carboxymethyl cellulose와 50 mM acetic acid-NaOH buffer 를 첨가한 후에 각기 다른 온도조건 내에서 1시간 동안 배양하였다. 온도는 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70°C로 총 7가지 조건을 사용하였다. 배양된 혼합물은 DNS assay를 사용하여 활성도를 체크하였다.

재조합 MsGHF45의 효소 활성에 금속이온이 끼치는 영

향을 알아보기 위하여 1% carboxymethyl cellulose와 50 mM acetic acid-NaOH buffer를 첨가하고, 몇 가지의 2가 양이온 금속(barium, calcium, cobalt, copper, ferrous, mercury, magnesium, manganese, zinc)을 1 mM을 더하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양된 혼합물은 DNS assay를 사용하여 활성도를 체크하였다.

모든 실험은 3반복으로 진행하였다.

5. 통계 분석

각 처리에 따른 결과의 해석을 위하여 평균 비교법의 한 방법인 ANOVA 분석을 실시하였고, 이는 SPSS(software v22.0, USA)의 일원 배치 분산분석을 이용하여 분석하였다. ANOVA 분석 후 Duncan 법을 이용하여 집단별 평균을 비교하는 사후분석을 실시하였다.

결 과

1. 형질전환 된 *K. lactis*의 Screening

형질전환 된 *K. lactis*의 screening을 위해서 세포를 5 mM acetamide가 포함된 YCB agar plate에 도말하였다. YCB agar plate위에서 형질전환 된 세포의 생존율은 형질전환 되지 않은 세포보다 훨씬 높다. 그 이유는 pKLAC2 vector에 포함된 *Aspergillus* acetamidase (*amdS*) 유전자는 acetamide를 분해하는 acetamidase를 분비하기 때문이다 (Selten et al., 2000).

형질전환 된 *K. lactis*의 정확한 screening을 위해서 YCB agar plate 위에 잘 형성된 colony를 선별하여 YPCMC agar plate로 옮겼다. YPCMC agar plate에는 기질인 carboxymethyl cellulose가 포함되어 있다. 오직 형질전환 된 세포만이 재조합 MsGHF45에 의해서 carboxymethyl cellulose를 glucose로 분해할 수 있기 때문에, congo red 염색법에 의해서 형질전환 된 colony 주변에는 halo zone이 형성된다. 확실한 단일 colony로 분리하기 위해서 여러 차례에 걸쳐 진행한 결과 모든 colony에서 활성을 확인하였다(Figure 1).

2. 단백질 분석

DNA의 염기서열을 통해 Protein Molecular Weight site (www.bioinformatics.org/sms)에서 계산하여 예측한 MsGHF45의 분자량은 25.11 kDa 이었다. SDS-PAGE 결과 약 25 kDa의 밴드가 나타났다(Figure 2A). 또한 western blot 분석에서도 재조합 MsGHF45의 밴드가 약 25 kDa에서 나타났다(Figure 2B).

효소의 활성은 기질인 carboxymethyl cellulose를 사용한 native-PAGE를 통해 확인하였다(Figure 3).

3. 효소의 특성 확인

재조합 MsGHF45의 pH와 온도의 최적 활성조건은 각

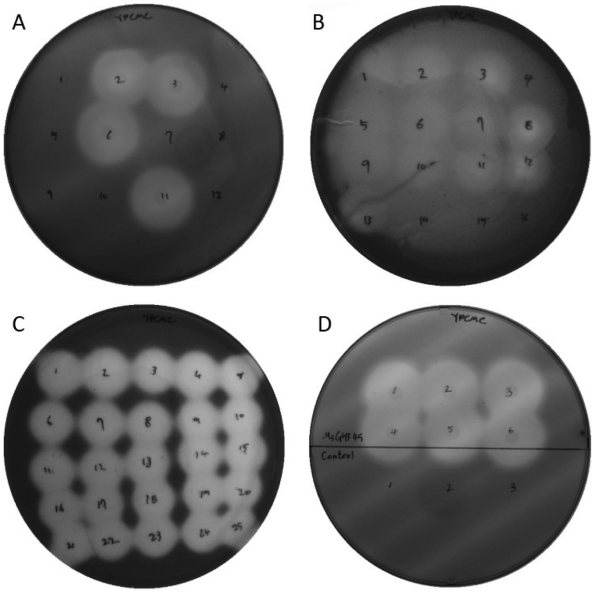

Figure 1. Screening of transgenic *K. lactis* by YPCMC agar medium. The only transgenic cells are able to form the halo zone, becouse the carboxymethyl cellulose is decomposed by cellulolytic enzyme. After thrice screening, all the colonies have formed broad and clear halo zone (A to C). There is no cellulolytic effect in native *K. lactis* GG799 cells (D, MsGHF45: recombinant transgenic yeast, Control: native *K. lactis* GG799 cell).

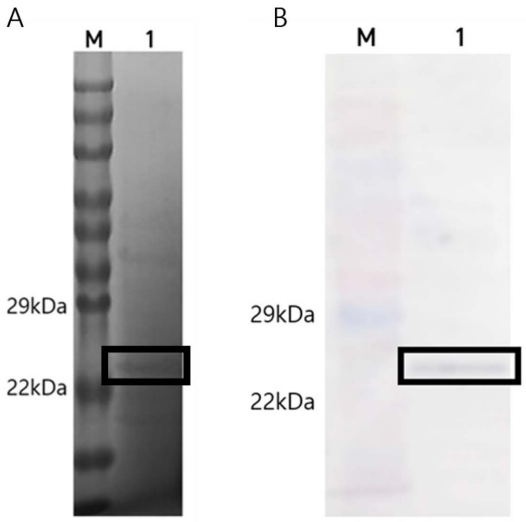

Figure 2. SDS-PAGE and western blotting of recombinant MsGHF45. A. The recombinant MsGHF45 was secreted to YPGal medium from transgenic *K. lactis*. The predicted molecular weight of MsGHF45 and secreted molecular weight of MsGHF45 were corresponded. There is faint other protein band that may be the partial decomposition product of MsGHF45 by protease effects of *K. lactis*. Lane M: protein 10-175 kDa marker. Lane 1: protein band which has molecular weight of roughly 25 kDa. B. Lane 1: protein band of recombinant MsGHF45 were roughly 25 kDa.

Figure 3. The cellulolytic effect of secreted MsGHF45 by native-PAGE. The only transgenic *K. lactis* cell culture medium has cellulolytic effect against carboxymethyl cellulose. Lane 1: native *K. lactis* GG799 cell culture medium. Lane 2: transgenic *K. lactis* cell culture medium.

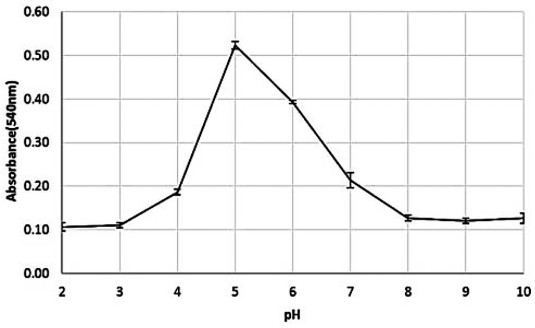

Figure 4. The optimum pH of recombinant MsGHF45. The enzyme activity was the highest at pH 5. This optimum pH will be advantage for yeast fermentation process, because during fermentation the pH of medium is decreased (pH 6.5 to 5.2) by alcohol and carbonic acid. Error bar: SE.

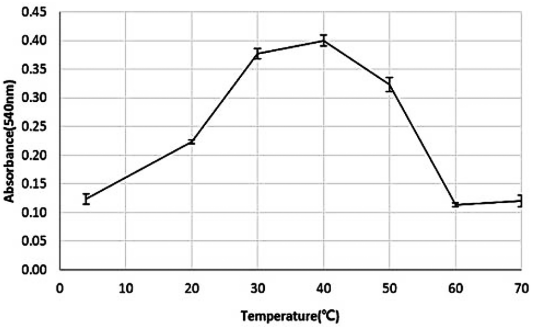

Figure 5. The optimum temperature of recombinant MsGHF45. Error bar: SE.

각 pH 5, 40ºC로 확인되었다(Figure 4, 5).

금속 이온과의 영향을 알아본 결과, 재조합 MsGHF45의 활성은 Ba^{2+}, Fe^{2+}을 첨가하여 배양한 경우 금속 이온을 넣지 않고 배양한 대조군에 비해 상대적으로 약 3.5~4.8%가 증가하였다(Table 1). 그에 반해서, 나머지 Ca^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}을 첨가하였을 경우에는 활성이 감소하였다. 특히, Hg^{2+}에서는 효소 활성이 약 66.5% 감소함을 보여주었다.

Table 1. Effects of various metal ions.

Metal ion	Relative activity (%)
Control	100±0.5
Barium (Ba^{2+})	103.5±1.7
Calcium (Ca^{2+})	90.9±1.4
Cobalt (Co^{2+})	87.5±0.7
Copper (Cu^{2+})	78.8±0.7
Ferrous (Fe^{2+})	104.8±0.9
Mercury (Hg^{2+})	33.6±1.0
Magnesium (Mg^{2+})	85.4±0.7
Manganese (Mn^{2+})	82.1±1.1
Zinc (Zn^{2+})	91.1±1.1

4. 통계분석

ANOVA 분석 결과로 보아 pH와 온도의 변화, 금속이온과의 영향에 따른 효소활성은 모두 검정 통계량의 유의확률이 0.000으로 유의수준 5%에서 차이가 존재하는 것으로 분석되었다. 분산의 동질성 검정 결과 유의확률은 각각 0.160, 0.198, 0.154로 세 경우 모두 유의수준 5%에서 각 처리에 따른 분산이 동일하다고 볼 수 있다. 따라서 Duncan 법을 이용하여 사후검정을 실시하였다.

Duncan 법을 이용한 사후검정 결과 유의수준 5%에서 pH 2, 3, 8, 9, 10에서는 차이가 없었고, pH 4,7에서도 차이가 발생하지 않았다. 또한 pH 6과 pH 5는 다른 모든 pH 값과 차이를 보이는 것으로 분석되었다(Table 2A). 또한 유의수준 5%에서 4, 60, 70ºC에서는 차이가 없었고, 30, 40ºC에서도 차이가 없었으며 20ºC와 50ºC에서는 다른 모든 온도에서와 차이를 보이는 것으로 분석되었다(Table 2B). 마지막으로 금속이온과의 영향을 보는 실험에서 사후검정 결과 유의수준 5%에서 Control 집단은 다른 모든 집단과 차이를 보이는 것으로 나타났다. Ca^{2+}과 Zn^{2+}, 그리고 Ba^{2+}과 Fe^{2+}의 첨가에 따른 활성 효율은 서로가 차이를 보이지 않았으며, 다른 금속들은 서로 각각 활성 효율에 차이를 보이는 것으로 분석되었다(Table 2C).

결 론

본 연구에서는 북방수염하늘소(*M. saltuarius*)가 지닌 cellulase (MsGHF45) 유전자를 *K. lactis*에 형질전환 시켰다. 형질전환 된 효모는 활성이 있는 cellulase 효소를 성공적으로 생산했다. 재조합 MsGHF45의 분자량은 SDS-PAGE와 western blot을 통하여 확인이 되었으며, 형질전

Table 2. Duncan's multiple range test

A

Duncan[a]

pH	N	알파의 서브세트 = 0.05			
		1	2	3	4
2	3	.1067			
3	3	.1100			
9	3	.1200			
8	3	.1267			
10	3	.1267			
4	3		.1867		
7	3		.2133		
6	3			.3933	
5	3				.5233
유의수준		.187	.058	1.000	1.000

동일 서브세트에 있는 그룹의 평균이 표시됩니다.
a. 조화 평균 표본 결과 = 3.000을(를) 사용합니다.

B

Duncan[a]

Temperature	N	알파의 서브세트 = 0.05			
		1	2	3	4
60	3	.1133			
70	3	.1200			
4	3	.1233			
20	3		.2233		
50	3			.3233	
30	3				.3767
40	3				.4000
유의수준		.450	1.000	1.000	.077

동일 서브세트에 있는 그룹의 평균이 표시됩니다.
a. 조화 평균 표본 결과 = 3.000을(를) 사용합니다.

C

Duncan[a]

Metal_ion	N	알파의 서브세트 = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Hg^{2+}	3	33.5333							
Cu^{2+}	3		78.8000						
Mn^{2+}	3			82.1333					
Mg^{2+}	3				85.4333				
Co^{2+}	3					87.4667			
Ca^{2+}	3						90.9000		
Zinc	3						91.0667		
Control	3							100.0000	
Ba^{2+}	3								103.4333
Fe^{2+}	3								104.7333
유의수준		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	.849	1.000	.148

동일 서브세트에 있는 그룹의 평균이 표시됩니다.
a. 조화 평균 표본 결과 = 3.000을(를) 사용합니다.

환 된 효소의 활성은 기질로써 carboxymethyl cellulose를 포함한 native-PAGE를 통해서 확인할 수 있었다. 재조합 MsGHF45 효소 활성이 갖는 최적 pH조건과 최적 온도조건을 확인할 수 있었으며, 금속이온과의 영향을 알 수 있었다. 최적 pH조건은 pH 5로 나타났으며, 최적 온도조건은 40°C로 나타났다. 최적 pH는 효모 배양과정을 위한 이점이 될 것이다. 배양하는 동안 배지의 pH는 에탄올이나 H_2CO_3와 같은 발효 생성물로 인해서 pH 6.5에서 pH 5.2로 감소하게 되기 때문이다. 곤충으로부터 유래되어진 대부분의 이종발현 재조합 cellulase는 pH 5~7, 그리고 온도는 40~60°C에서 최적 활성을 갖는다는 몇 가지 연구결과가 있다(Kim et al., 2008; Lee et al., 2004; Ni et al., 2007; Simura et al., 2003; Wei et al., 2006; Zhou et al., 2007). 또한 금속이온과의 영향을 보면, 이는 중금속이 티올기와 같은 효소의 활성부위를 갖는 몇몇의 일정 그룹들을 공격하는 것으로 보여 진다. 실험결과와 같이 대부분의 중금속은 효소 활성을 억제하는 경향이 있는 데에 반해, Ba^{2+}과 Fe^{2+}은 효소의 기질결합의 친화도를 높이고 촉매부위의 형태를 안정화시킬 수 있다(Naika et al., 2007). Ba^{2+}과 Fe^{2+}를 첨가하여 cellulase 활성이 최대 130% 증가하였다는 몇 가지 연구가 있다(Liu et al., 2012; Pham et al., 2012; Tao et al., 2010).

곤충은 발견된 종만 해도 300만종이 넘을 정도로 지구상에서 가장 다양한 생물군이기 때문에 곤충 유래의 cellulase를 효과적으로 탐색해나갈 수 있다. 이러한 연구의 발전을 위해서는 첫째, 재조합 MsGHF45의 수율을 증가시켜야 한다. 배양을 하는 동안의 열 충격이나 영양소의 제한성과 같은 스트레스 요인을 고려할 수 있다. 둘째, cellulase는 cellulose를 각각 단계적으로 가수분해 시키는 세 가지 유형이 존재한다(endo-glucanase, exo-glucanase,

cellobiase). 이 세 가지 유형을 모두 통합시키는 연구로 나아갈 수 있다. Cellulase의 세 가지 유형을 효과적으로 통합 발현시켜 효소의 활성 및 안정성을 증가시킨 몇몇 연구가 있다(Yamada et al., 2010; Yamada et al., 2011; Yanase et al., 2010). 셋째, 발효를 통해 생성된 alcohol의 양을 검출하여 수율을 높이는 연구로도 나아갈 수 있을 것이다.

본 연구와 같은 공시충인 북방수염하늘소가 지니는 또 다른 cellulase인 MsGHF5의 특성을 밝힌 연구가 있다(Ko et al. 2015). MsGHF5의 효소특성을 확인해 본 결과, 본 연구와 세부적인 결과는 달랐지만 대체로 비슷한 조건에서 최적 활성을 보이는 것을 볼 수 있다. 북방수염하늘소가 지니는 cellulase는 세 종류일 것이라 예상되며, 연구되지 않은 다른 한 종류 역시 비슷할 것으로 예상된다. 세 가지의 cellulase를 동시발현시켜 이후 바이오에탄올을 위한 biofuel 공정에 적용시킨다면 공정의 효율을 크게 높일 수 있을 것이다.

감사의 글

본 연구는 강원대학교의 지원을 받아 2014년도 연구보조비(C1010739-01-01)로 수행되었다.

References

Dresselhaus, M.S. and Thomas, I.L. 2001. Alternative energy technologies. Nature. 414: 332-337.

Fischer, R., Raluca, O., and Twyman, R.M. 2013. Cellulases from insects. Yellow Biotechnology II. Springer Berlin Heidelberg 136: 51-64.

Kim, N., Choo, Y.M., Lee, K.S., Hong, S.J., Seol, K.Y., Je, Y.H., Sohn, H.D., and Jin, B.R. 2008. Molecular cloning and characterization of a glycosyl hydrolase family 9 cellulase distributed throhout the digestive tract of the cricket *Teleogryllus emma*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 150.4: 368-376.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lee, S.J., Kim, S.R., Yoon, H.J., Kim, I., Lee, K.S., Je, Y.H., Lee, S.M., Seo, S.J., Sohn, H.D., and Jin, B.R. 2004. cDNA cloning, expression, and enzymatic activity of a cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. Comparative biochemistry and physiology, Part B. 139: 107-116.

Liu, D., Zhang, R., Yang, X., Zhang, Z., Song, S., Miao, Y., Shen, Q. 2012. Characterization of a thermostable β-glucosidase from *Aspergillus fumigatus* Z5, and its functional expression in *Pichia pastoris* X33. Microbial cell factories 11: 1-15.

Lynd, L.R., Cushman, J.H., Bichols, R.J., and Wyma, C.E. 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. Science 251: 1318-1323.

Maki, M., Kam, T.L., and Wensheng, Q. 2009. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. International Journal of Biological Sciences 5.5: 500.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sar. Analytical chemistry 31.3: 426-428.

Naika, G.S., Purnima, K., and Vishweshwaraiah, P. 2007. Purification and characterization of a new endoglucanase from *Aspergillus aculeatus*. Journal of agricultural and food chemistry 55.18: 7566-7572.

Ni, J., Tokuda, G., Takehara, M., and Watanabe, H. 2007. Heterologous expression and enzymatic characterization of ß-glucosidase from the drywood-eating termite, *Neotermes koshunensis*. Applied entomology and zoology 42: 457-463.

Pham, T.H., Quyen, D.T., and Nghiem, N.M. 2012. Purification and properties of an endoglucanase from *Aspergillus niger* VTCC-F021. Turkish journal of biology 36: 694-701.

Selten, G.C.M., Swinkels, B.W., and Van Gorcom, R.F.M. 2000. Selection marker gene free recombinant strains: method for obtaining them and the use of these strains. United States patent. 6,051,431.

Simura, M., Watanabe, H., Lo, N., and Saito, H. 2003. Purification, characterization, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a cellulase from the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacothea hilaris*. European fournal of biochemistry 270: 3455-3460.

Tao, Y.M., Zhu, X,Z., Huang, J.Z., Ma, S.J., Wu, X.B., Long, M.N., and Chen, Q.X. 2010. Purification and properties of endoglucanase from a ser cane bagasse hydrolyzing stain, *Aspergillus glaucuc* XC9. Journal of agricultural and food chemistry 58: 6126-6130.

Wei, Y.D., Lee, K.S., Gui, Z.Z., Yoon, H.J., Kim, I., Zhang, G.Z., Guo, X., Sohn, H.D., and Jin, B.R. 2006. Molecular cloning, expression, and enzymatic activity of a novel endogenous cellulase from the mulberry longicorn beetle, *Apriona germari*. Comparative biochemistry and physiology, Part B. 145: 748-756.

Willis, J.D., Oppert, C., and Jurat-fuentes, J.L. 2010. Methods for discovery and characterization of cellulytic enzymes from insects. Insect science 00: 1-15.

Wyman, C.E. 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. TRENDS in Biotechnology 25.4: 153-157.

Yamada, R., Taniguchi N., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. 2010. Cocktail d-integration: a novel method to construct cellulolytic enzyme expression ratio-opti-

mized yeast strains. Microbial Cell Factories 9: 30.

Yamada, R., Taniguchi N., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. 2011. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. Biotechnology for biofuels 4: 8.

Yanase, S., Hasunuma, T., Yamada, R., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., and Kondo, A. 2010. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. Applied Microbiology and Biotechnology 88: 381-388.

Zhou, X., Smith, J.A., Oi, F.M., Koehler, P.G., Bennett, G.W., and Scharf, M.E. 2007. Correlation of cellulase gene expression and cellulolytic activity throhout the gut of the termite *Reticulitermes flacipes*. Gene 395: 29-39.

(Received: February 15, 2016; Accepted: May 3, 2016)