

Pseudomonas sp. Endo-1,4- β -Glucanase와 β -1,4-Glucosidase 유전자의 대장균 및 효모에서 동시 발현

김양우 · 전성식 · 정영철¹ · 성낙계*
경상대학교 식품공학과, ¹진주전문대학 식품영양과

Simultaneous Expression of Pseudomonas sp. Endo-1,4- β -Glucanase and β -1,4-Glucosidase Gene in Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae

Yang-Woo Kim, Sung-Sik Chun, Young-Chul Chung¹ and Nack-Kie Sung*

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
¹Department of Food Nutrition, Chinju Junior College, Chinju 663-840, Korea

Abstract — We attempted simultaneous expression of genes coding for endoglucanase and β -glucosidase from *Pseudomonas* sp. by using a synthetic two-cistron system in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Two-cistron system, 5'-*tac* promoter-endoglucanase gene- β -glucosidase gene-3', 5'-*tac* promoter- β -glucosidase gene-endoglucanase gene-3' and 5'-*tac* promoter-endoglucanase gene-SD sequence- β -glucosidase gene-3, were constructed, and expressed in *E. coli* and *S. cerevisiae*. The *E. coli* and *S. cerevisiae* contained two-cistron system produced simultaneously endoglucanase and β -glucosidase. The recombinant genes contained the bacterial signal peptide sequence produced low level of endoglucanase and β -glucosidase in *S. cerevisiae* transformants: Approximately above 44% of two enzymes was localized in the intracellular fraction. The production of endoglucanase and β -glucosidase in yeast was not repressed in the presence of glucose or cellobiose. The yeast strain contained recombinant DNA with two genes hydrolyzed carboxymethyl cellulose, and these endoglucanase and β -glucosidase degraded CMC synergistically to glucose, cellobiose and oligosaccharide. This result suggests the possibility of the direct bioconversion of cellulose to ethanol by the recombinant yeast.

섬유성 물질로 부터 ethanol을 직접 생산하는 것은 재생자원과 에너지 생산비용의 절감에 잇점이 있어 섬유소 분해효소 생성균과 에탄올 생성균을 혼합배양하여 직접 생산하는 연구가 협기성이면서 효소분비능이 우수한 *Clostridium thermocellulum*에 ethanol 생성균인 *C. thermohydrosulfuricum*(1), *Thermoanaerobacter ethanolicus*(2), *Zymomonas* sp.(3) 등을 각각 첨가하여 동시발효를 시도하여 왔으나, 이때 β -glucosidase의 활성 부족으로 cellobiose의 축적을 야기시켜 β -glucanase 활성이 저해되는 단점이 지적되었다(4).

최근에는 cellulase 유전자가 많이 분리되어 ethanol 생산균에 이들 유전자를 직접 도입하는 실험이 *Zymomonas mobilis*(5)와 *Saccharomyces cerevisiae*(4-8) 등을 대상으로 진행되어 왔으나 몇 가지 문제점이 밝혀

Key words: *Pseudomonas* sp. endo-1,4- β -glucanase gene, β -1,4-glucosidase gene, simultaneous expression

*Corresponding author

졌다. Ethanol 생산과정에서 섬유소가 단당류 또는 oligosaccharide로 효율적으로 분해되기 위해서는 섬유소의 크기로 인하여 세포외로 cellulase의 분비가 필수적인 선결과제이다.

따라서 몇몇 연구자들은 변이주(9)와 signal peptide sequence(10, 11)를 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae*에서 cellulase의 분비에 성공한 결과를 보고 하였다. 특정 미생물에서 목적하는 몇개의 효소를 동시에 생산하면 발효비용이 크게 절감되기 때문에 목적하는 유전자를 인위적으로 연결하여 하나의 재조합체로부터 동시에 생산하는 연구가 섬유소의 생물 전환 공정에 적용된 바 있다. 즉 섬유소 분해효소 중에 endoglucanase와 β -glucosidase를 two-cistron system을 이용하여 대장균에 발현시켜 효소 생산단계를 절감하는 시도를 한 바 있는데(12), 만일 cellulase complex 모두가 ethanol 생성균주에 효율적으로 발현되어 분비가 용이하게 된다면 cellulase 생합성 대사 조절기구와 무관하게 섬유소로부터 ethanol 생산에

가장 실용적인 방법이 될 것으로 예상된다.

따라서 본 연구에서는 이미 클로닝된 *Pseudomonas* sp. 유래의 endoglucanase(13)와 β -glucosidase 유전자(14)를 two cistron system을 이용하여 *E. coli*와 *S. cerevisiae*에서 발현시켜 동시생산을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmids

E. coli JM109(15)[*recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE* 44, *relA*, (*lacZ*, *proAB*), (*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI^q*, *lacZΔM15*)]와 *S. cerevisiae* YIY345(7)(*a leu2 ura3 his4*)가 속주세포로 사용되었다.

*E. coli*의 클로닝 vector로는 pKK223-3(*amp^r*, *tac*) 그리고 이미 본 연구실에서 구축된 재조합 plasmid인 pKC10(endoglucanase, 13)과 pKKB10(β -glucosidase, 14), *S. cerevisiae*용 vector는 YEpl3(*amp^r*, *tet^r*, *leu2*)을 synthetic two cistron system에 각각 이용하였다.

배지 및 배양

*E. coli*의 배지 및 배양은 전보(14)와 같고, 효모는 YPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)배지를 이용하여 30°C에서 진탕배양을 행하였다.

효모의 선택적 배양을 위해 histidine(20 μ g/ml)이 첨가된 SD최소배지(16)가 사용되었으며, 이때 β -glucosidase 활성검색용 배지에는 1 mM p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG) 또는 0.5% CMC를, 그리고 필요에 따라 ampicillin(50 μ g/ml) 또는 tetracycline(50 μ g/ml)를 첨가하였다.

DNA 조작 및 two-cistron system의 구축

염색체 DNA 및 plasmid의 분리, DNA단편의 회수 및 정제, 그리고 cellulase 유전자 함유 형질전환체의 확인은 전보(13, 14)에서 언급한 방법과 동일하다.

Plasmid pKK223-3에 0.74 kb의 endoglucanase가 삽입된 pKC10과 동일 vector에 1.2 kb의 β -glucosidase 유전자가 삽입된 pKKB10 간의 two-cistron system 구축은 Fig. 1과 같다.

즉 pKC10과 pKKB10의 3'-말단에 *Xba*I linker를 각각 연결시켜 재조합 plasmid인 pKGE30과 pKEG40을 구축하였고, 그리고 two-cistron system 중에 β -glucosidase, endoglucanase 순서로 배열된 재조합체에서 endoglucanase 유전자의 SD sequence(AGA-GGT)를 염기치환시켜 얻어진 AGGAGGT를 함유한 pASS50(unpublished data)을 이용하여 β -glucosi-

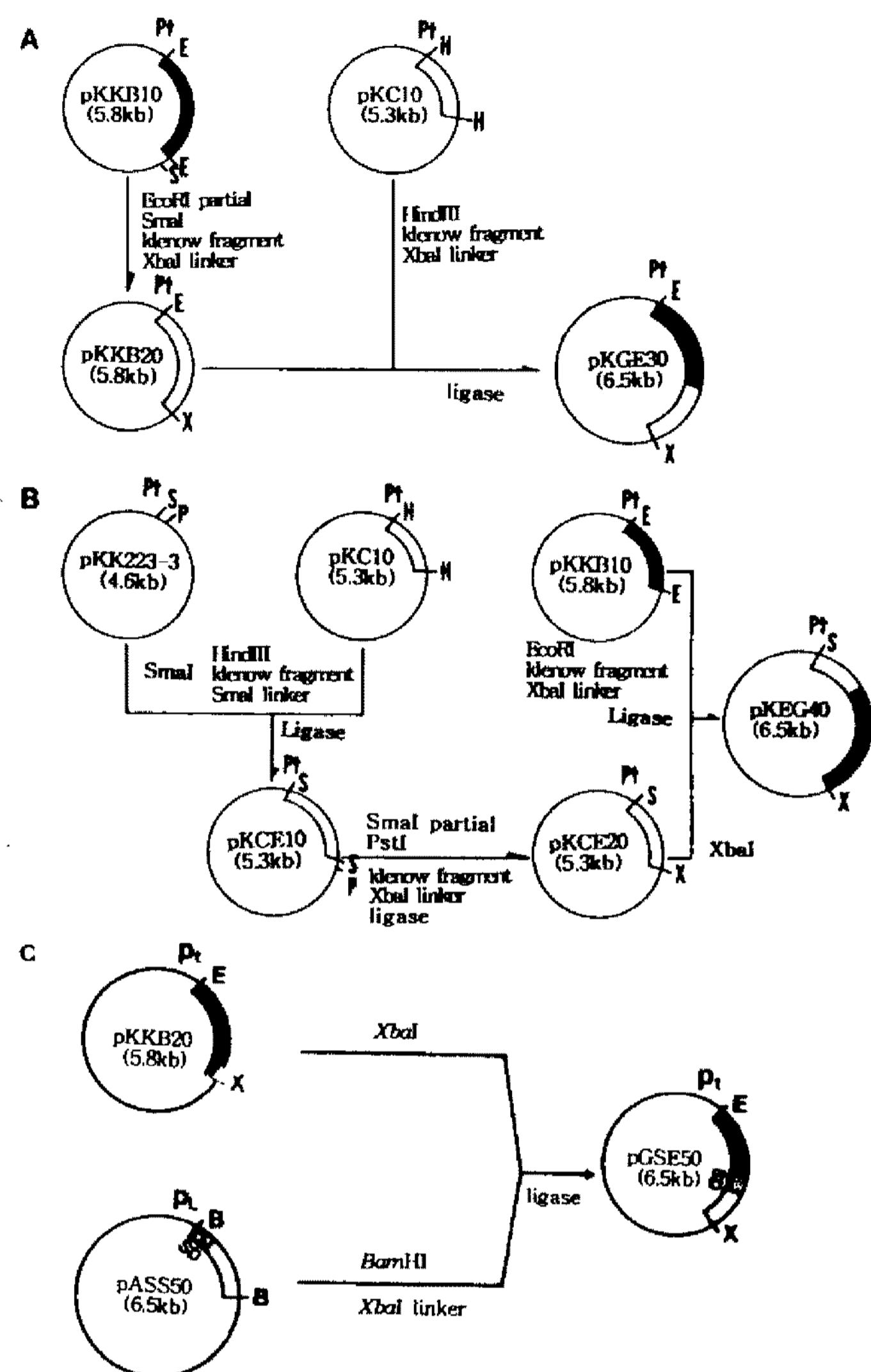


Fig. 1. Construction of recombinant plasmid pKGE30 (A), pKEG40(B), and pGSE50(C).
Endoglucanase and β -glucosidase genes are arranged in a two-cistron system: □, endoglucanase gene; ■, β -glucosidase gene; Pt, tac promoter; E, EcoRI; S, SmaI; H, HindIII; X, XbaI; P, PstI

dase, endoglucanase 순서로 배열하여 재조합 plasmid pGSE50을 구축하였다.

형질전환 및 전기영동

*E. coli*에로의 형질전환과 DNA 확인을 위한 gel electrophoresis는 Maniatis 방법(16), 그리고 *S. cerevisiae*에서의 형질전환은 Ishiguro 등(17)이 사용한 방법으로 행하였다. Endoglucanase와 β -glucosidase가 동시에 함유된 형질전환체의 분리는 CMC 또는 PNPG가 함유된 배지에서 동시에 양성반응을 나타내는 것을 선별하였다.

효소활성 및 localization

Endoglucanase와 β -glucosidase의 활성 측정은 전보(13, 14)에서 상술한 방법에 준하였다. 효모에서의 효소 분비능력은 Uozumi 등(10)이 사용한 방법으로 행하였는데, 즉 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 1.2M sorbitol이 함유된 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 0.5 ml에 혼탁하여 상온에서 5분간 방치한 후 6000×g에서 5분간 원심분리를 행한 균체를 다시 zymolyase 100T(0.5mg/ml)가 함유된 상기의 동일 buffer 0.1 ml에 재현탁하여 상온에서 5분간 방치한 다음 형성된 spheroplast를 다시 동일 buffer로 세척하여 얻어진 상등액을 periplasmic fraction으로 사용하였다.

그리고 상기의 균체를 10 mM EDTA(pH 7.0)이 함유된 동일 buffer 0.1 ml에 혼탁하여 spheroplast를 파괴시킨 다음 원심분리하여 얻어진 상등액을 cytosol fraction으로 하였다.

TLC

Endoglucanase 또는 β -glucosidase에 의한 각종 당의 가수분해 특징은 precoated silicagel plate(Kiesel gel 60 F254, Merck)를 사용하여 TLC로 확인하였으며 이때 전기용매는 n-butanol-methanol-water(4 : 2 : 1, v/v)를 사용하여 이중 전개시켰으며 발색은 Pastudska(18)의 방법으로 행하였다.

단백질 측정

효소액 중의 단백질량은 BSA protein assay kit (Pierce Chemical Co.)를 사용하여 측정하였으며 bovine serum albumin이 표준물질로 사용되었다.

결과 및 고찰

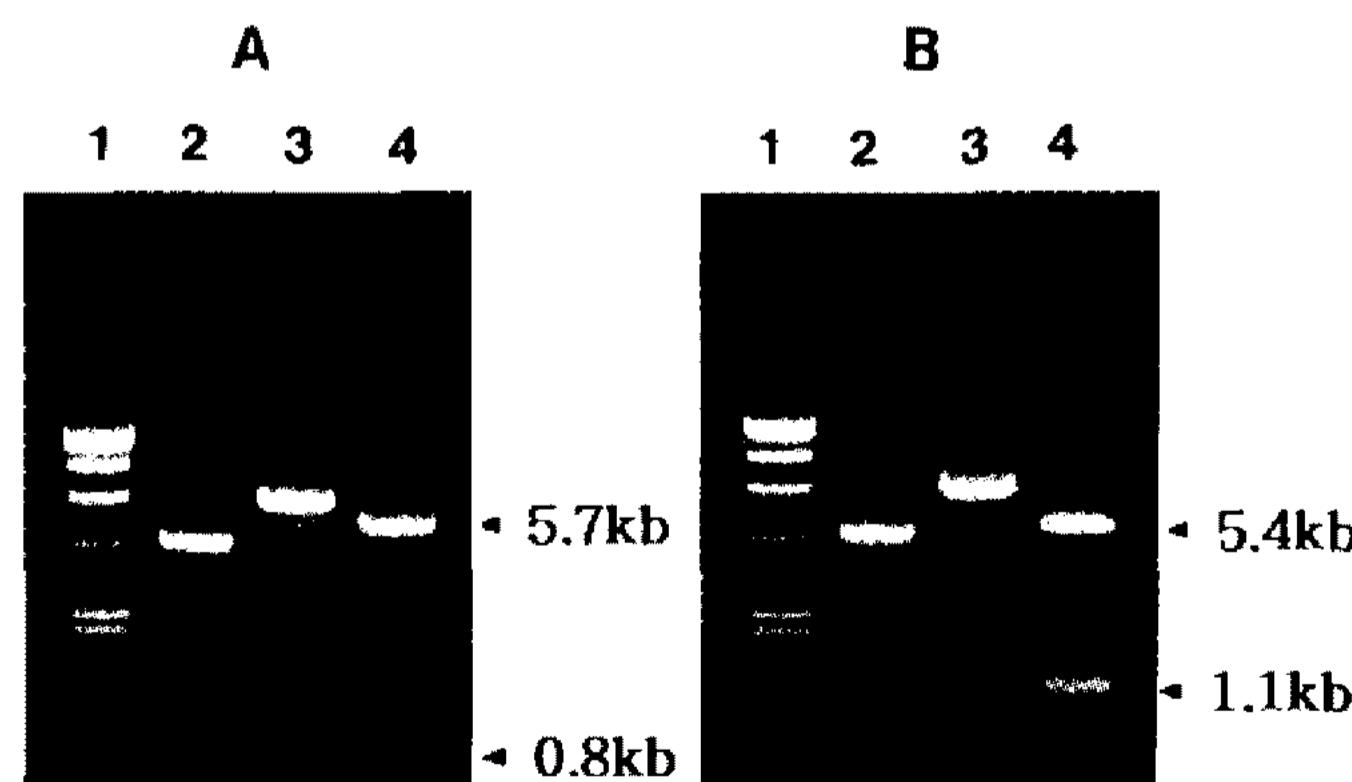


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of pKGE30 (A) and pKEG40(B).
 (A) Lane; 1, λ DNA/HindIII; 2, pKK223-3/EcoRI; 3, pKGE30/PstI; 4, pKGE30/SacI.
 (B) Lane; 1, λ DNA/HindIII; 2 pKK223-3/EcoRI; 3, pKEG40/PvuI; 4, pKEG40/SacI

Endoglucanase 및 β -glucosidase 유전자의 *E. coli*에서의 동시발현

본 연구실에서 분리된 *Pseudomonas* sp. 유래의 0.74 kb endoglucanase 유전자(13)와 1.2 kb β -glucosidase 유전자(14)를 two-cistron system 즉, 5'-*tac* promoter--endoglucanase gene-- β -glucosidase gene---3' 또는 5'-*tac* promoter-- β -glucosidase gene--endoglucanase gene---3'으로 연결하여 *E. coli* 발현 벡터인 pKK223-3에 Fig. 1과 같이 subcloning하여 각각 재조합 plasmid pKEG40과 pKGE30을 얻었는데, 이와 같은 two-cistron 구축 결과는 agarose 전기영동으로 확인하였다(Fig. 2).

재조합 plasmid pKGE30 또는 pKEG40을 함유하고 있는 *E. coli* JM109를 최소배지에서 배양한 다음 LB배지에 접종하여 배양 1시간 후에 1 mM IPTG로 유도시켰을 때 pKEG40이 pKGE30에 비하여 endoglucanase의 발현이 다소 용이하게 일어났다.

두개의 재조합 plasmid 모두에서 *tac* promoter downstream 바로 다음에 연결된 유전자의 발현이 우수한 것으로 나타났는데 이런 결과는 빠른 전사속도에 기인되는 것으로 추측된다.

염기치환된 SD sequence를 이용한 *E. coli*에서의 발현량 증대

Endoglucanase 유전자의 SD sequence(AGAGGT)

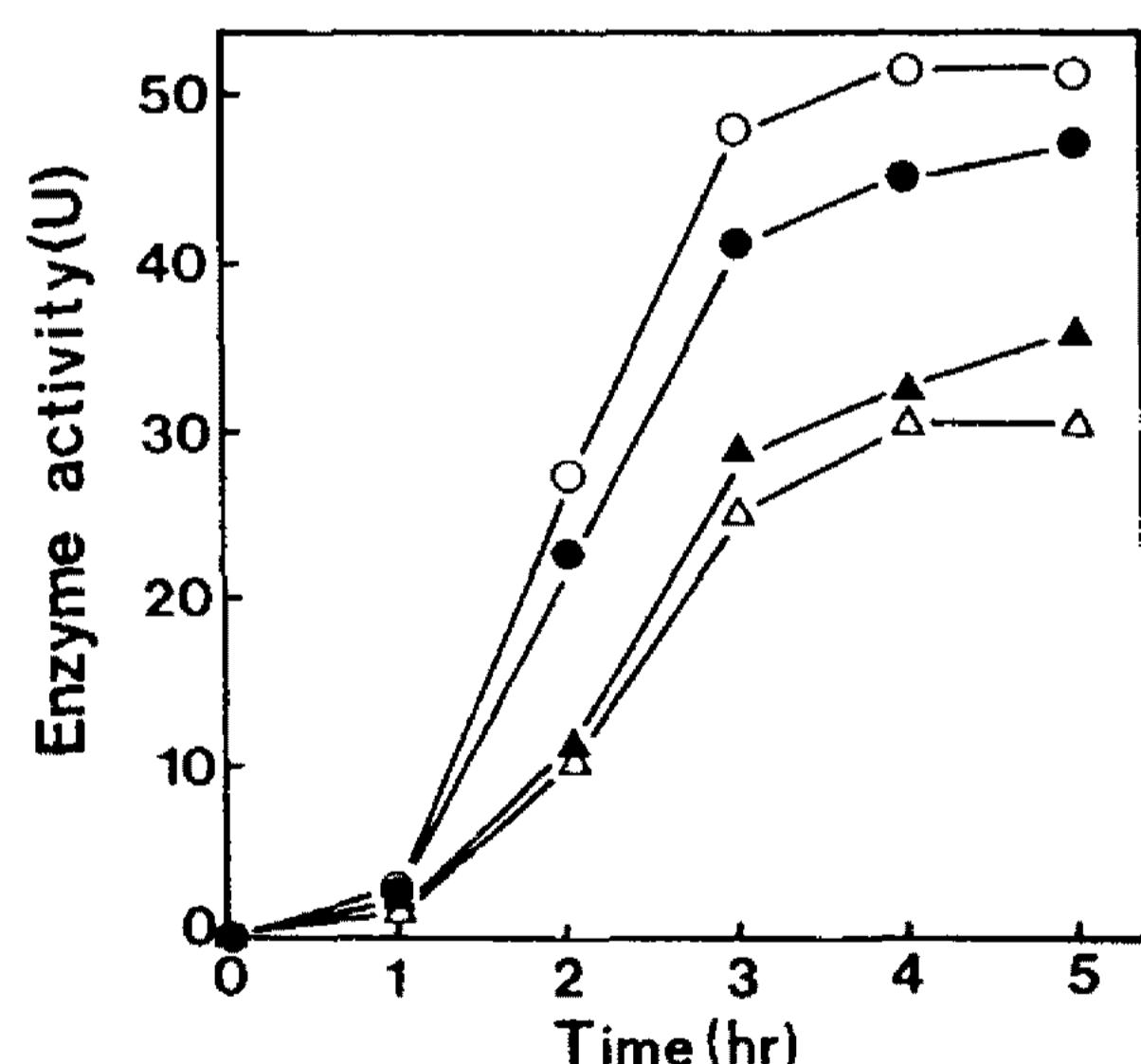


Fig. 3. Production of endoglucanase and β -glucosidase by *E. coli* JM109 strains carrying two-cistron systems. The strains were grown in LB medium at 37°C for total enzyme activities.
 Symbols: Endoglucanase activities of pKEG40 (○) and pKGE30 (●), β -glucosidase activities of pKEG40 (△) and pKGE30 (▲)

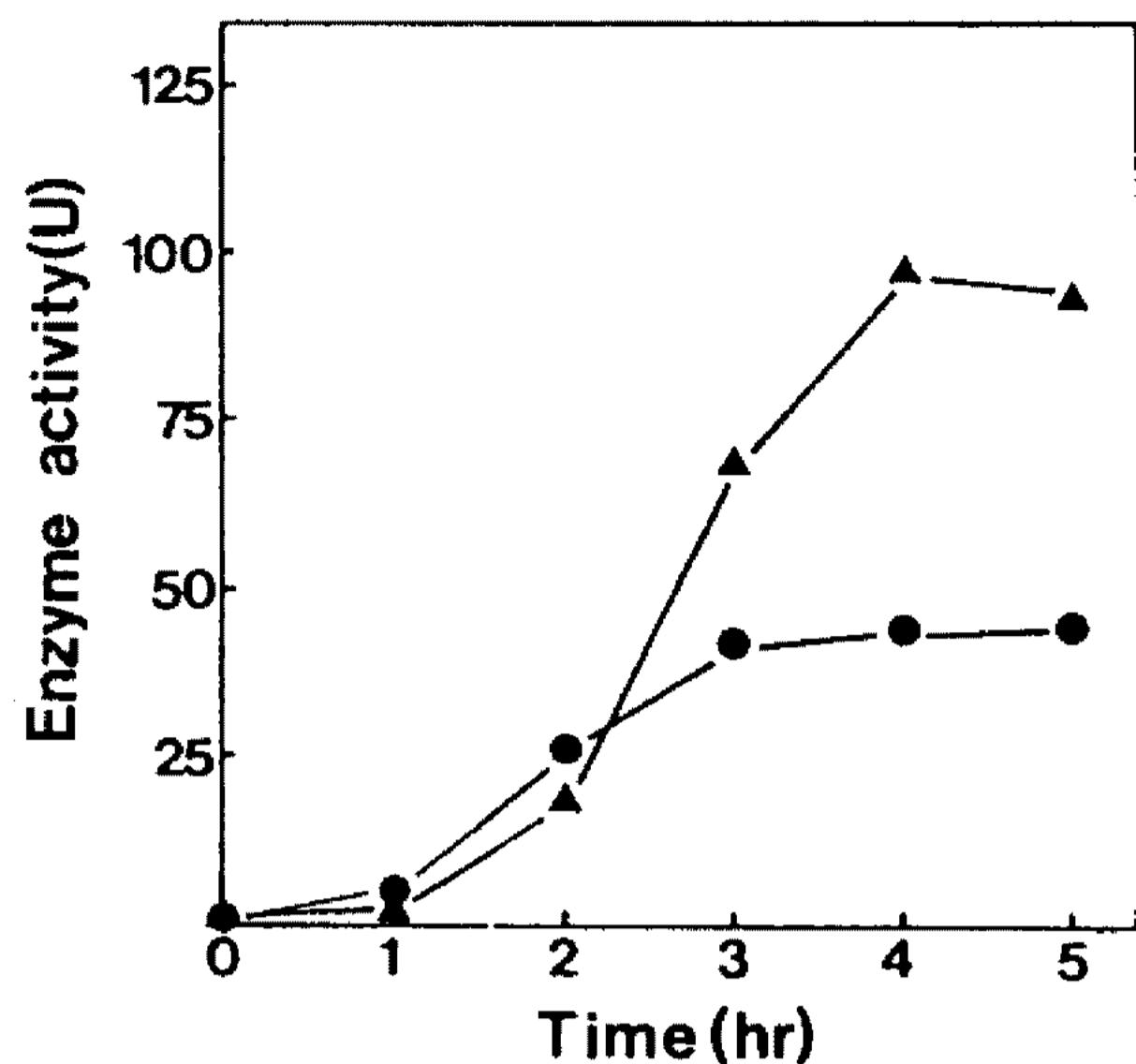


Fig. 4. Production of endoglucanase and β -glucosidase by SD sequence in two-cistron system.

E. coli JM109 cells harboring plasmid pGSE50 were grown in LB medium at 37°C and induced with IPTG after 1 hr incubation.

Symbols: Endoglucanase activity (●) and β -glucosidase activity (▲)

Table 1. Enzyme activities in *S. cerevisiae* transformants^a

| Plasmid | Activities (U) | |
|---------|----------------|----------------------|
| | Endoglucanase | β -Glucosidase |
| YEG 60 | 7.4 | 3.5 |
| YGSE 70 | 7.1 | 4.8 |

^a *S. cerevisiae* transformants carrying YEG60 or YGSE70 were cultured with shaking in YPD medium for 3 days. Culture fluids were dialyzed extensively against deionized water at 4°C to remove residual glucose and assayed for enzyme activity.

를 염기치환 시켜 얻어진 AGGAGGT를 함유한 pASS50(unpublished data)을 이용하여 β -glucosidase, endoglucanase 순서로 배열하여 Fig. 1과 같이 재조합 plasmid pGSE50을 구축한 다음 *E. coli*에서 IPTG로 유도시켜 효소활성을 조사하였다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 SD sequence의 치환은 endoglucanase의 생성능을 SD sequence가 존재하지 않는 pKGE30에 비하여 4배 이상 증가시켰으나, β -glucosidase 활성은 변화가 거의 없었다. 이와 같이 두개의 유전자 사이에 SD sequence의 삽입은 두번째 cistron의 전사효율을 용이하게 하여 결국 효소 생성능을 증가시키는 것으로 생각되는데, 이와 유사한 결과는 β -glucosidase(12), rat interferon(19) 및 *trpA* gene(20)에서도 보고 된 바 있다.

Table 2. Subcellular distribution of endoglucanase and β -glucosidase in *S. cerevisiae* YIY345^a/YEG60 or YGSE70

| Culture fraction | Endoglucanase activity (U) | | β -glucosidase activity (U) | |
|--------------------|----------------------------|--------|-----------------------------------|--------|
| | YEG60 | YGSE70 | YEG60 | YGSE70 |
| Cytosol | 13.9 | 13.2 | 10.3 | 13.4 |
| Periplasmic space | 10.4 | 9.2 | 6.4 | 5.6 |
| Supernatant | 7.4 | 7.1 | 3.5 | 4.8 |
| Total activity (U) | 31.7 | 29.5 | 20.2 | 23.8 |

^a *S. cerevisiae* transformants were cultured with shaking in YPD medium for 3 days.

*S. cerevisiae*에서의 발현

pKGE30과 pGSE50의 two cistron system 양쪽 끝에 *Bam*HI linker를 연결시켜 *E. coli*-*S. cerevisiae* shuttle vector인 YEp13의 *Bam*HI 부위에 subcloning을 행하여 각각 재조합체 YEG6과 YGSE70을 얻었다. 이것을 *S. cerevisiae* YIY 345에 형질전환 시켜 YPD배지에서 세포외 효소 생성능을 조사하였다(Table 1).

Plasmid YEG60을 함유하고 있는 *S. cerevisiae*에서 두 효소의 분비능력은 *E. coli*에서 보다 약 7~8배 낮게 나타났으며, *E. coli*의 SD sequence가 삽입된 YGSE70에서도 β -glucosidase의 분비능이 매우 낮게 검출되는 것으로 보아 *Pseudomonas* sp. 유래의 효소는 효모에서 발현과 분비가 용이하지 않는 것으로 사료된다.

효모 유래의 β -glucosidase 유전자(7, 8)와는 다르게 *Cellulomonas fimi*의 endoglucanase 유전자(21), 고온성 세균 유래의 cellobiohydrolase 유전자(10)는 효모에서 발현 및 분비가 용이하지 못하고 효모 promoter, signal peptide 및 T-S region이 모두 존재해야만 분비능이 우수하다는 결과가 보고된 바 있다.

효소활성의 localization

S. cerevisiae 형질전환체(YGE60 또는 YESG70)의 세포외 효소활성이 *E. coli*에 비하여 매우 낮았기 때문에(Table 2), YPD배지에서 30°C, 3일간 배양한 후 cytosol, periplasmic space 및 배지내 효소활성을 조

Table 3. Effect of carbon sources on final cell mass, and endoglucanase and β -glucosidase activities in *S. cerevisiae* transformant/YEG60

| Carbon source | Cell mass (O.D ₆₆₀) | Activities ^a (U) | |
|--------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| | | Endoglucanase | β -Glucosidase |
| YP ^b | 1.5 | 1.8 | 0.7 |
| YP + 1% Glucose | 6.3 | 30.4 | 18.8 |
| YP + 2% Glucose | 7.1 | 31.7 | 20.2 |
| YP + 1% Cellobiose | 2.6 | 16.2 | 7.1 |
| YP + 1% CMC | 2.2 | 14.0 | 6.2 |

^a Enzyme activities were represented as total activity.

^b Abbreviations: Y, 1% yeast extract; P, 2% peptone. *S. cerevisiae* transformants were cultured with shaking for 3 days in YP medium containing various carbon sources.

Culture fluids were dialyzed extensively against deionized water and assayed for enzyme activity.

사한 결과는 Table 2와 같다. 형질전환체와 관계 없이 endoglucanase는 44%, β -glucosidase는 51~56% 정도가 세포질에 존재하였고 세포외로 분비되는 비율은 각각 23%, 17%에 불과하였다. 또한 total activity도 *E. coli*에 비하여 1.5~2배 정도 낮게 나타나 *Pseudomonas*속 cellulase gene은 효모에서 발현 및 분비가 용이하지 못함을 알 수 있었다(9, 10, 21).

탄소원에 따른 효소 생합성능

Pseudomonas sp. cellulase의 생합성은 여러 대사 조절기구하에 있으나, *E. coli*에 cloning된 endoglucanase와 β -glucosidase는 glucose, cellobiose에 의해 활성이 저해되지 않음을 확인할 수 있다(13, 14). Two-cistron system을 함유하고 있는 *S. cerevisiae* 형질전환체에서도 이런 효과가 존재하는지를 탄소원에 따라 조사하였다(Table 3).

S. cerevisiae/YEG60을 YP배지에 탄소원과 그 농도를 달리하여 첨가하였을 때 2% glucose가 함유된 YP배지에서 효소활성이 가장 높았고, *S. cerevisiae*가 거의 자화할 수 없는 cellobiose와 CMC에서도 효소활성이 검출되었다.

상기의 결과와 glucose농도에 무관하게 효소활성이 증가하는 것으로 보아 glucose에 의한 catabolite repression, end product inhibition 등의 대사조절기구가 해제된 것으로 생각되며(4, 10, 22) 이런 특성은 효모에서 cellulase 생산에 잇점이 있다.

CMC 가수분해능

탄소원으로 2% CMC만 함유된 YP배지에서 형질

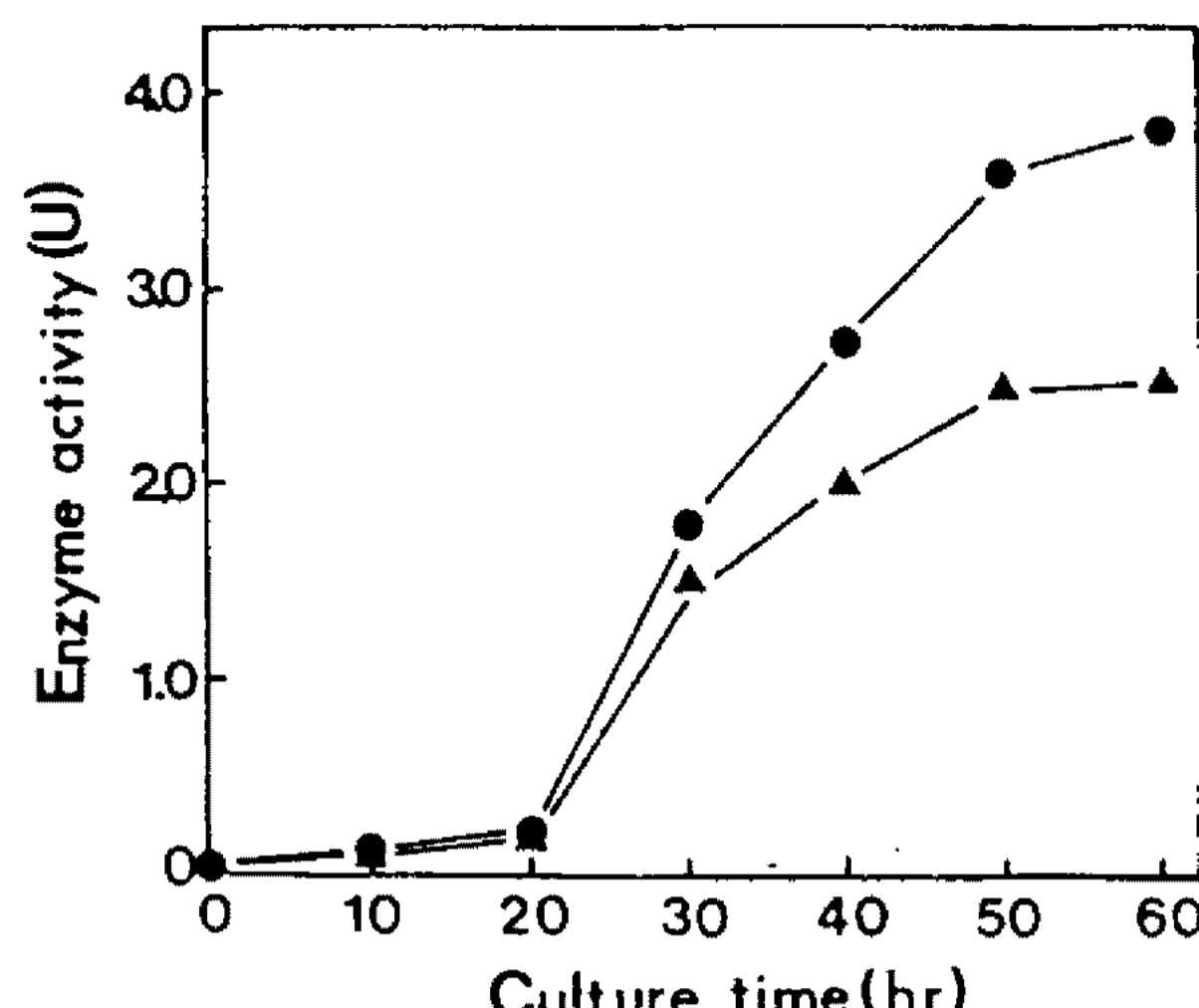


Fig. 5. Endoglucanase and β -glucosidase activities in the CMC medium of *S. cerevisiae*/YEG60.
Strains were cultured with shaking in YP medium containing 2% CMC.

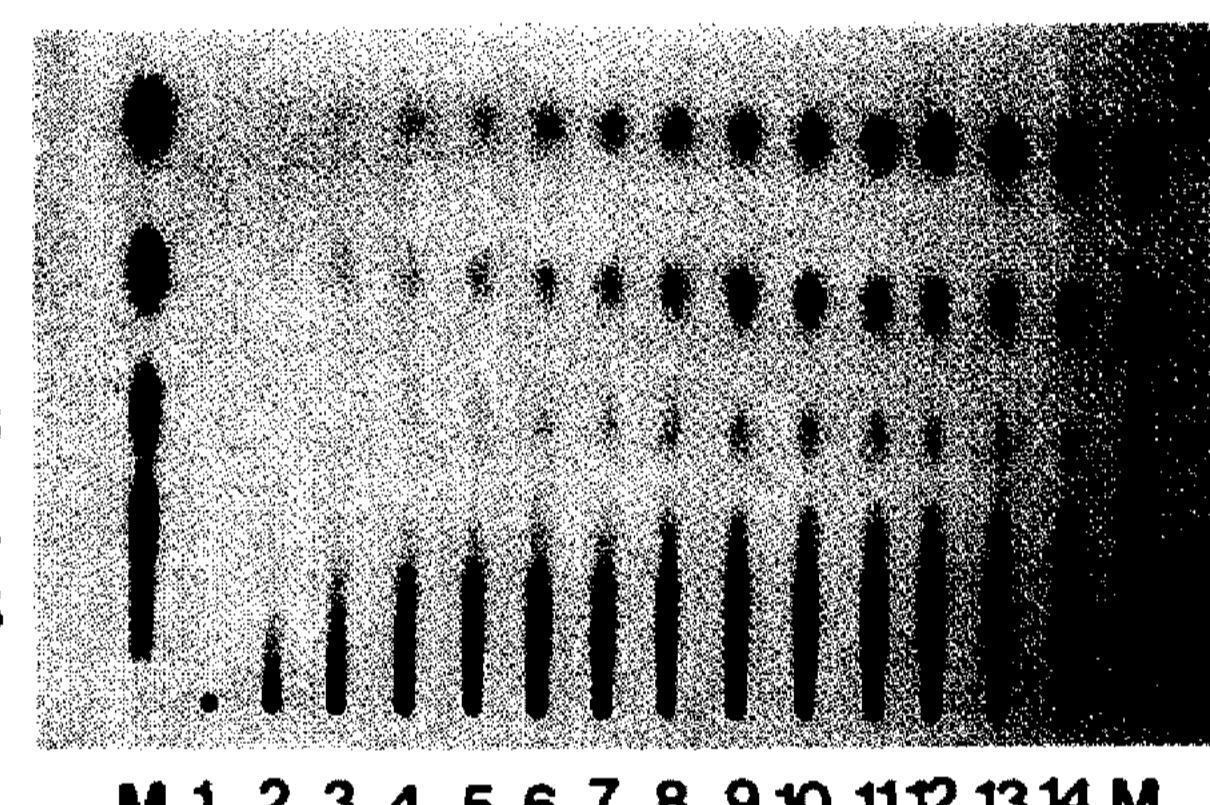


Fig. 6. Time course of CMC hydrolysis by endoglucanase and β -glucosidase.

Samples were incubated at 30°C for 0 min (lane 1), 30 min (lane 2), 60 min (lane 3), 90 min (lane 4), 120 min (lane 5), 150 min (lane 6), 180 min (lane 7), 210 min (lane 8), 240 min (lane 9), 270 min (lane 10), 300 min (lane 11), 330 min (lane 12), 360 min (lane 13), 390 min (lane 14), and standard marker (lane M).

전환체 *S. cerevisiae*/YEG60을 시간별로 진탕 배양하면서 유리된 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

*S. cerevisiae*는 CMC를 거의 이용하지 못하나, YEG 60이 함유된 형질전환체 *S. cerevisiae*는 CMC가 존재하지 않은 YP배지 보다 CMC를 용이하게 분해하여 단당류 또는 oligosaccharide를 에너지원으로 이용하여 효소 분비가 있음이 관찰되었다. 따라서 상기의 배양액을 원심분리하여 상등액을 2차 증류수로 투석한 후 잔당을 제거한 다음 농축한 액을 조효소액으로 하여 2% CMC 용액과 혼합하여 시간별로 반응시켜 유리된 생성물을 TLC로 확인하였다(Fig. 6).

반응시간에 따라 CMC는 glucose, cellobiose 및 oligosaccharide로 분해됨을 확인할 수 있었고 특히 glucose가 가장 많이 생성되는 것으로 보아 β -glucosidase와 endoglucanase의 synergistic action이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아 endoglucanase와 β -glucosidase의 two cistron system에 의한 *S. cerevisiae*에서의 발현은 섬유소로부터 직접 ethanol 생산에 적용할 가능성이 있음이 제시된 것이다(5, 8, 10).

요 약

Two-cistron system을 이용하여 endoglucanase와 β -glucosidase를 *E. coli* 또는 *S. cerevisiae*에서 동시에 생산을 시도하였다.

3종류의 two-cistron system, 5'-*tac* promoter---endoglucanase gene--- β -glucosidase gene---3' 또는 5'-*tac* promoter--- β -glucosidase gene---endoglucanase gene---3' 및 5'-*tac* promoter---endoglucanase gene---SD--- β -glucosidase gene---3'를 구축하여 대장균과 효모에서 발현시켰을 때 두 종류의 효소가 동시에 생산되었으며, 효모에서는 대장균에 비하여 7~8배 정도 활성이 낮았고 또한 생성된 효소의 44% 이상이 세포질에 존재하였다.

이들 재조합 DNA를 함유하고 있는 효모에서 endoglucanase 또는 β -glucosidase의 생합성은 glucose 또는 cellobiose에 의해 저해되지 않았으며, 이 효모 배양액은 두 효소의 synergistic action으로 CMC를 glucose, cellobiose, oligosaccharide로 효율적으로 분해시켰다.

이런 결과는 형질전환체 효모를 이용하면 섬유질로부터 ethanol을 직접 생산할 수 있다는 것을 제시해 준다.

감사의 말

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

참고문헌

- Ng, T.K., A. Ben-Bassatt, and J.G. Zeikus. 1981. Ethanol production using thermophilic bacteria: fermentation of cellulosic substrates by co-cultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermohydrosulfuricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 1337-1343.
- Slapeck, G.E., I. Russel, and G.G. Stewart. 1987. Thermophilic microbes in ethanol production. *CRC Press*, Miami.
- Saddler, J.N. and MK-H. Chan. 1982. *Clostridium thermocellum* growth on cellulose and pretreated wood substrates. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 99-104.
- Leclerc, M., P. Chemardin, A. Arnaud, R. Ratnayake, P. Galzy, C. Gerbaud, and A. Raynal. 1986. Biosynthesis regulation of the β -glucosidase produced by a yeast strain transformed by genetic engineering. *Arch. Microbiol.* **146**: 115-117.
- Delaney, P.S.F. and P.L. Rogers. 1989. Cloning and expression of a β -glucosidase gene from *Xanthomonas albitineans* in *Escherichia coli* and *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.* **9**: 139-152.
- Kohchi, C. and A. Tohe. 1985. Nucleotide sequence of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene. *Nucleic Acid Res.* **13**(17): 6273-6282.
- Machida, M., I. Ohtsuki, S. Fukui, and I. Yamashita. 1988. Nucleotide sequence of *Saccharomyces fibuligera* genes for extracellular β -glucosidase as expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(12): 3147-3155.
- Raynal, A. and M. Guerineau. 1984. Cloning and expression of the structural gene for β -glucosidase of *Kluyveromyces fragilis* in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 108-115.
- Sakai, A., K. Suzuki, and S. Fukui. 1985. Isolation and characterization of mutants which show an oversecretion phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **119**: 499-506.
- Uozumi, N., A. Hayashi, T. Ito, A. Pathra, I. Yamashita, S. Iijima, and T. Kobayashi. 1993. Secretion of thermophilic bacterial cellobiohydrolase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**(6): 399-404.
- Yamashita, I., K. Suzuki, and S. Fukui. 1986. Proteolytic processing of glucoamylase in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 475-482.
- Yoo, Y.D. and M.Y. Park. 1992. Simultaneous production of endoglucanase and β -glucosidase using synthetic two cistron genes. *Biotechnol. Lett.* **14**(2): 77-82.
- Chung, Y.C., Y.W. Kim, S.K. Kang, J.S. Rho, and N.K. Sung. 1990. Molecular cloning and expression of cellulase gene of *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **18**(6): 633-639.
- Kim, Y.W., S.S. Chun, S.J. Kim, Y.C. Chung and N.K. Sung. 1993. Cloning and expression of β -1,4-glucosidase gene from *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Appl. Mi-*

- crobiol. Biotechnol.* **21**(2): 113-118.
- 15. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.
 - 16. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 - 17. Ishiguro, M., R. Akada, O. Nimi, and I. Yamashita. 1989. A dominant mutation which suppresses deletion mutations in the secretory signal sequences of glucoamylase from the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *Appl. Environ. Micron. Microbiol.* **53**: 3169-3172.
 - 18. Pastuska, G. 1961. Untersuchungen über die quantitative und quantitative Bestimmung der Zucker mit Hilfe der Kieselgel schicht chromatographie.
 - 19. Spanjaard, R.A. and J.V. Duin. 1989. Translational reinitiation in the presence and absence of a Shine Dalgarno sequence. *Nucleic Acids Res.* **17** (14): 5501-5507.
 - 20. Das, A. and C. Yanofsky. 1984. A ribosomal binding site sequence is necessary for efficient expression of the distal gene of a translationally-coupled gene pair. *Nucleic Acids Res.* **12**(11): 4757-4768.
 - 21. Skipper, N., M. Sutherland, and R.W. Davies. 1985. Secretion of a bacterial cellulase by yeast. *Science* **230**: 958-960.
 - 22. Smith, B.J. and J.M. Leatherwood. 1976. Derepressed synthesis of cellulase by *Cellulomonas*. *J. Bacteriol.* **128**(2): 609-615.

(Received 23 March 1995)