

Aspergillus niger SFN-416으로부터 생산한 β -Glucosidase의 정제 및 특성

성찬기¹ · 이상원² · 박석규^{3*} · 박정로³ · 문일식⁴

¹중앙대학교 화학과, ²진주산업대학교 미생물공학과, 순천대학교 ³식품영양학과 · ⁴화학공학과

Purification and Characterization of β -Glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416. Chan-Ki Sung¹, Sang-Won Lee², Seok-Kyu Park^{3*}, Jeong-Ro Park³ and Il-Shik Moon⁴. ¹Department of Chemistry, Chung-Ang University, Seoul, 156-757, Korea, ²Department of Microbiological Engineering, Chonju National University, Chonju, 600-758, Korea, ³Department of Food and Nutrition, ⁴Department of Chemical Engineering, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea. - β -Glucosidase (EC 3.2.1.21) was purified from *Aspergillus niger* SFN-416 by a sequential process of ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-100 and DEAE-Sephacel column chromatography. Molecular weight of the enzyme was 46,000 daltons. The K_m and V_{max} values for PNPG were 0.67 mM and 25 moles/ml · min., respectively. The optimum pH and temperature of the enzyme activity were 3.5 and 58°C, respectively. The enzyme activity was decreased by addition of metal ions, and increased by addition of methanol, ethanol, isopropanol and 1-butanol at a concentration of 10% (v/v). Stability of the enzyme was increased by addition of isopropanol and 1-butanol at a concentration of 10% (v/v).

광합성 작용에 의해 매년 지구상에 가장 풍부하게 생산되고 있는 섬유성 biomass인 cellulose를 oligosaccharide 또는 당당류로 분해시켜 대체 에너지 등의 유용물질로의 산업적 생산을 가능하게 하는데, 가장 큰 난점은 당화경비 및 당화액 중에 발효성 당의 함량이 문제로 지적되고 있다. 미생물 효소를 이용하는 생물학적 가수분해법(1, 2)은 물리화학적 방법(3-5)에 비하여 상온상압에서 가수분해가 가능하고 효소의 특성으로 부산물이 생성되지 않는 장점 때문에 많은 연구가 되고 있으나 효소의 생산단가가 전공정의 40~60% 이상을 차지하는 문제점이 있다(6, 7). 따라서 cellobiose, celooligosaccharide 및 지구상에 많이 존재하는 결정성 cellulose를 소량의 물이 포함된 유기용매계에서 효소로서 가수분해시켜 glucose로 빠르게 전환시키려면 β -glucosidase활성이 강한 cellulase system이 필요하게 된다(8). 지금까지 cellulase를 생산하는 곰팡이로는 *Trichoderma*속이 가장 널리 알려져 있으나, 이는 섬유소 당화효소 중의 하나인 exo- β -1,4-glucanase(C_1)의 활성을 억제하는 cellobiose를 많이 분해하지 않는 것으로 알려져 있다(8, 9). 자연계로부터 유기용매에 비교적 안정한 β -glucosidase(β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)를 우수하게 생산하는 균주로서 *Aspergillus niger* SFN-416을 분리·동정한 바 있다(10). 따라서 본 연구에서는 *Aspergillus*

niger SFN-416으로부터 생산된 비교적 유기용매에 안정한 것으로 알려진 β -glucosidase를 분리·정제하여 이화학적 특성과 유기용매에서의 안정성을 조사하였다.

재료 및 방법

재 료

공시균주는 순천대학교 공업기술연구소에 보관중인 *Aspergillus niger* SFN-416(10)을 사용하였다.

시약으로 p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG), coomassie brilliant blue R-250 등은 Fluka Chemie (Switzerland)제품을, p-nitrophenol(PNP), Sephadex G-100, bovine serum albumin 등은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, U.S.A.) 제품을, DEAE-Sephacel은 Pharmacia Fine Chemicals(Uppsala, Sweden) 제품을, standard marker protein은 BIO-RAD(Richmond, CA, U.S.A.) 제품을 사용하였다. 이외의 다른 시약도 특급을 사용하였다.

pH 미터기는 ORION model 520A(Boston, MA, U.S.A.)를, 냉동원심분리기는 Vision Scientific Co model VS-15-CF(Seoul, Korea)를, UV/VIS Spectrophotometer는 Hewlett Packard 8452A(Palo Alto CA, U.S.A.)를 사용하였다.

배 지

보존 및 포자형성용 배지는 각각 potato dextrose agar(PDA) 및 malt extract agar(MEA) 배지를 사용하

*Corresponding author

Tel. 82-2-661-3652, Fax. 82-2-661-3652

Key words: *Aspergillus niger*, β -glucosidase, Purification, Characterization

였으며, 효소생성의 기본배지(6)는 KH_2PO_4 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, urea 0.3 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, Bacto peptone 1.0 g, CMC 10.0 g, trace solution 1.0 ml($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.16%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14%, CoCl_2 0.2%), tween 80 2.0 g, DW 1.0 L로 조제하여 사용하였다.

균주 배양 및 조효소액 조제

효소 생산용 액체배지 10 ml를 L-type 시험관에 넣어 살균(121°C, 10 min)하고, 포자현탁액 0.5 ml를 무균상 내에서 접종하여 30°C에서 5일 동안 진탕배양(120 rpm, stirrer 5.4 cm)한 다음, 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 20 min)한 후, 그 상층액을 -20°C로 냉각시킨 ethanol를 가하여 얻은, 70% ethanol(v/v)침전물을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)에 용해시켜 조효소로 사용하였다.

활성도 및 단백질 정량

효소 활성 측정은 Kohchi법(11)에 따라 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 용해한 4 mM p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG) 1 ml를 효소와 혼합한 다음, 37°C에서 20분간 반응시키고, 0.5 M Na_2CO_3 2 ml를 가하여 반응을 정지시킨 후, 발색된 황색의 흡광도를 400 nm에서 측정하였다. 유리된 p-nitrophenol (PNP)을 표준곡선에서 정량하였으며, 효소활성 unit는 $\mu\text{moles-PNP/ml} \cdot \text{min}$ 으로 표시하였다.

단백질의 농도는 Lowry(12) 등의 방법에 따라 측정하였으며, 이 때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 작성하여 정량하였다.

정 제

조효소를 4°C에서 ammonium sulfate로 30% 포화시켜 1시간 동안 방치시킨 후, 8,000 rpm에서 10분동안 원심분리하고 상층액을 모아 4°C에서 ammonium sulfate로 90% 포화시켜 하룻 밤 방치시킨 후, 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)으로 용해시켰다.

Sephadex G-100을 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 상온에서 72시간동안 부풀린 후 분류관(10×900 mm)에 충전시키고 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 평형시킨 후, ammonium sulfate(30~90%)로 포화시켜 부분 정제된 효소를 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 용출시켰다. 이 때 유출속도는 자연유속으로 하였고, 용출액은 3 ml씩 각 시험관에 받았다. 이의 각 용출액은 280 nm에서 단백질을 확인하였고, 이어서 400 nm에서 효소 활성도를 측정하는 다음, 활성도가 큰 부분만을 모아 냉동건조기

로 농축시켜 다음 정제과정의 효소시료로 사용하였다.

DEAE-Sephacel은 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)으로 씻은 다음, 분류관(150×280 mm)에 충전시키고 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)로 평형을 유지시켰다. 이 분류관은 Sephadex G-100 column chromatography에 의하여 모은 효소시료를 흡착시킨 후 0~0.5 M NaCl로 linear gradient하여 용출시켰다. 이 때 용출속도는 15 ml/hr로 하였고, 용출액은 3 ml씩 각 시험관에 모아졌고, 이의 각 용출액은 단백질과 효소의 활성도를 측정하는 다음, 활성도가 큰 분획만을 모아 이를 정제된 효소액으로 사용하였다.

분자량 측정

정제된 효소의 순도 및 분자량을 측정하기 위해서 SDS-polyacrylamide slab gel 전기영동을 Laemmli의 방법(13)으로 행하였다. 이 때 10% polyacrylamide gel을 사용하여 25mA로 3시간 동안 전기영동하였다. 영동이 끝난 gel은 0.25% coomassie brilliant blue R-250으로 염색한 다음 탈색시켜 정제상태와 분자량을 관찰하였다.

분자량을 결정하기 위하여 표준단백질을 함께 전기영동하여 그들의 상대적 이동거리의 값으로 표준곡선을 작성하여 분자량을 결정하였다. 표준단백질로는 ovalbumin (45,000 daltons), bovine serum albumin(66,200 daltons), phosphorylase B(97,400 daltons), β -galactosidase(116,250 daltons), myosin(200,000 daltons)을 사용하였다.

결 과

β -Glucosidase의 정제

Aspergillus niger SFN-416으로부터 생성한 β -glucosidase는 -20°C로 냉각시킨 ethanol를 가하여, 70% ethanol(v/v)침전물을 얻었다.

이 침전물에 0.02 M acetate buffer(pH 4.0)에 용해시킨 후 ammonium sulfate (30~90%)로 포화시켜 얻은 효소시료를 Sephadex G-100 column chromatography와 DEAE-Sephacel column chromatography를 하여, Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 효소활성을 나타내었다.

Table 1에 나타낸 바와 같이, 정제 단계별 specific activity는 조효소에서 21.5 units/mg protein 이었으며, ammonium sulfate에 의한 침전법으로는 32.4 units/mg protein으로 조효소에 비해 1.5배 정제되었다. 그리고 Sephadex G-100에 의해서는 specific activity가 137.1 units/mg protein 으로 6.4배, DEAE-Sephacel에 의해서는 705.4 units/mg protein으로 32.8배 정제되었

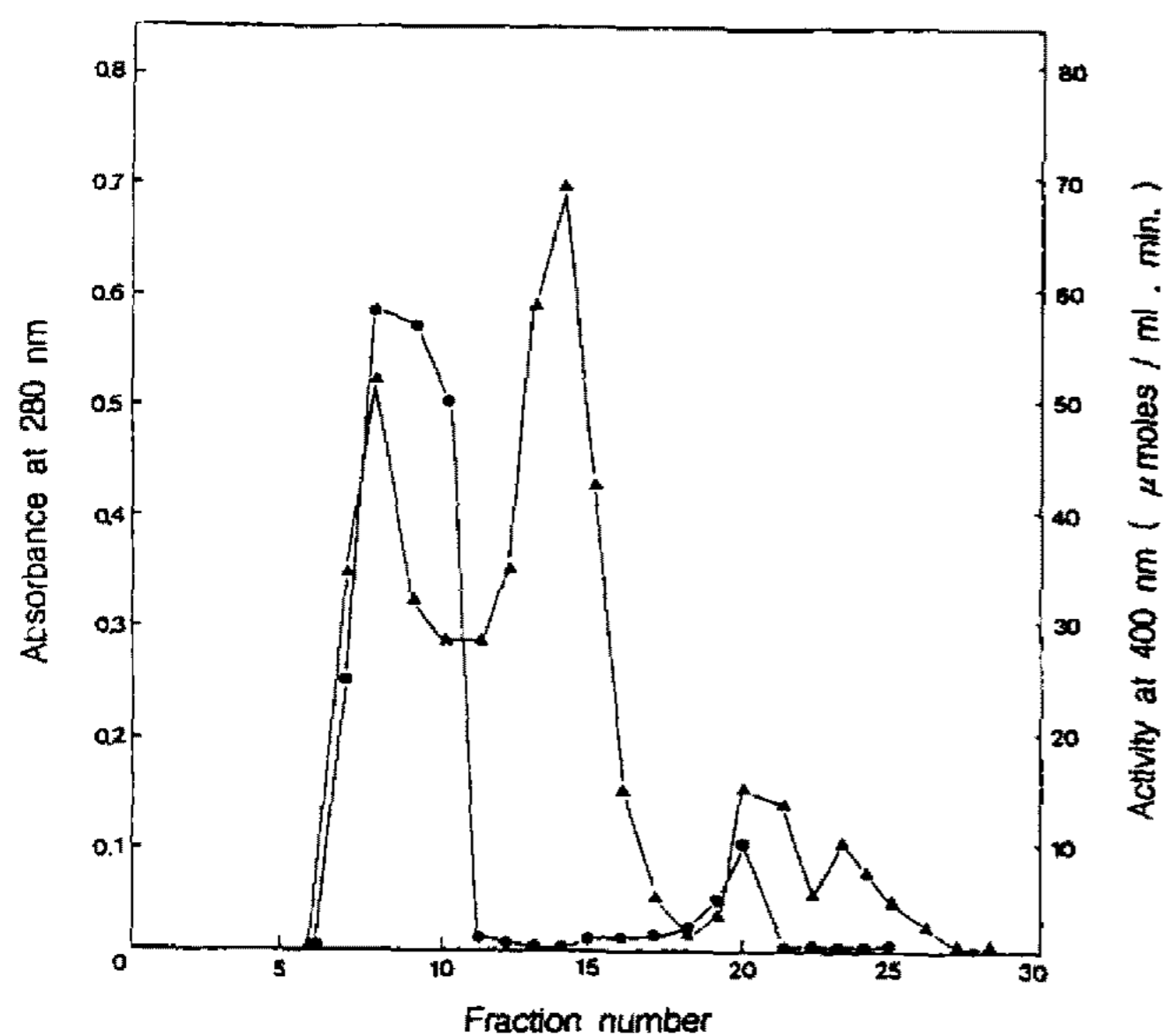


Fig. 1. Elution profile of β -glucosidase on Sephadex G-100 column chromatography (10 \times 900 mm).

An aliquot of each fraction was assayed for β -glucosidase activity (\bullet - \bullet) and protein (\blacktriangle - \blacktriangle).

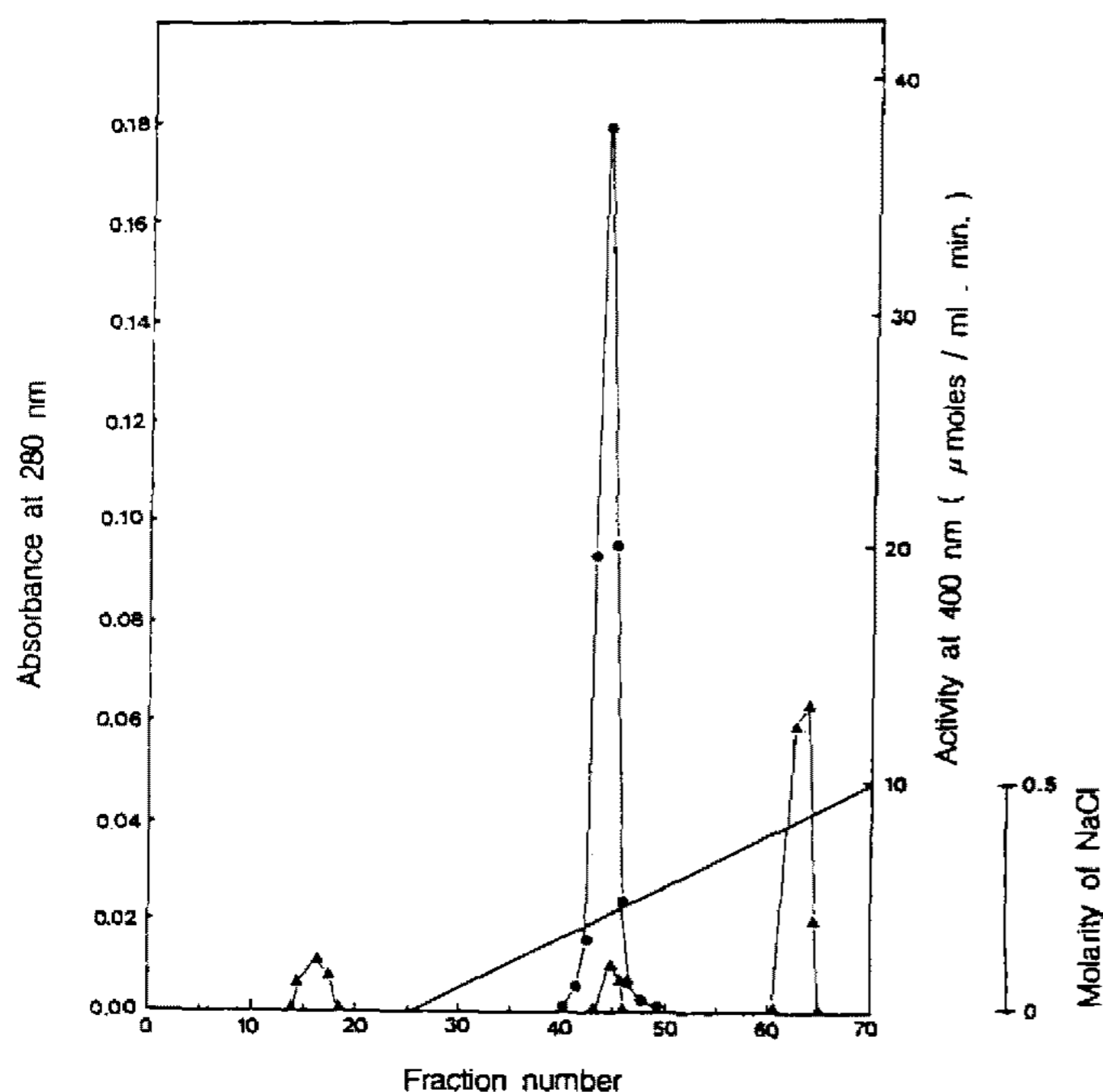


Fig. 2. Elution profile of β -glucosidase on DEAE-Sephacel column chromatography (150 \times 280 mm).

An aliquot of each fraction was assayed for β -glucosidase activity (\bullet - \bullet) and protein (\blacktriangle - \blacktriangle). A linear gradient indicated by the solid line.

다. 한편, Dharmawardhana 등(14)은 lodgepole pine xy-lem의 β -glucosidase specific activity는 0.04 nkat/mg에서 110.0 nkat/mg 으로 2760배 정제정도를 보고하였고, Chun 등(15)은 *Penicillium verruculosum*의 β -glucosidase specific activity는 1.1 U/mg protein에서 144.6 U/mg protein으로 127배 정제도를 나타내었다. 본 β -glucosidase의 정제도는 Dharmawardhana 등과 Chun 등의 결과와 비교해 볼 때 정제도는 낮았으나 specific activity는 높게 나타났다.

기질농도의 영향

기질의 농도가 β -glucosidase의 반응속도에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 PNPG의 농도를 0.1~2.0 mM까지 변화시키면서 반응속도를 측정하여 Lineweaver-Burk의 방법(16)으로 plot한 결과, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 K_m 값은 0.67 mM이었고 V_{max} 값은 25 moles/ml \cdot min.이었다. 한편, Dharmawardhana 등(14)은 lodgepole pine

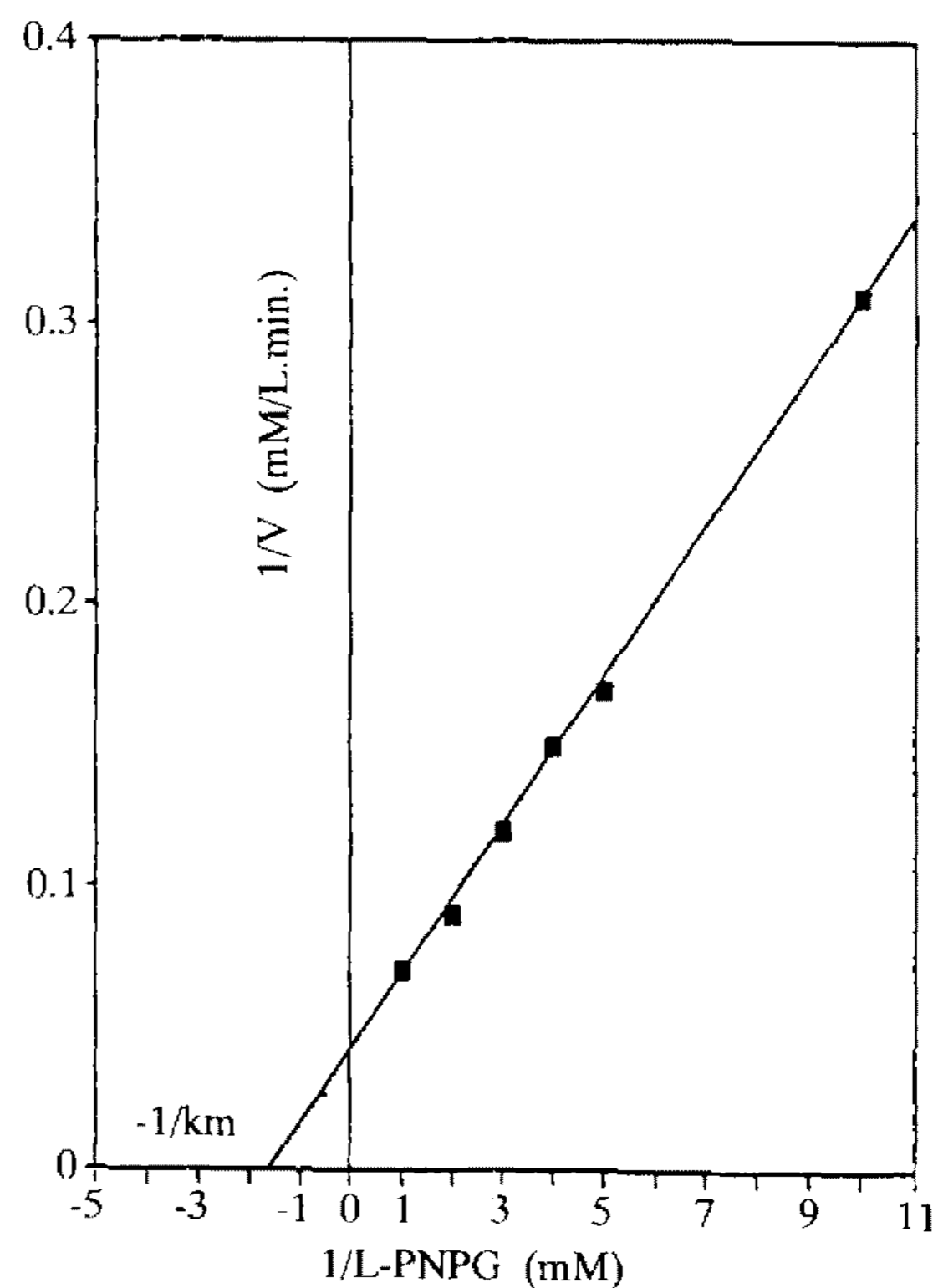


Fig. 3. Double reciprocal of PNPG concentration vs activity of β -glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416.

Table 1. The purification of β -glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416

Purification step	Volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	125.0	2095.6	97.5	21.5	1.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30~90%)	3.6	1489.4	45.9	32.4	1.5	71.1
Sephadex G-100.	39.0	1229.7	9.0	137.1	6.4	58.7
DEAE-Sephacel	15.0	162.2	0.23	705.4	32.8	7.7

xylem의 β -glucosidase의 K_m 값은 MUG에서 2.3 mM, 4-NPG에서 1.9 mM이고 MUG β -glucosidase의 K_m 값은 MUG에서 0.18 mM, 4-NPG에서 0.17 mM임을 보였고, Chun 등(15)은 *Penicillium verrucosum*의 β -glucosidase에서 PNPG를 기질로 사용하였을 때 K_m 값이 0.20 mM, V_{max} 값은 0.29×10^{-6} mole/sec임을 보였다. 본 β -glucosidase는 PNPG에 대해 Chun 등이 보고한 것보다 약한 친화력을 가짐을 알 수 있었다.

온도의 영향

β -Glucosidase의 활성에 미치는 온도효과를 측정하기 위하여 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 PNPG를 4 mM되게 용해시키고, 이 용액을 취하여 온도를 20°C에서 70°C까지 변화시키면서 정제된 효소액을 가하고 활성을 측정한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 58°C에서 최대 활성을 보였다. Chun 등(15)은 *Penicillium verruculosum*의 β -glucosidase에서 최대활성온도는 70°C, 온도안정성은 60°C 이상에서 활성이 급작스럽게 감소함을 보였다. 본 β -glucosidase의 최대활성온도는 Chun 등이 보고한 최대활성온도보다 낮았다.

pH의 영향

β -Glucosidase의 활성에 미치는 최적 pH를 측정하기 위하여 20 mM citrate-40 mM sodium phosphate di-

basic buffer로 pH 3.0에서 pH 6.0까지 조제하여 PNPG를 4 mM되게 용해시키고, 이 용액을 취하여 정제된 효소액을 가하고, 그 활성을 측정한 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 3.5 부근에서 최대활성을 나타내었다.

pH안정성을 측정하기 위하여 20 mM citrate-40 mM sodium phosphate dibasic buffer로 pH 2.6에서 pH 6.0까지 조제하고, 이 용액을 취하여 정제된 효소액을 가하고 37°C에서 1시간동안 방치한 후 4 mM PNPG를 가하여 활성을 측정한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 pH4.5 이상에서 급격한 활성의 감소를 보였다. 한편, Dharmawardhana 등(14)은 lodgepole pine xylem의 β -glucosidase에서 최적 pH는 30°C에서 5.4와 5.9사이임을 보였고, Chun 등(15)은 *Penicillium verruculosum*의 β -glucosidase에서 최적 pH는 5.0이었고, pH 안정성은 4.5에서 6.0사이임을 보였다. 본 β -glucosidase는 Dharmawardhana 등과 Chun 등의 결과 보다 더 낮은 pH에서 최대 활성을 보였고, pH안정도는 더 낮은 pH에서 감소함을 보였다.

금속이온의 영향

금속이온들이 β -glucosidase 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.05 M sodium phosphate buffer(pH

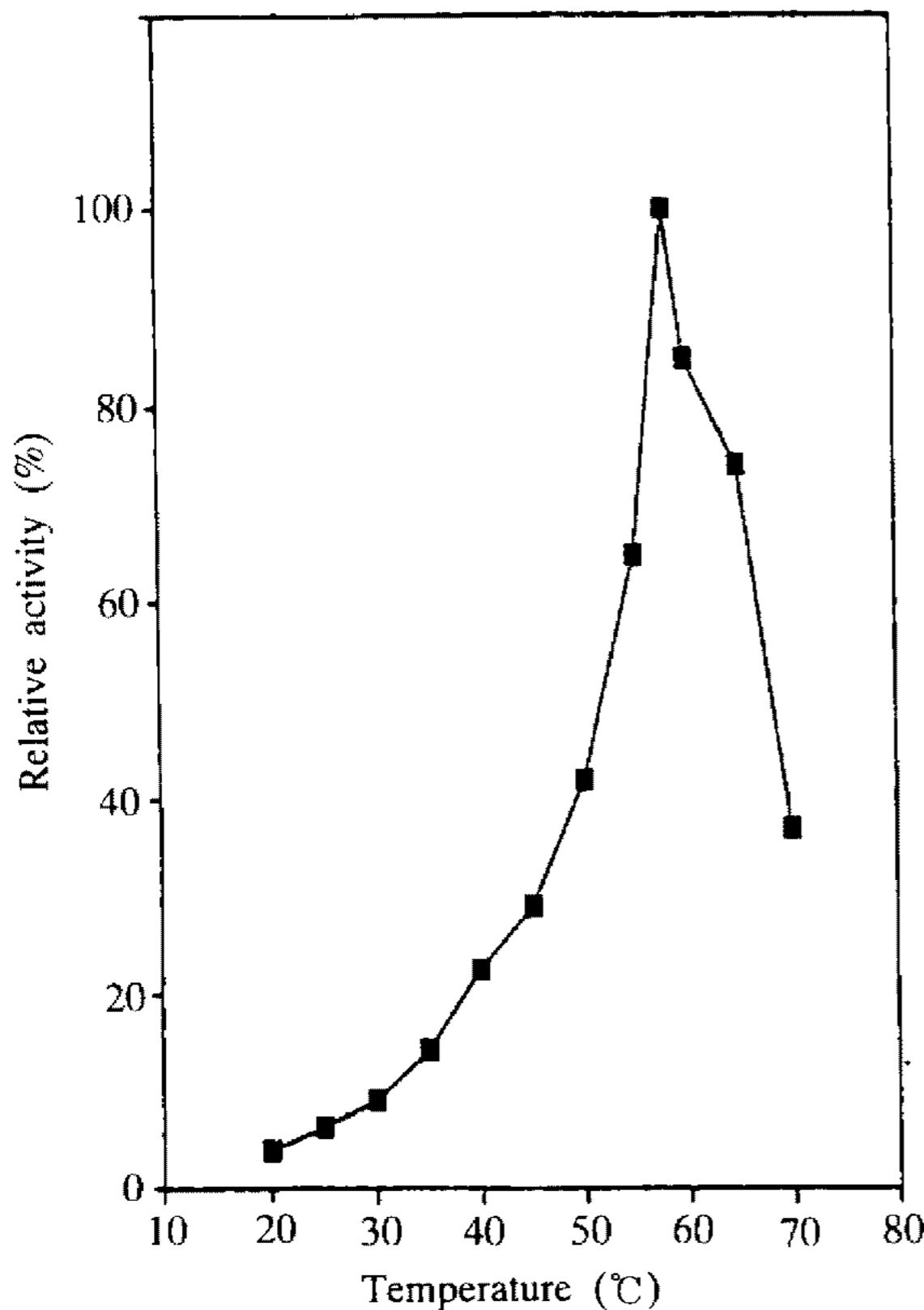


Fig. 4. Effect of temperature on β -glucosidase activity of *Aspergillus niger* SFN-416.

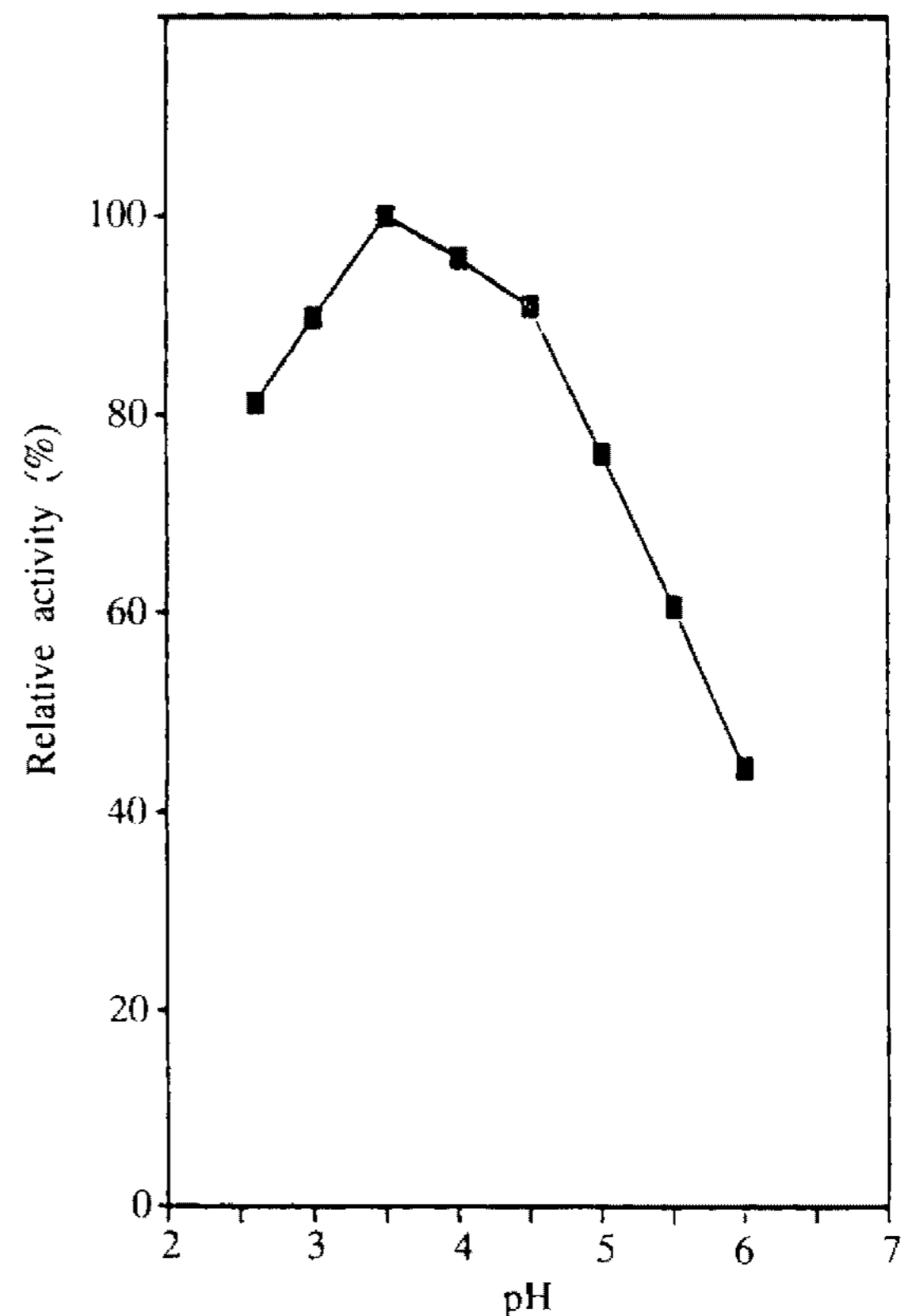


Fig. 5. Effect of pH on β -glucosidase activity of *Aspergillus niger* SFN-416.

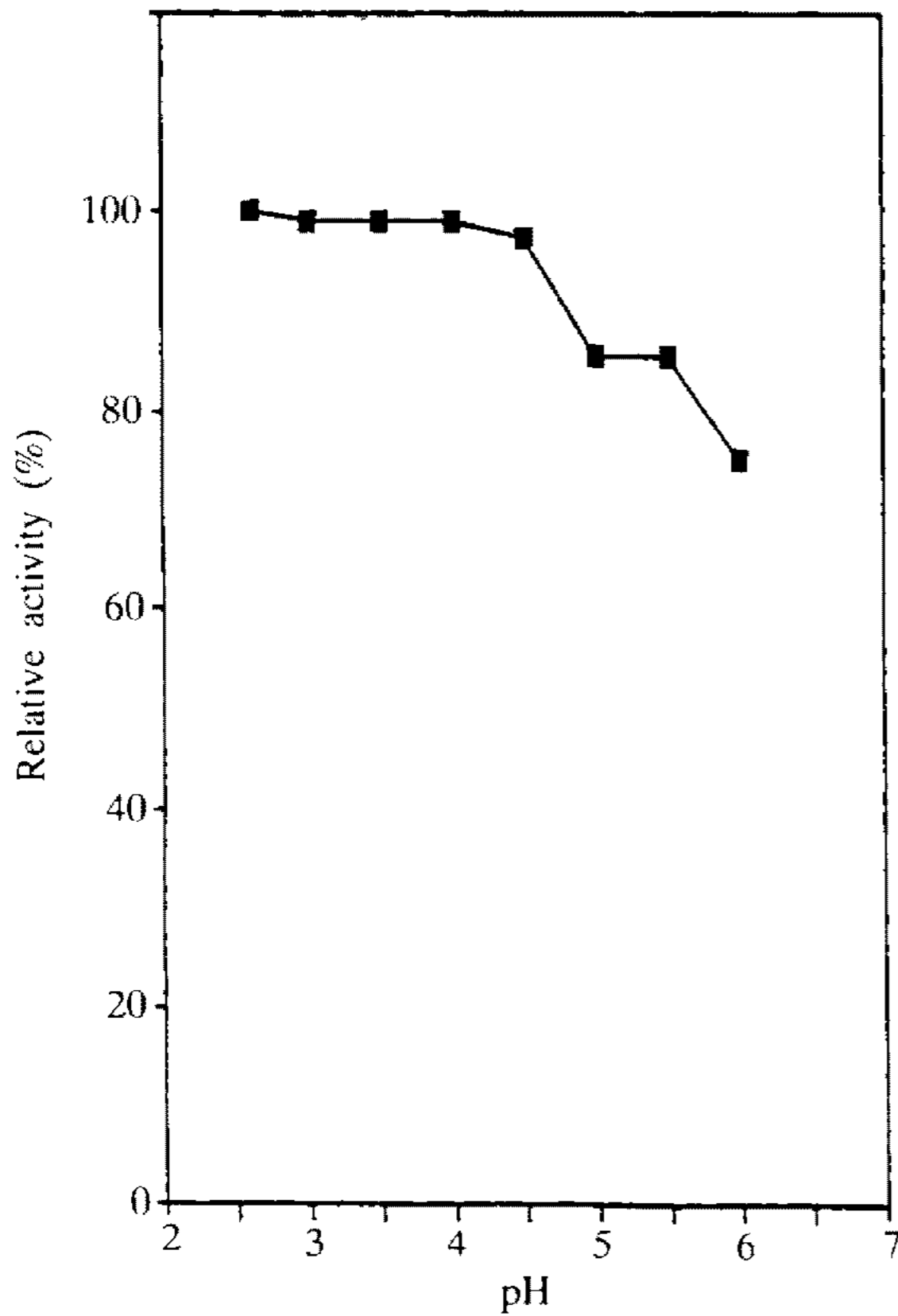


Fig. 6. Effect of pH on β -glucosidase stability of *Aspergillus niger* SFN-416.

5.5)에 PNPG를 4 mM되게 용해시키고, 이 용액에 각 금속이온들의 농도를 1 mM 되게하여 37°C를 유지시키면서 정제된 효소액을 가하여 활성을 측정하는 결과 Table 2와 같았다.

Table 2에 나타낸 바와 같이 모두 효소활성이 저해되었고, 특히 Cu^{2+} 에서 상대활성이 16.7%로 가장 저해 정도가 높은 것으로 나타났다. 한편 Chun 등(15)은 *Penicillium verruculosum*의 β -glucosidase에서 1 mM Hg^{2+} 는 89%, 1 mM Cu^{2+} 는 73%의 저해정도를 나타냄을 보였다. 본 β -glucosidase는 Chun 등의 결과보다 Cu^{2+} 에서는 훨씬 저해 정도가 높았고, Hg^{2+} 는 더 낮은 저해정도를 보였다.

유기용매의 영향

유기용매가 β -glucosidase활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol 각각의 농도를 10%(v/v)되게하고, PNPG를 4 mM되게 용해시켜, 37°C를 유지시키면서 정제된 효소액을 가하여 활성을 측정하는 결과 Table 3과 같다. Table 3에 나타낸 바와 같이 모두 높은 활성을 나타내었고, 특히 1-butanol에서 179%로 가장 높았다.

β -Glucosidase안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하

Table 2. Effect of metal ions on β -glucosidase activity of *Aspergillus niger* SFN-416

Ions	Concentration (mM)	Relative inhibition (%)
None	0	100
K^+	2	95.9
Na^+	2	98.3
Ca^{2+}	2	94.5
Co^{2+}	2	91.8
Hg^{2+}	2	97.6
Sn^{2+}	2	92.5
Mg^{2+}	2	96.6
Cu^{2+}	2	16.7
Fe^{2+}	2	66.6
Mn^{2+}	2	59.4
Zn^{2+}	2	86.0

Table 3. Effect of organic solvents on β -glucosidase activity of *Aspergillus niger* SFN-416

Organic solvent	Concentration (%)	Relative activity (%)
None	0	100
Methanol	10	169
Ethanol	10	131
Isopropanol	10	110
1-Butanol	10	179

Table 4. Effect of organic solvents on β -glucosidase stability of *Aspergillus niger* SFN-416

Organic solvent	Concentration (%)	Relative activity (%)
None	0	100
Methanol	10	87
Ethanol	10	100
Isopropanol	10	107
1-Butanol	10	132

여 0.05M sodium phosphate buffer(pH 5.5)에 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol 각각의 농도를 10%(v/v)되게 하고 정제된 효소액을 가하여 37°C를 유지시키면서 30분간 방치한 후 4 mM PNPG를 가하여 활성을 측정하는 결과 Table 4와 같았다. Table 4에 나타낸 바와 같이 methanol에서 상대활성이 87%로 약간 저해되었고, isopropanol과 1-butanol에서 높은 활성을 나타내었다. 특히 1-butanol에서 132%로 가장 높았다.

위 결과로부터 *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생산되는 β -glucosidase는 유기용매에서 비교적 안정한 것으로 생각된다. 따라서 유기 용매상으로 효소 반응을 이용하여 폐신문지, 톱밥 등으로부터 발효성 당을 효율적으로 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

분자량

정제된 β -glucosidase는 SDS-polyacrylamide slab gel

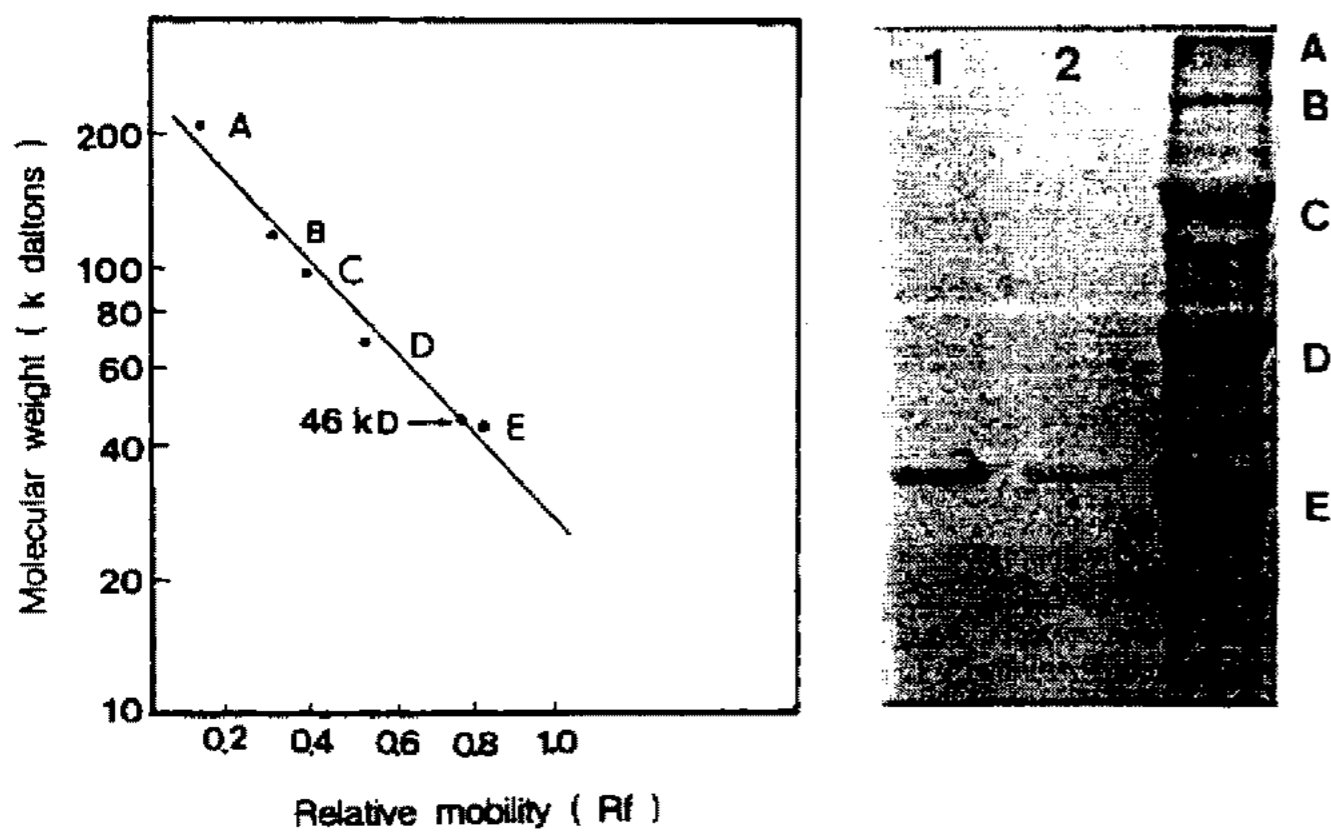


Fig. 7. Molecular weight determination of β -glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416 by SDS-PAGE.

A; Myosin (200,000 daltons), B; β -Galactosidase (116,250 daltons), C; Phosphorylase B (97,400 daltons), D; Bovine serum albumin (66,200 daltons), E; Ovalbumin (45,000 daltons), Lane 1: Sephadex G-100, Lane 2: DEAE-Sephacel.

전기영동을 하여 순도 및 분자량을 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 이 결과로부터 *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 생성한 β -glucosidase의 분자량은 46,000 daltons으로 확인되었다. 한편, Dharmawardhana 등(14)은 lodgepole pine xylem의 β -glucosidase를 SDS-PAGE하여 28 KD으로 dimeric structure임을 보였고, Chun 등(15)은 *Penicillium verruculosum*의 β -glucosidase를 SDS-PAGE하여 105 KD임을 보였다.

본 β -glucosidase의 분자량은 Dharmawardhana 등이 보고한 분자량보다는 크고 Chun 등이 보고한 분자량보다는 작은 것으로 밝혀졌다.

결론

섬유소 당화효소 중의 하나인 $\text{exo-}\beta$ -1,4-glucanase (C_1)의 활성을 억제하는 cellobiose를 분해시키는 β -glucosidase(β -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)를 많이 분비하는 *Aspergillus niger* SFN-416으로부터 비교적 유기용매에 안정한 β -glucosidase를 분리·정제하여 이화학적 특성과 유기용매 안정성을 조사하였다.

Aspergillus niger SFN-416의 배양액을 ethanol(70%) 침전, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30~90%) 침전, Sephadex G-100 chromatography 및 DEAE-sephacel ion chromatography 등의 정제과정을 거친 결과 32.8배 정제되었고, 정제효소의 최적활성온도는 58°C , 최적 pH는 3.5이었다. 또한 금속이온에 대한 효소의 활성은 대부분 억제를 보였고, 특히 Cu^{2+} 에서 저해정도가 가장 크게 나타났다.

합성기질인 PNPG에 대한 K_m 값은 0.67 mM, V_{max} 는 25 moles/ml·min이었고, 이 효소의 분자량은 SDS-PAGE에 의하여 46,000 daltons으로 결정되었다.

이 효소의 유기용매에 대한 활성과 안정성은 10%의 methanol, ethanol, isopropanol 및 1-butanol에 대한 영향을 측정된 결과 모두 높은 활성을 보였고, 특히 1-butanol에서 상대활성이 179%로 가장 높았으며, 안정성은 10%의 isopropanol 및 1-butanol에서 높은 활성을 보였다. 이것으로 *Aspergillus niger* SFN-416이 생산한 β -glucosidase는 비교적 높은 활성과 유기 용매에 안정한 것으로 생각된다. 따라서 본 β -glucosidase를 이용하여 자연계중에 존재하는 결정성 cellulose를 가수분해시키는데 기초적인 자료가 될 것으로 생각된다.

참고문헌

- Gorbacheva, I. V. and Rodionov, N. A. 1977. Studies on xylan degrading enzyme (I). *Biochem. Biophys. Acta.* **484**: 79-93.
- Chosh, A. 1981. Cellulase secretion from a hypercellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* Rut-C 30. *Arch. Microbiol.* **140**: 126-133.
- Pibber, M. and Toha, J. C. 1982. A general view of ethanol and methane production from cellulosic residues. *J. Ferment. Technol.* **60**: 247-252.
- Rehm, H. T. and Reed, G. 1983. Vol. 3-Biomass, microorganism for special applications, microbial product I, energy from renewable resources, Weinheim. Deerfield Beach Florida, Basal. *Biotechnology*. P. 293.
- Weigel, J. 1982. Ethanol from cellulose. *Experientia.* **38**: 151-155.
- Mandels, M. and Reese, E. T. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metal. *J. Bacteriol.* **73**: 269-278.
- Virendra, S. B. and Ghose, T. K. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: Substrate, microorganism, enzymes and products: *Enzyme Microb. Technol.* **3**: 90-104.
- Garg, S. K. and Neclakant, S. 1981. Effects of culture factors on cellulose activity and protein production by *Asp. terreus*. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 1683-1659.
- Trivedi, S. M. and Desai, J. D. 1984. Cellulase and β -glucosidase production by mix shake cultivation of *Scytalidium lignicola* and *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Ferment. Technol.* **62**: 211-215.
- 박석규, 문일식, 성낙계. 1993. β -Glucosidase를 생산하는 균주의 분리 및 조효소의 특성. *산업미생물학회지.* **21**: 440-445.
- Kohchi, C. and Tohe, A. 1986. Cloning of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene and its expression in *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 89-94.
- Lowry, O. H., Resebrough, N. J., Lewis, F. A. and Randall, R. J. 1951. Protein estimation with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* **227**: 680-685.

14. Dharmawardhana, P. D., Ellis, B. E. and Carlson, J. E. 1995. A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol.* **107**: 331-336.
15. Chun, S. B. Kim, D. H., Kim, K. H. and Chung, K. C. 1991. Purification and characterization of β -glucosidase from *Penicillium verruculosum*. *J. Microbiology and Biotechnology.* **3**: 188-194.
16. Lineweaver, H. and Burk, D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666.

(Received 7 June 1996)