

Trichoderma sp. C-4에서 분리한 endoglucanase(F-II-II)의 특성에 대한 연구

설옥주 · 최지영 · 손영준 · 신지원¹ · 한인섭 · 정대균¹ · 정춘수*
울산대학교 자연대학 생명과학부, ¹경희 대학교 유전공학과 및 유전공학연구소

Trichoderma sp. C-4의 배양액으로부터 한 종류의 endoglucanase(F-II-II)를 Sephacryl S-200 및 Sephacryl S-100 chromatography를 통하여 분리하였다. 분리된 효소는 SDS-PAGE 및 isoelectric focusing을 통하여 단일 band로 나타났으며, 분자량이 26,000, 등전점이 8.0으로 나타났다. 이 효소의 반응 최적온도와 최적 pH는 각각 50°C, 5.0이었으며, 50°C에서 24시간 동안 안정하였다. 분리된 효소의 carboxymethylcellulose에 대한 specific activity는 776.2 U/mg protein으로 나타났다. 이 효소의 아미노산 조성을 조사하였다. 효소를 trypsin으로 가수분해한 후 분해산물에 대한 단백질서열 분석을 행하였다. 그 결과 이 효소의 서열은 현재까지 밝혀진 다른 단백질과 homology를 갖지 않음이 확인되었다. 이 효소는 그 specific activity가 대단히 높고 아직 보고되지 않은 novel protein일 가능성이 대단히 높기 때문에 좋은 유전자 자원이 될 것으로 사료되었다.

Key words □ endoglucanase(EC 3.2.1.4), specific activity, *Trichoderma* sp. C-4

서 론

Cellulose는 포도당이 β -1,4 결합으로 이루어진 중합체로서 식물 건조중량의 40%를 차지하고 있다. 이를 분해하는 데에는 1,4- β -D-glucan glucanohydrolase(EC 3.2.1.4, endoglucanase), 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase(EC 3.2.1.91, exoglucanase, CBH) 및 β -D-glucoside glucohydrolase(EC 3.2.1.21, β -glucosidase)가 필요한 것으로 보고되었으며, 이중 한 효소인 endoglucanase에 대해서는 *Trichoderma reesei*(4,11,19), *T. koningii*(6, 20), *Sporotrichum pulverulentum*(8), *Irpex lacteus*(10), *Clostridium thermocellum*(1), *Thermomonospora fusca*(13) 등 많은 균주에서 연구가 이루어지고 있다. 그러나 보다 비활성(specific activity)이 높은 균주 및 효소를 찾기 위한 노력이 계속되고 있다(2,5,12). 저자 등은 한국 농가에서 분리한 *Trichoderma* sp. C-4가 높은 비활성을 갖는 endoglucanase를 분리할 가능성을 이미 보고한 바 있다(18). 이 균주가 분비하는 endoglucanase 중의 하나인 F-II-II는 carboxymethylcellulose(CMC)에 대하여 높은 비활성을 보여주고 있어 새로운 유전자 자원으로 가치가 높다고 판단되었다.

재료 및 방법

균주배양 및 효소 분리

분리된 균주 C-4를 이미 보고한 바와 같은 조성을 갖는 배지

[(g l⁻¹): Avicel, 5.0; carboxymethylcellulose(CMC), 5.0; peptone, 1; urea, 0.3;(NH₄)₂SO₄, 1.4; KH₂PO₄, 2.0; MgSO₄·7H₂O, 0.3; CaCl₂, 0.3; agar 15.0, (mg l⁻¹): FeSO₄·7H₂O, 5.0; MnSO₄·H₂O, 1.6; ZnSO₄·7H₂O, 1.4; CoCl₂, 2.0](16,18)에서 배양하였다. 28°C에서 6일 동안 진탕 배양한 후 배양액을 황산암모늄(20~80%)으로 침전시키고, 얻은 조효소(crude enzyme)를 50 mM 초산완충용액(pH 5.0)으로 투석한 후 농축하여 Sephacryl S-200이 충전된 3.5×100 cm column 상에서 동일 완충용액으로 흘려주면서 분리하였다. Endoglucanase 활성을 포함하는 부위 중 하나인 F-II를 Diaflo membrane PM-10(Amicon)을 사용하여 5 ml로 농축한 후 다시 50 mM 초산완충용액(pH 5.0)으로 교환하고 Sephacryl S-100이 충전된 1.6×100 cm column 상에 싣고 동일한 완충용액으로 흘려주면서 분리하였다.

효소활성측정

Avicel 및 CMC에 대한 활성을 측정하기 위하여 0.5% Avicel(Fluka) 또는 0.5% CMC(Sigma Chemical Co.)를 첨가한 초산완충용액(pH 5.0) 0.4 ml에 효소 0.1 ml를 첨가하고 40°C에서 15분 반응시킨 후 Somogyi-Nelson 방법(17)에 의하여 분석하였다. 표준 반응조건에서 1 μ mole min⁻¹의 포도당에 상응하는 환원당을 생성하는 데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다. 단백질의 정량은 Lowry 등(14)의 방법에 따랐다.

효소의 물리화학적 특성 검사

분리된 endoglucanase의 반응최적온도를 알기 위하여 CMC를 기질로 사용하여 30°C 부터 70°C까지(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 10°C 간격으로 측정하였으며, 열안정성 검사를 위하여

*To whom correspondence should be addressed
Tel : 052-259-2358, Fax : 052-259-1694,
E-mail: csjeong@uou.ulsan.ac.kr

효소를 50°C 부터 65°C 까지 5°C 간격으로 각각(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 12시간 동안 방치한 후 40°C에서 잔여활성을 검사하였다. 반응최적 pH를 알기 위하여 효소와 CMC의 반응 혼합물을 pH 3.0-8.0(pH 3.0-5.0, 100 mM 초산완충용액; pH 6.0-8.0, 100 mM 인산완충용액)사이에서 1.0 간격으로 변화시켜 40°C에서 15분 반응시켰다.

전기영동

SDS-전기영동은 Laemmli(1970)의 방법을 사용하였으며 acrylamide 농도는 12.5%, cross linkage는 2.7%인 slab gel을 사용하였다. 단백질 band의 확인을 위하여서는 SE250 might small slab 전기영동장치(Hoefer)를, transfer 후 분석(아미노산 조성 및 아미노산 서열)을 위해서는 SE600 slab 전기영동장치(Hoefer)를 사용하였다. Isoelectric focusing은 20% ampholyte (BIO-RAD, pH 7.0~9.0)를 사용하였고 acrylamide의 농도는 5%, cross linkage의 농도는 3% 를 사용하였다. Focusing은 1 M H₃PO₄와 1 M NaOH 수용액을 각각 양극과 음극으로 하였고 4°C에서 16시간 동안 500V를 유지시켰다. Focusing이 끝난 후 8.0 cm의 gel strip을 1.0 cm 간격으로 잘라 각각을 1 ml의 25 mM KCl로 용출하여 pH 기울기를 구하였다.

아미노산 조성

순수 분리한 효소 20 µg을 SDS-전기영동(acrylamide 12.5%, cross linkage 2.7%)한 후 이를 transfer buffer(25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glycine, 20% methanol, 0.01% SDS)를 사용하여 25 V에서 16 시간 동안 전기영동함으로써 gel에 있는 단백질 band를 PVDF(polyvinylidene difluoride, Sigma Chemical Co.) membrane에 옮겼다. PVDF membrane은 미리 2-3 초 동안 100% 메탄올에 담구었다가 3분 동안 3차 증류수에서 씻은 후 transfer buffer에 담가두었다가 사용하였다. Transferred membrane을 Coomassie Blue R-250으로 염색한 후 효소 band를 잘라내어 질소가스로 충전하고 밀봉하여 용존 산소를 제거하였다. 아미노산 조성은 기초과학지원연구소(서울)에 의뢰하여 PicoTag system(Waters)을 사용하여 분석하였다.

단백질서열

순수 분리한 시료 100 g을 ammonium bicarbonate(50 mM, pH 8.0) 완충용액으로 교환하고 trypsin(2%, w/v)을 처리하여 37°C에서 3시간 반응시킨 후 SDS-전기영동(acrylamide 15%, cross linkage 2.7%)하여 잘려진 2개의 band를 얻었다. 이를 위와 같은 방법으로 PVDF membrane에 옮겨 기초과학지원연구소(서울)에 의뢰하여 Procise protein sequencing system(Applied Biosystems, Waters)에 의뢰하여 분석하였다.

결과 및 고찰

Endoglucanase(F-II-II)의 분리

Trichoderma sp. C-4에서 분리되는 endoglucanase는 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography에 의해 고분자량을 가진 것

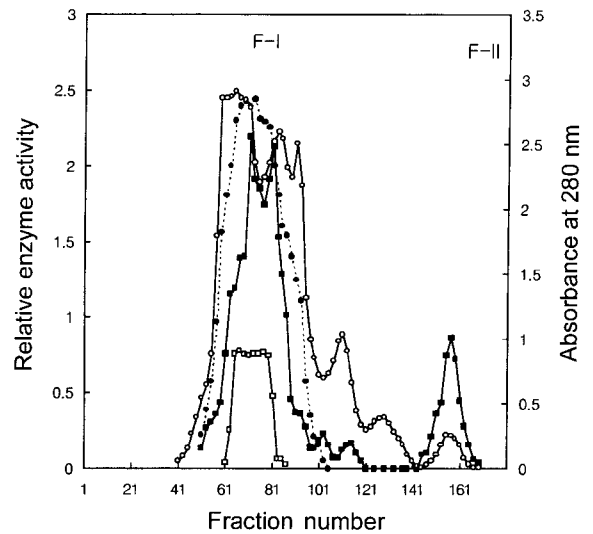


Fig. 1. Gel filtration chromatography of crude enzyme from *Trichoderma* sp. C-4 on 3.5 × 100 cm of Sephacryl S-200. Flow rate was 4 cm/hr⁻¹ and fractions of 10 ml were collected. Protein was determined by the absorbance at 280 nm. 10 µl of the effluent was used for the assay for the enzyme activity. Observed values: ■, CMCCase; ●, Avicelase; □, β-glucosidase; ○, protein.

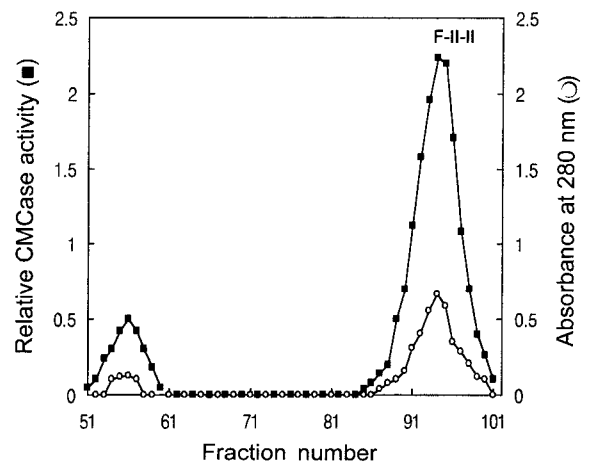


Fig. 2. Purification of F-II on 2.0 × 100 cm of Sephacryl S-100. Flow rate was 4 cm/hr and fractions of 5 ml were collected. Protein was determined by the absorbance at 280 nm. 10 µl of the effluent was used for the assay for the enzyme activity. Observed values: ■, CMCCase; ○, protein.

(F-I)과 저분자량을 가진 것(F-II)으로 분리되었다(Fig. 1). F-I 부분에서는 3종류의 endoglucanase와 2종류의 exoglucanase 및 1종류의 β-glucosidase가 포함되어 있는데 이들에 대한 연구는 현재 진행 중이다. F-II 부분을 수확하여 다시 Sephacryl S-100 gel filtration chromatography에 적하하여 용출한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 F-II-II 부분을 얻을 수 있었으며 단백질의 peak와 효소활성도의 peak가 일치하였다. 그 순도를 확인하기 위해 SDS-전기영동을 시행한 결과, 단일 band를 보여 그 순도를 입증하여 주었다(Fig. 3A). 이 효소를 analytical isoelectric

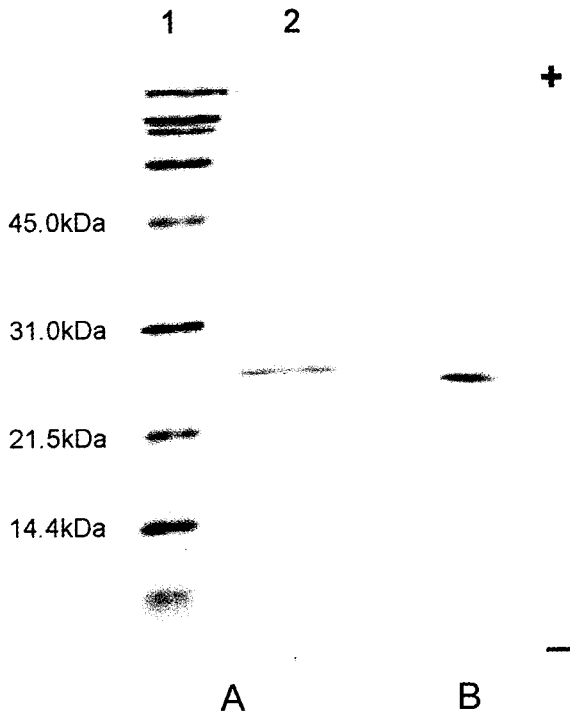


Fig. 3. Electrophoresis of purified F-II-II. (A) SDS-PAGE of F-II-II (T=12.5%, C=2.7%). Lane 1 contained protein standards with molecular weights of 220,000, 116,250, 97,400, 66,200, 45,000, 31,000, 21,500, 14,400, and 6,500. Lane 2 was loaded with 3 µg of purified F-II-II. The gel was stained with Coomassie Blue R-250. (B) IEF of F-II-II. 2 µg of purified enzyme was loaded on polyacrylamide using Biolyte pH 7-9. The gel was stained with silver staining.

focusing에서 전개한 결과(Fig. 3B) 등전점이 8.0인 단일 band를 볼 수 있다. 이렇게 얻어진 효소 시료를 모든 실험에 사용하였다. 이 효소는 SDS-PAGE상에서 분자량이 26 kDa 정도인 것으로 추정되었다. Sephadex G-75를 이용한 gel-filtration chromatography에서 분자량이 26 kDa로 측정되었기 때문에 (data not shown) 이 효소는 단일 단백질로 구성되었음을 알 수 있었다. *T. koningii*에서 분리된 저분자량 endoglucanase의 경우 분자량이 22 kDa이었고 pI는 4.8로 나타났는데(9), 이 효소의 경우 분자량은 비슷하였으나 pI 값은 크게 달랐다. *T. reesei*에서 분리된 저분자량 endoglucanase의 경우 분자량이 25 kDa, pI 값이 7.5인 것으로 보고되어(19) 분리된 효소와 유사하였다.

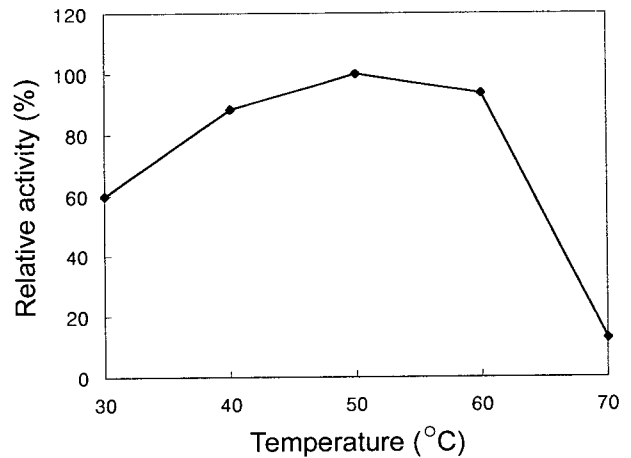


Fig. 4. Optimum temperature of F-II-II. Optimum temperature for the purified enzyme was determined at the appropriate temperature using 15 min assay.

효소의 특성

분리된 효소는 기질인 CMC(0.5%, w/v)에 대하여 40°C에서 15분 반응 반응시킨 결과 776.2 U/mg의 비활성을 나타내었다 (Table 1). 분리된 효소의 비활성은 같은 균주내에서 분리된 다른 endoglucanase들에 비하여서도 3~5배 높았으며, 비활성이 높다고 알려진 *T. reesei*의 EGIII의 351 U/mg(15)이나, *Thermo- monospora fusca*의 94 KDa 효소의 700 U/mg(3)에 비하여서도 높은 값이었다.

이 효소는 Fig. 4에서 제시한 바와 같이 40-50°C의 조건에서 (초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 80%이상의 비교적 높은 활성을 나타내었고, 최적 온도는 50°C로 나타났다. 열안정성에 대한 실험에서 Fig. 5에 제시한 바와 같이 50°C까지는(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM)12시간 동안 활성을 전혀 상실하지 않았다. 그러나 55, 60, 70°C에서 1시간 후 각각 43, 60, 75%의 활성을 상실하였다.

pH 변화에 따른 효소의 활성은 Fig. 6에 제시한 바와 같이 pH 4~6에서 비교적 높은 활성을 나타내었고 최적 pH는 5.0이었다 이는 *Trichoderma* 속에 속하는 균주에서 분리된 많은 endoglucanase이 갖는 값과 비슷하였다.

효소의 아미노산 조성 및 단백질 서열

효소의 아미노산 조성은 Table 2에 제시한 바와 같다. 이 효소의 아미노산 조성은 *T. reesei*의 저분자량(25 kDa) endo-

Table 1. Purification of F-II-II.

Fraction	Total protein (mg)	CM-cellulase activity		Activity yield (% of total)	Purification fold
		Total activity (U)	Specific activity (U/mg)		
Crude extract	291	6090	20.9	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	113	3715	32.9	61.0	1.57
Sephacryl S-200	0.375	195	520	3.2	24.9
Sephacryl S-100	0.122	94.7	776.2	1.6	37.1

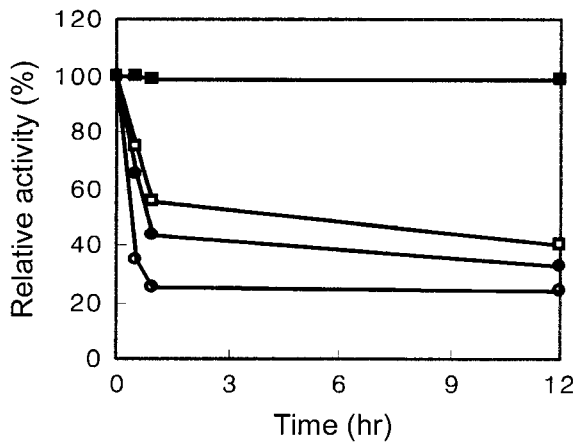


Fig. 5. Thermal stability of F-II-II. The enzyme was incubated for 12 hr at various temperature (■, 50°C; □, 55°C; ●, 60°C; ○, 65°C) without substrate and aliquots were removed at given interval. The remaining activity was assayed at 40°C.

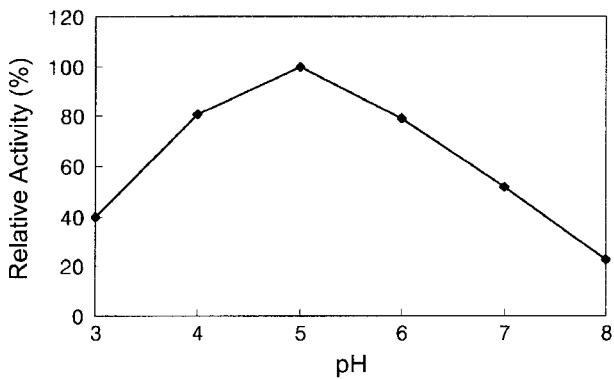


Fig. 6. Optimum pH of F-II-II. The CMCase activity was determined with 50 mM sodium citrate for pH 3 and 50 mM sodium acetate for pH between 4.0 and 6.0, and 50 mM phosphate for pH between 7.0 and 8.0.

glucanase에 비하여 glycine과 serine의 비율(Mol%)이 1.7배 정도 높았다. 전체적으로 neutral 아미노산의 비율이 높은 것은 비슷하였다. Lysine은 비슷하였으나 arginine은 3배정도 높았고, Glx(glutamic acid + glutamine) 및 Asx(Aspartic acid + asparagine)의 비율은 낮았다. Glx와 Asx에서 acidic 아미노산의 비율이 정확하지 않지만 이 효소의 pI 값이 *T. reesei*에서 분리한 효소의 값과 다른 원인인 것으로 사료되었다.

분리된 효소의 N-terminal sequencing을 시도하였으나, 분석되지 않았다. Deblocking을 위하여 분리된 효소에 TFA(Ser, Thr의 acetyl group 제거), 0.6N HCl(Met의 formyl group 제거), pyroglutamate aminopeptidase(N-terminal에서 pyroglutamate 제거, Boehringer Mannheim) 및 acylamino-acid-releasing enzyme(N-acetylamino acid 잔기 제거, Takara)을 순차적으로 처리하여 분석하였으나 N-terminal sequence를 얻는데 성공하지 못하였다. *T. reesei*의 CHBII(7)와 본 균주에서 분리된 다른 종류의 endoglucanase들(unpublished)이 pyroglutamate aminopeptidase에 의하여 deblocking되어 N-terminal 분석에 성공한 것에 비추어

Table 2. Amino acid composition of F-II-II from *Trichoderma* sp. C-4.

Amino acid	Mol %
Asx ^a	7.3
Glx ^a	12.0
Ser	14.0
Gly	27.8
His	2.8
Arg	3.5
Thr	3.5
Ala	4.1
Pro	2.6
Tyr	2.7
Val	3.1
Met	0.33
Ile	3.7
Leu	6.3
Phe	2.5
Lys	4.0
TOTAL	100

^aAsx, Glx mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

1 2

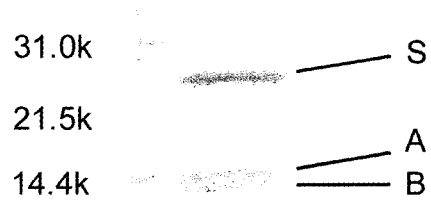


Fig. 7. SDS-PAGE of F-II-II after digestion with trypsin (T=15.0%, C=2.7%). Lane 1 contained protein standards with molecular weights of 220,000, 116,250, 97,400, 66,200, 45,000, 31,000, 21,500, 14,400, and 6,500. Lane 2 was loaded with 5 µg of digested F-II-II. The enzyme was incubated with trypsin (2%, w/w) for 2 hr in ammonium bicarbonate 50 mM with 1 mM CaCl₂, pH 8.0. The band S represented for unreacted enzyme. The sequences of band A and B were analyzed.

이 효소의 N-terminal은 이들과 다를 것으로 추정된다. 효소를 ammonium bicarbonate(50 mM, pH 8.0) 완충용액상에서 trypsin으로 분해한 결과 두 개의 주된 peptide로 분해되었다.(Fig. 7의 band A, B). 이 효소의 아미노산조성 분석을 통하여 arginine과 lysine이 각각 3.5 및 4.0%로서, 효소내에 각각 8 및 9 잔기가 존재함을 알았기 때문에 효소를 denaturation 시켜 분해하면 전기영동으로 분리하기에는 너무 작은 peptide가 나올 확률이 높을 것으로 예상되어 native form을 trypsin으로 분해하였다. trypsin 반응시간이 진행됨에 따라 효소위치(Fig. 7의 band S)는 점점 감소하였고, 주된 분해산물인 band A, B는 10시간까지는 유사한 농도를 유지하였지만 이 이후에는 이들 역시 현저히 감소하였다. 본 실험에서 선택한 3시간 후에는 band A 와 B의 비율이 유사하였다. 이 두 peptide의 단백질 서열을 분석하였는데, A band는 Ala-Asp-Val-Ala-Tyr-Asp-Leu-Phe-Thr-Thr-Ala-Asn-Asn-Asn와 같은 서열을 보였고, B band는 Ile-Val-Ser-Ala-Ile-Gly-Ser-Met-Asn-Thr-Thr-Ala의 서열을 나타내었다. 이들 시료는 부분 분해된 산물임에도 불구하고 비교적 명확한 서열 분석 결과를 나타내었다. 현재 이들 서열을 근거로 이 효소 유전자 cloning을 진행 중에 있다. 분석된 두 서열 모두 기존에 알려진 단백질의 서열과는 homology를 갖고 있지 않은 것으로 나타났고, 아미노산 조성도 알려진 효소와 다른 것으로 나타나 이 효소는 novel protein일 가능성이 높은 것으로 사료되었다. 이에 대하여서는 현재 진행중인 cloning 결과가 나오면 명확해질 것으로 보인다. 이 효소는 그 specific activity가 대단히 높고 novel protein일 가능성이 높아서 좋은 유전자 자원이라고 믿어졌다.

감사의 말

본 연구는 농림수산부의 농림수산 특정연구과제에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Ait, N., N. Creuzet, and J. Cattenot. 1979. Characterization and purification of thermostable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90: 537-546.
- Bok, J. D., D. A. Yernool, and D. E. Eveleigh. 1998. Purification, characterization and molecular analysis of thermostable cellulases CelA and CelB from *Thermotoga neapolitana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12): 4774-4781.
- Calza, R. E., D. C. Irwin, and D. B. Wilson. 1985. Purification and characterization of two β -1,4-endoglucanases from *Thermomonospora fusca*. *Biochemistry* 24: 7797-7804.
- Claeysens, M., H. van Tilbeurgh, J. P. Kamerling, J. Berg. M. Vrsanska, and P. Bielek. 1990. Studies of the cellulolytic system of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* QM9414. *Biochem. J.* 270: 251-256.
- Denman, S., G. P. Xue, and B. Patel. 1996. Characterization of a *Neocallimastix patriciarum* cellulase cDNA (celA) homologous to *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase II. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6): 1889-1896.
- Eriksson, K. E. and S. G. Hamp. 1978. Regulation of endo-1,4-glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90: 183-190.
- Fagerstam, L. G., L. G. Patterson, and J. A. Engstrom, 1984. The primary structure of a 1,4- β -glucan cellobiohydrolase from the fungus *Trichoderma reesei* QM9414. *FEBS Lett.* 167: 309-313
- Halliwel, G., M. N. B. A. Wakabe, and A. H. Patel. 1985. The contribution of endo-1,4- β -D-glucanase to cellulolysis in *T. koningii*. *J. Appl. Biochem.* 7: 43-54.
- Hong, S. W., Y. C. Hah, P. J. Maeng, and C. S. Jeong. 1986. Purification and mode of action of low molecular weight β -glucan glucanohydrolase from *Trichoderma koningii*. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 227-235.
- Kanda, T., S. Nakakubo, K. Wakabayashi, and K. Nisizawa. 1978. Purification and properties of an exocellulase of avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.* 84: 1217-1226.
- Kleman-Leyer, K. M., S. A. Matti, T. T. Teeri, and T. K. Kirk. 1996. The cellulases Endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but no to decrease its molecular size. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(8), 2883-2887.
- Lin, S. B. and F. J. Stutzenberger. 1995. Purification and characterization of the major beta-1,4 endoglucanase from *Thermomonospora curvata*. *J. Appl. Bacteriol.* 79(4): 447-453.
- Lin, E. and D. B. Wilson. 1987. Regulation of β -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 135-1357.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Macarron R., C. Acebal, M. P. Castillon, J. M. Dominguez, de la Mata I., G. Pettersson, P. Tomme, and M. Claeysens. 1993. Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 289(3): 867-873.
- Mandels, M., F. W. Parrish, and E. T. Reese. 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*, *J. Bacteriol.* 83, 400-408.
- Somogyi, M. 1952. Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19-23.
- Son, Y. J., O. J. Sul, D. K. Chung, I. S. Han, Y. J. Choi, and C. S. Jeong. 1997. Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C-4 producing cellulase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25(4), 346-353.
- Ulker A. and B. Sprey, 1989, Production and characterization of an unglycosylated low molecular weight 1,4- β -glucan-glucanohydrolase of *Trichoderma reesei*, p. 60-80, In Kubicek, C. P., D. E. Eveleigh H. Esterbauer, W. W. Steiner and E. M. Kubicek-Pranz (ed), *Trichoderma reesei* cellulases, Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Wood, T. M. and S. I. McCrae. 1982. Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2973-2982.

(Received February 3, 2000/Accepted March 10, 2000)

ABSTRACT: Characterization of Endoglucanase (F-II-II) Purified from *Trichoderma* sp. C-4

Sul, Ok-Ju, Ji-Young Choi, Young-Jun Son, Ji-Won Shin¹, In-Seob Han, Dae-Kyun Chung¹, and Choon-Soo Jeong*(Department of Biological Science, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea, ¹Institute and Department of Genetic Engineering, Kyung-Hee University, Suwon 449-701, Korea.)

One of endoglucanases(F-II-II) was purified from the culture filtrate of *Trichoderma* sp. C-4 through two step procedures including chromatography on Sephacryl S-200 and Sephacryl S-100. The molecular weight of the enzyme was determined to be about 26,000 by SDS-PAGE and the isoelectric point as 8.0 by analytical isoelectric focusing. The optimum temperature of the enzyme was 50°C and the optimum pH was 5.0. No loss of activity was observed when the enzyme was preincubated at 50°C for 24 hours. The specific activity of the enzyme toward carboxymethylcellulose (CMC) was estimated to be 776.2 U/mg. The internal amino acid sequence was analysed.