

새로운 섬유소분해 균주 *Trichoderma* sp. C-4에서 분리한 Endoglucanase (F-I-III)에 대한 연구

설옥주 · 정대균¹ · 한인섭 · 정춘수*

울산대학교 자연대학 생명과학부, ¹경희대학교 자연대학 유전공학과

국내에서 분리된 우수 섬유소분해 균주인 *Trichoderma* sp. C-4가 생성하는 endoglucanase 중 하나를 (NH₄)₂SO₄ 침전, Sephacryl S-200 gel filtration, DEAE-Sephrose A-50 ion exchange, Mono-P chromatofocusing (FPLC)의 단계로 정제하고 이를 F-I-III라 명명하였다. 분리된 효소 F-I-III는 분자량 56,000Da, 등전점 4.9로 측정된 단일 단백질이었다. F-I-III는 55°C에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH 5.0이 반응 최적 조건이었다. 50°C에서 24시간 동안 안정하였으며, pH 4-7의 범위에서 안정하였다. CMC에 대한 비활성은 315.4U/mg 이었으며, PNP2에 대한 Km 값은 2.69 mM이었다. 이 효소는 같은 균주에서 분리한 다른 endoglucanase와 exoglucanase를 섞었을 때 결정형 섬유소인 Avicel 분해에 대한 상승효과를 보였다. Mg²⁺, Co²⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Cs⁺, Li⁺ 등의 이온은 1 mM의 농도에서 효소의 활성에 큰 영향을 미치지 않았고, 1 mM의 환원제 (cystein, EDTA, β-mercaptoethanol, dithiothreitol(DTT), L-ascorbic acid) 들은 효소의 활성을 증가시켰다. F-I-III의 N-말단 서열을 분석하여 QPGTSTPEVHPKLLTYK의 서열을 얻었다. 이는 *Trichoderma reesei*의 endoglucanase인 EGI와 95%의 유사도를 나타내었다. 분리된 효소 F-I-III는 높은 비활성을 가지고 있어서 활용가치가 높을 것으로 사료되었다.

Key words □ C-4, endo-1,4-β-glucanase (F-I-III), characterization, protein sequencing, *Trichoderma* sp.

식물의 다당류는 중요한 에너지 자원으로서, 이들이 성공적으로 활용되기 위해서는 좋은 분해 효소가 필요하다. 섬유소 (cellulose)는 포도당이 β-1,4-glycosidic 결합으로 이루어진 중합체로서 식물 생체 건조중량의 약 40% 이상을 차지하고 있다. Cellulose분해는 주로 곰팡이와 박테리아가 분비하는 섬유소분해 효소(cellulase)에 의해 이루어지고 있으며, *Trichoderma reesei* (3-6), *Trichoderma koningii* (10, 11, 29, 30), *Sporotrichum pulverulentum* (7, 9), *Penicillium funiculosum* (13), *Clostridium thermocellum* (1, 2), *Thermomonospora fusca* (16) 등의 많은 균주들에 대하여 연구가 이루어지고 있다. Cellulase는 1,4-β-D-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.4, endoglucanase, EG), 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) 세 종류의 효소로 구성되어 있다. Endoglucanase나 exoglucanase는 단독으로 작용할 때에는 Avicel과 같은 결정형 섬유소를 분해 하지 못하나 이들 세 효소가 공동으로 작용하면 cellulose를 효과적으로 분해할 수 있다(14). 이러한 상승작용은 *T. koningii*와 *C. thermocellum*과 같이 다른 균주에서 분리된 효소 사이에서도 이루어짐이 보고되었다(11). 효율적인 cellulose 자원 활용을 위하여 좋은 cellulase 자원 확보는 중요하다. 이러한 노력은 기존 균주의 돌연변이, 이들 효소의 cloning (19) 및 새로운 균주의 탐색 등 다양한 방법을

통하여 이루어지고 있다. 본 연구진은 국내의 벚꽃에서 높은 specific activity를 보이는 새로운 cellulase 분비균주 *Trichoderma* sp. C-4를 분리하여 보고한 바 있다(24, 26). 이 균주가 분비하는 endoglucanase의 하나인 F-I-III를 분리하고 효소의 특징에 대하여 분석하고, 부분적인 단백질 서열을 분석하였다.

재료 및 방법

균주배양 및 효소 분리

분리된 균주 C-4를 Mandels' 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; FeSO₄·7H₂O, 5.0; MnSO₄·H₂O, 1.6; ZnSO₄·7H₂O, 1.4; CoCl₂, 2.0, pH 6.0) (21) 에서 배양하였다. 균주 C-4의 포자를 5 × 10⁵ spores/ml 농도로 접종하고 28°C에서 6일 동안 진탕 배양 (180 rev/min)한 후 얻은 배양액으로부터 효소를 분리하였다. 6L의 배양액을 황산암모늄 20%로 침전시키고 원심분리(6,000× g, 30 min) 한 후 침전물을 버렸다. 용액에 황산암모늄을 더 첨가하여 70% 포화농도로 녹인 후 원심분리(10,000× g, 30 min) 하여 회수된 침전물을 조효소로 하였다. 조효소(crude enzyme)를 80 mM 초산완충용액(pH 5.0)으로 투석하였다. 투석은 셀룰로스 막을 사용하였고, 효소에 의한 막 손상에 따른 효소 유출을 피하기 위하여 2시간 마다 투석 막을 교환해주며 3회 실시하였다. 투석이 끝난 조효소는 Sephacryl S-200이 충전된 3.5 × 100 cm

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-52-259-2358, Fax: 82-52-259-1694
E-mail: csjeong@mail.ulsan.ac.kr

column 상에서 동일 완충용액으로 흘려주면서 분리하였다. Endoglucanase는 두 부분으로 분리 되었다(F-I, F-II). 이 중 F-I 부분을 Diaflo membrane PM-10 (Amicon, Lexington, USA)을 사용하여 농축한 후 완충용액을 20 mM 인산완충용액 (pH 7.0)으로 교환하였다. 이를 동일한 완충용액으로 충전된 DEAE-sepharose CL-6B column (2.5 × 30 cm) 상에 실었다. 동일한 완충용액 200 ml을 흘려준 후 0-0.5M NaCl 농도구배를 걸어 분리하였다. 이 과정에서 세 종류의 endoglucanase 가 분리 되었는데 (F-I-I, F-I-II, F-I-III), 이 중 F-I-III 부분을 Diaflo membrane (PM 10)으로 농축한 후 완충용액을 25 mM histidine-HCl 완충용액 (pH 5.5)으로 교환하였다. 이를 동일한 완충용액으로 평형된 Mono P HR 5/5 column 에 올린 후 polybuffer 74 (1:10 희석액 pH 3.5, Pharmacia, Uppsala, Sweden) 을 용출시켜 분리하였다.

효소활성측정

효소를 분리하는 동안 Avicel 및 CMC에 대한 활성을 측정하기 위하여 0.5% Avicel (Fluka, Buchs, Switzerland) 또는 0.5% CMC (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA)를 첨가한 초산완충용액(pH 5.0) 0.4 ml에 효소 0.1 ml를 첨가하고 40°C에서 15분 반응시킨 후 Somogyi-Nelson 방법 (23)에 의하여 분석하였다. 이러한 표준 반응조건에서 1 $\mu\text{mole min}^{-1}$ 의 포도당에 상응하는 환원당을 생성하는 데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다. 효소의 PNP₂ (p-nitrophenyl- β -D-cellobioside)에 대한 활성 측정을 위해 1mM PNP₂를 첨가한 초산 완충용액(pH 5.0)에서 효소를 반응시킨 후 1 M Na₂CO₃를 넣어 반응을 멈추었다. 유리된 PNP의 양은 420 nm에서 측정 되었다. PNP₂를 기질로 사용한 경우 1 $\mu\text{mole min}^{-1}$ 의 PNP를 생성하는 데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다. 단백질의 정량은 Lowry 등(17)의 방법에 따랐다. 상층 작용 분석을 위해서 세 종류의 endoglucanase와 한 종류의 exoglucanase를 각각 혹은 조합하여 Avicel과 40°C에서 4시간 반응하여 유리된 환원당을 측정하였다.

효소의 물리화학적 특성 검사

분리된 endoglucanase의 반응최적온도를 알기 위하여 CMC를 기질로 사용하여 30°C 부터 80°C까지(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 5°C 간격으로 측정하였으며, 열안정성 검사를 위하여 효소를 50°C 부터 70°C까지 10°C 간격으로 각각 (초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 12 시간 동안 방치한 후 표준조건에서 잔여활성을 검사하였다. 반응최적 pH를 알기 위하여 효소와 CMC의 반응혼합물을 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 15 분 반응시켰다. 효소의 pH 안정성 검사는 효소를 pH 3.0-8.0 (pH 3.0-5.0, 50 mM 초산완충용액; pH 6.0-8.0, 50 mM 인산완충용액)사이에서 1.0 간격으로 변화시켜 24시간 4°C 에서 방치한 후 잔여 활성을 표준 조건에서 검사하였다.

전기영동

SDS-전기영동은 Laemmli (15)의 방법을 사용하였으며 acryl-

amide 농도는 12.5%, cross linkage는 2.7%인 slab gel을 사용하였다. 단백질 band의 확인을 위하여서는 SE250 mighty small slab 전기영동장치(Hoefer, San Francisco, USA)를, transfer 후 분석을 위해서는 SE600 slab 전기영동장치(Hoefer)를 사용하였다. Isoelectric focusing은 20% ampholyte (BIO-RAD, Hercules, USA, pH 4.0-6.5)를 사용하였고 acrylamide의 농도는 5%, cross linkage의 농도는 3% 를 사용하였다. Focusing은 1M H₃PO₄와 1M 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.

단백질서열

F-I-III의 단백질 서열 분석은 Towbin 등(28)의 방법에 따랐다. 효소 10 μg 을 SDS-PAGE상에서 전기영동한 후 PVDF (Sigma, USA) membrane에 옮겼다. PVDF membrane을 Coomassie Blue R-250으로 염색하고 증류수로 탈색하였다. Band를 자른 후 5 μg 의 pyroglutamate aminopeptidase (Boehringer, 50 mM 인산완충용액, pH 7.0, 10 mM DTT)으로 37°C에서 1시간 처리하였다. 이를 다시 증류수로 세척, 건조한 후 기초과학지원연구소(서울)에 의뢰하여 Procise protein sequencing system (Applied Biosystems)으로 분석하였다.

결 과

효소(F-I-III)의 분리

Trichoderma sp. C-4에서 분리되는 endoglucanase는 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography에 의해 고분자량을 가진 것(F-I)과 저분자량을 가진 것(F-II)으로 분리됨은 이미 보고한 바와 같다(27). F-I 부분을 분획 수집한 후, 완충용액을 인산완충용액으로 교환하고 이를 DEAE-Sepharose에서 분리한 결과, 3종류의 endoglucanase와 2종류의 exoglucanase(25) 및 1종류의 β -glucosidase(32)가 포함되어 있음을 알 수 있었다. 이 들 중 F-I-III 부분을 수확하여 완충용액을 histidine 완충용액 (25 mM, pH 5.5)으로 교환한 다음 동일한 완충용액으로 충전된 Mono-P column에 적하하였다. 이를 다시 Polybuffer74 (1:10 희석, pH 3.5)를 흘려주어 용출한 결과, 단백질의 peak와 효소활성도의 peak가 일치하는 효소 분획을 얻을 수 있었다. 분리된 F-I-III는 조효소에 비하여 15배의 비활성을 보였고, 조효소 CMCase 총활성 대비 3.6%의 회수율을 보였다(Table 1). 분리된 단백질의 순도를 확인하기 위해 SDS-전기영동을 시행하였다. 정제된 효소는 전기영동 gel 상에서 단일 band를 보였다(Fig. 1). 이 효소의 등전점은analytical isoelectric focusing에서 4.9로 측정 되었다. 이렇게 얻어진 효소 시료를 특성구명 실험에 사용하였다. 이 효소는 SDS-PAGE상에서 분자량이 56 kDa 정도인 것으로 추정되었다. Sephadex G-100을 이용한 gel-filtration chromatography 에서 분자량이 60 kDa으로 측정되었기 때문에 (자료 미제시) 이 효소는 단일 단백질로 구성되어있음을 알 수 있었다.

Table 1. Purification of endoglucanase, F-I-III, from *Trichoderma* sp. C-4

	Total activity (U)	Total protein(mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude extract	6090	291	20.9	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	3321	101	32.9	1.6	54.5
Sephacryl S-200	1405	29.3	48.0	2.3	23.1
DEAE-sepharose	417	5.1	81.8	3.9	6.8
Mono P	221	0.7	315.4	15.1	3.6

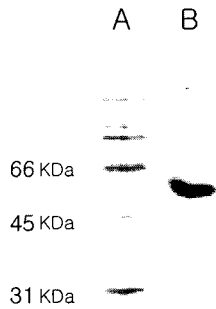


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified endoglucanase, F-I-III, from *Trichoderma* sp. C-4. (A) Lane 1 contained protein standards with molecular weights of 200,000, 116,000, 97,000, 66,000, 45,000, 31,000, 21,000, 14,400, 6,500. (B) Lane 2 was loaded with 0.5µg of purified F-I-III. The gel was stained with Coomassie blue R-250.

효소의 반응 최적조건 및 안정성

분리된 효소 F-I-III는 55°C 에서 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 2). 효소는 50°C에서는 24시간 동안 안정하였고, 60°C 에서 10분 후에 10% 의 활성을 상실하였으며, 60분 후에는 50%의 활성을 보유하고 있었다. 70°C 에서 10분 후에 50%의 활성을 상실하였으나, 60분 후에도 30%의 활성을 보유하고 있어서 비교

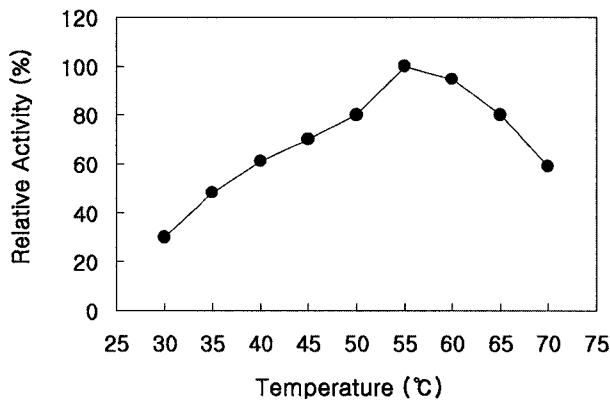


Fig. 2. Optimum temperature of endoglucanase, F-I-III. Relative activities were determined at pH 5.0 and at different temperature by a standard activity assay. The value at 55°C was taken as 100%. The enzyme activities were measured as an average of 3 sets.

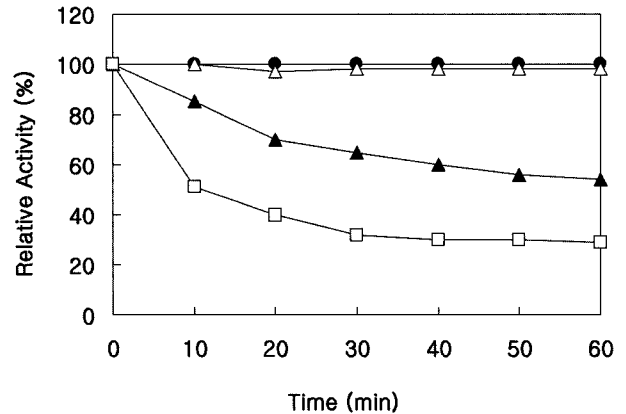


Fig. 3. Effect of temperature on the stability of endoglucanase, F-I-III. Temperature stability was determined by incubating the enzyme at the indicated temperature for 10 to 60 min and measuring the residual activity under standard conditions. Relative activities were measured at pH 5.0 and at different temperatures. The value at 0 min was taken as 100 %. Symbols: ○; 30°C, ●; 40°C, △; 50°C, ▲; 60°C, □; 70°C.

적 열에 안정함을 나타내었다(Fig. 3). 분리된 F-I-III의 반응최적 pH를 측정하기 위하여 pH 3-8 사이에서 효소 활성을 측정한 결과 pH 5.0에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig 4). F-I-III는 측정된 pH 범위에서 비교적 안정하여 pH 3.0에서 24시간 후에 70%의 활성을 유지하였다.(Fig 5) 효소활성에 대한 금속이온과 reducing agent의 영향을 측정하기 위하여 이들을 최종 농도 1

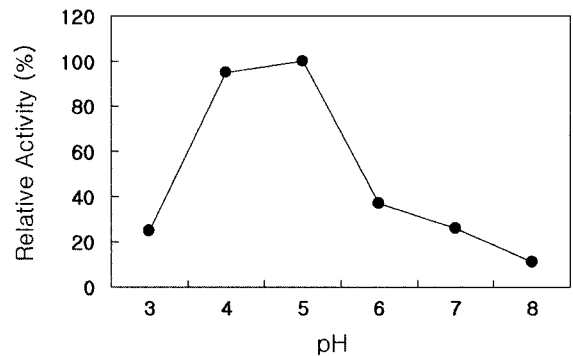


Fig. 4. Optimum pH of endoglucanase, F-I-III. Relative activities were determined at 40°C and at different pH with 50 mM citrate buffer for pH 3.0, and 50 mM acetate buffer for pH between 4.0 and 6.0, and 50 mM phosphate buffer for pH 7.0 and 8.0. The value at pH 5.0 was taken as 100 %.

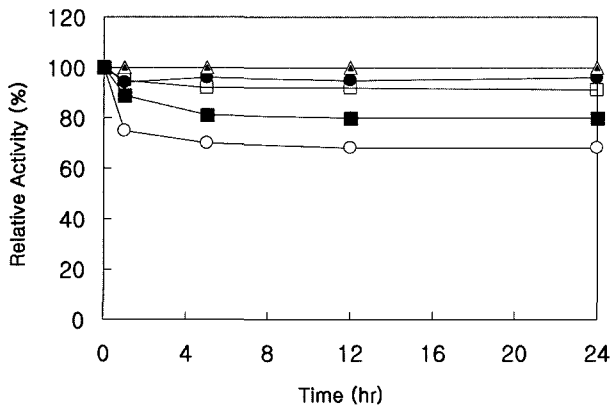


Fig. 5. Effect of pH on the stability of endoglucanase, F-I-III. pH stability was determined by incubating the enzyme overnight in either acetate (pH 3 - 5) or phosphate buffer (pH 6 - 8) at 5°C and measuring the residual activity under standard conditions. Symbols: ○ ; pH 3.0, ● ; pH 4.0, △ ; pH 5.0, ▲ ; pH 6.0, □ ; pH 7.0, ■ ; pH 8.0.

mM로 조절하고 상온 에서 1시간 방치한 후 잔여 활성을 측정하였다. Table 2에 제시한 바와 같이 측정된 대부분의 금속이온에 영향을 거의 받지 않았으며 reducing agent들도 대부분 효소의 활성을 증가시킴을 알 수 있었다.

효소의 활성도

효소 F-I-III는 CMC에 대하여 40°C에서 315.4U/mg의 비활성을 나타내었다. PNPG2를 사용한 반응에서 PNP를 유리하였으며 2.69 mM의 Km 값과 519U/mg의 비활성을 나타내었다 (자료 미 제시). 효소의 결정형 섬유소 분해에 대한 상승 작용을 조사하기 위하여 세 종류의 endoglucanase (F-I-II; EII, F-I-III; E3, F-II-II; EIV) 및 한 종류의 exoglucanase (CII)를 본 균주에서 분리하였다. Fig. 6에 제시한 바와 같이 endoglucanase 들만을 섞을 경우에는 상승효과가 없거나 약간 감소함을 보였으나, exoglucanase를 첨가한 경우 상승 효과를 나타내었다.

Table 2. Stability of endoglucanase, F-I-III, against metal ions and reducing agents

Reagent (1 mM)	Relative activity (%)
Metal ions	
MgCl ₂	93.1
CoCl ₂	116.3
FeCl ₂	96.2
CaCl ₂	109.8
CsCl	106.8
LiCl	107.8
Reducing agents	
Cystein	110.5
EDTA	107.1
β-Mercaptoethanol	120.3
Dithiothreitol(DTT)	121.2
L-Ascorbic acid(Vitamin-C)	137.7

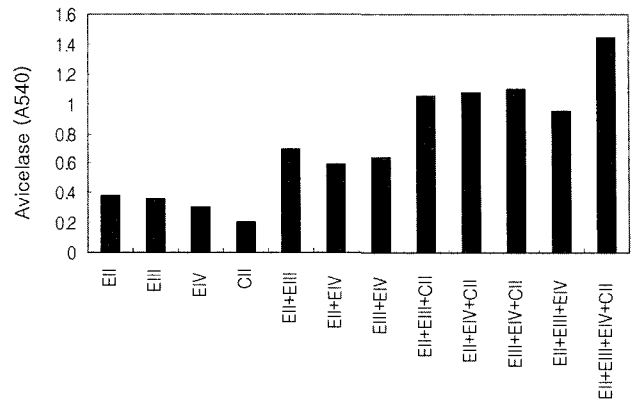


Fig. 6. Relative Avicelase activities of endoglucanases and exoglucanase of *Trichoderma* sp C-4, alone and in combination. One of the exoglucanase of *Trichoderma* sp C-4, CII, was purified by the methods of Sul (25). The endoglucanases F-I-II (EII) and F-II-II(EIV) were purified as described previously (26,27), and F-I-III(EIII) was purified as described in methods. The amount of each enzyme used in this assay was enough to detect the enzyme activity, but not to reach the maximum level. The enzyme activities were measured as an average of 3 sets.

단백질 서열 분석

정제된 효소의 N-말단에 pyroglutamate aminopeptidase를 처리하여 blocking을 제거하고 서열을 분석한 결과 QPGTSTPEVHP KKLITYK의 서열을 얻었다. 이 같은 서열은 *T. reesei*의 EGI의 N-말단서열과 95%의 유사도를 보였다.

고찰

Cellulose는 포도당이 β-1,4 결합으로 중합된 고분자물질로서 이를 이용하기 위하여 좋은 분해효소가 필요하다. 본 연구진이 국내의 벚짚에서 분리한 *Trichoderma* C-4는 이미 우수한 균주로 알려져 많은 연구가 이루어 지고 있는 *T. reesei*와는 다른 균이면서, 상당히 유사한 효소 체계를 갖고 있음을 보고한 바 있다(24). C-4균주에서 분리한 F-I-II는 cloning 결과 *T. reesei* EGII와 90%의 염기서열 유사성을 보임을 보고한 바 있다(26). 본 논문에서는 C-4균주가 분비하는 endoglucanase중 F-I-III를 분리하고 그 성격에 대하여 조사하였다. F-I-III는 N-terminal의 18아미노산 서열 분석 결과 *T. reesei*의 EGI와 95%의 유사성을 보였다. F-I-III는 분자량 56kd, pI 4.9로 측정 되었는데, *T. reesei* EGI은 분자량 54kd, pI 4.7로 보고되었다. *T. reesei* EGI은 분비되는 효소의 6-10% 를 차지하며, 오늘날 섬유소 분해효소 생산에서 가장 중요한 효소의 하나이다(8, 18, 22). F-I-III는 CMC에 대하여 315.4 U/mg의 높은 비활성을 보이고 있다. 이러한 활성은 *T. reesei* EGIII (351 U/mg) 등 주요한 섬유소 분해효소 생산균들의 endoglucanase의 비활성과 비견할 만한 값이었으며(8, 20), *Penicillium funiculosum* (20 U/mg) (13) 등 많은 균주들의 효소의 비활성 보다 높은 것이었다. Endoglucanase는 그 자체만으로는 cotton이나 filter paper 또는 Avicel 과 같은 천연 섬유소를 분해하는 능력이

낮다. 따라서 exoglucanase 또는 β -glucosidase 와의 상호작용에 의한 섬유소 분해가 중요하다(14). 이 효소와 본 C-4균주에서 분리된 다른 endoglucanases (EII, EIV) 및 exoglucanase (CBIII) 와의 혼합반응에서 결정형섬유소인 Avicel의 분해에 대하여 상승 작용을 가짐을 보여주었다. F-I-III와 endoglucanase만 섞을 경우에는 Avicel 분해에 오히려 약간의 감소를 나타내었는데, 이는 기질에 대한 경쟁의 결과로 설명될 수 있다. 이러한 endoglucanase 사이의 경쟁 현상은 효소의 농도가 높을수록 심해짐이 보고된 바 있다(31). 본 논문에서는 C-4의 F-I-III는 현재 산업적으로 가장 널리 이용되는 섬유소분해효소 분비균주인 *T. reesei*에서 분비되는 효소와 화학적 성질 및 비활성이 유사한 정도로 우수한 효소학적 성질을 갖고 있음을 보여주고 있다. 그러나 분비되는 효소의 양은 그리 많지 않음을 Table 1은 보여주고 있다. 효소의 분비량이 적은은 C-4균주의 단점이다. 이 효소의 생산성 향상과 효율적인 이용을 위하여 현재 F-I-III효소 유전자에 대한 cloning 이 진행 중에 있다.

감사의 글

본 논문은 2003년 울산대학교의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

- Ait, N., N. Creuzet, and J. Catteno. 1979. Characterization and purification of thermostable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90, 537-546.
- Ait, N., N. Creuzet, and J. Catteno. 1982. Properties of β -glucosidase purified from *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.* 128, 569-577.
- Berghem, L.E.R. and L. G. Pettersson. 1973. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose. *Eur. J. Biochem.* 37, 21-30.
- Berghem, L.E.R. and L.G. Pettersson. 1974. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Isolation and some properties of α -glucosidase of *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* 46, 295-305.
- Berghem, L.E.R., L.G. Pettersson, and U.B. Axio-Fredriksson. 1975. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Characterization and enzymatic properties of α -1,4- β -glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* 53, 55-62.
- Chirico, W.T. and R.D. Brown. 1987. β -Glucosidase from *T. reesei*; substrate-binding region and mode of action on [1-³H] cellobiosaccharide. *Eur. J. Biochem.* 165, 343-351.
- Deshpande, V., K.E. Eriksson, and B. Pettersson. 1978. Production, purification and partial characterization of 1,4- β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90, 191-198.
- Durand, H. 1984. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 175-180.
- Eriksson K.E., and S.G. Hamp. 1978. Regulation of endo-1,4- β -glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* 90, 183-190.
- Halliwell, G., and M. Griffin. 1973. The nature and mode of action of the cellulolytic component C1 of *T. koningii* on the native cellulose. *Biochem. J.* 135, 587-594.
- Henrissat, B., H. Driguez, C. Viet, M. Shulein. 1985. Synergism on cellulose from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technol.* 3, 722-726.
- Irwin, D.C., M. Spezio, L.P. Walker, and D.B. Wilson. 1993. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnol. Bioengineering* 42, 1002-1013.
- Mishra, C., and M. Rao. 1988. Mode of action and synergism of cellulases from *Penicillium funiculosum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 19, 139-150.
- Kleman-Leyer, K.M., M. Siika-Aho, T.T. Teeri, and T.K. Kerk. 1996. The cellulases Endoglucanase I and cellobiohydrolase II of *T. reesei* act synergistically to solubilize native cotton cellulose but not to decrease its molecular size. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2883-2887.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lin, E., and D.B. Wilson. 1987. Regulation of β -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1352-1357.
- 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.
- Ng, T.K., and J.G. Zeikus. 1981. Comparison of extracellular cellulase activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 231-240.
- Maccaron, R., C. Acebal, M.P. Castillon, J.M. Dominguez, I. Mata, G. Pettersson, P. Tomme, and M. Claeysens. 1993. Mode of action of endoglucanase III from *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 289, 867-873.
- Mach, R.L., and S. Zeilinger. 2003. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 515-522.
- Mandels, M., and E.T. Reese. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* 79, 816-826.
- Miettinen-Oinonen, A., and P. Suominen. 2002. Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulose preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. *App. Environ. Microbiol.* 68, 3956-3964.
- 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 celluloses. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 346-353.
- Sul, O.J. 2000. Molecular and biochemical characterization of cellulase from *Trichoderma* type C-4 (Ph.D. Thesis in Department of Biological Sciences, University of Ulsan).
- Sul, O.J., J.H. Kim, S.J. Park, Y.J. Son, B.R. Park, D.K. Chung, C.S. Jeong, and I.S. Han. 2004. Characterization and molecular cloning of a novel endoglucanase from *Trichoderma* sp. C-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 63-70.
- Sul, O.J., J.Y. Choi, Y.J. Son, J.W. Shin, I.S. Han, D.K. Chung, and C.S. Jeong. 2000. Characterization of endoglucanase (F-II-II) from *Trichoderma* sp. C-4. *Kor. J. Microbiol.* 36, 20-25.

28. Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
29. Wood, T.M., and S.I. McCrae. 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*: Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem. J.* 171: 61- 72.
30. 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.
31. Woodward, J., M. Lima, and N.E. Lee. 1988. The role of cellulase concentration in determining the degree of synergism in the hydrolysis of microcrystalline cellulose. *Biochem. J.* 255: 895-899.
32. Yun, S.I., C. S. Jeong, D. K. Jeong, and H. S. Choi. 2001. Purification and some properties of a β -glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2028-2032.

(Received December 6, 2004/Accepted January 27, 2005)

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

Ok Ju Sul, Dae Kyun Chung¹, In Seob Han, and Choon Soo Jeong*(Department of Biological Science, University of Ulsan, Ulsan, 680-749, Korea, ¹Institute and Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences, Kyung-Hee University, Suwon, Korea)

One of the endoglucanases, F-I-III, was purified from the culture filtrate of *T. sp.* C-4 through procedures including chromatography on Sephacryl S-200, DEAE-Sepharose A-50, and Chromatofocusing on Mono-P (FPLC). The molecular weight of the enzyme was determined to be about 56,000 Da by SDS-PAGE, and pI of 4.9 by analytical isoelectric focusing. F-I-III showed the highest enzyme activity at 55°C, and the pH optimum of the enzyme was 5.0. There was no loss of activity when the enzyme was incubated at 50°C for 24 hours. The specific activity of the enzyme F-I-III toward the CMC was 315.4 U/mg. The Km value for PNP₂ of F-I-III was 2.69 mM. N-terminal sequence of F-I-III was analyzed to be QPGTSTPEVHPKLLTTYK. It showed 95% of homology to that of EGI from *T. reesei*. The presence of some metal ions (1 mM) had only a little effect on CMCase activity. The treatment of the reducing agents resulted in the increase of endoglucanase activity.