

GOVP1200208426

636.085
L 293 d

(19th)

최 중
연구보고서

유전공학기법을 이용한 고기능, 고효율 단위가축용
미생물 사료의 개발

Development of effective microbial feed for
domestic animals using recombinant DNA
technology.

경희대학교

농림부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유전공학기법을 이용한 고기능, 고효율 단위가축용 미생물 사료의 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 10 월 30 일

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 : 정 대 균

세부연구책임자 : 정 대 균

연 구 원 : 남 수 완

연 구 원 : 조 광 근

연 구 원 : 이 홍 구

협동연구기관명 : 울산대학교

협동연구책임자 : 한 인 섭

협동연구책임자 : 최 혜 선

협동연구책임자 : 정 춘 수

요 약 문

I. 제 목

유전공학기법을 이용한 고기능, 고효율 단위가축용 미생물 사료의 개발

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 세계적으로 유전공학기법을 이용한 고기능, 고효율 단위가축용 미생물 사료 개발에 관한 연구가 다방면으로 진행되고 있다. 본 연구개발의 목적은 유전공학기법을 이용하여 고역가 cellulase등을 효율적으로 생산, 분비하는 효모 재조합 균주를 개발하고, 이를 이용하여, 단위가축용 고기능, 고효율 미생물사료를 개발하는 것이다.

현재 우리나라와 세계 여러나라의 가축에서 볼 수 있는 소화불량이나 사료흡수율 저하 등의 문제는 사용하는 사료의 성분에 그 원인이 있다. 따라서 소화불량 치료나 사료흡수율 제고를 위한 심도있는 연구가 지속적으로 필요하다.

전 세계적으로 배양된 미생물을 사료에 직접 첨가함으로써 가축의 성장에 도움을 주고자 하는 연구가 최근에 활발히 진행되고 있으며, 현재까지 개발되어 상품화된 예로서 *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm)와 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* fermentation extract등이 있다. 이러한 상품들은 소와 돼지에서 증체량과 산유량을 증가시키며 사료의 소화흡수율을 높이는 효과를 나타내어 선진국에서 사료첨가제로서 널리 사용되어 지고 있다.

그러나, *Aspergillus oryzae* fermentation extract(Amaferm외 몇종)와 *Saccharomyces*

cerevisiae culture는 사용된 균주의 특성상 가축의 소화불량과 낮은 소화 흡수율의 주 원인이 되는 cellulolytic biomass를 효과적으로 분해할 효소가 전혀 없거나, 극히 소량만이 존재하는 문제점이 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구진은 endo-cellulase와 exo-cellulase 그리고 β -glucosidase의 활성이 매우 높은 우수한 균주(*Trichoderma sp.* C4)를 분리 동정하였다. 본 연구과제는 *Trichoderma sp.* C4의 섬유소 분해 효소의 유전자를 규명하고, cloning 한 후, 이를 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에 형질전환시켜, 섬유소 분해능이 뛰어난 미생물제제를 개발하는데 그 목적이 있다. 본 연구과제를 통해 개발된 고효율 cellulase 분해능을 가진 재조합효모와, 이를 이용한 미생물사료는 가축의 생산성 극대화, 축산능가의 생산경비 절감과 고품질 축산물 생산등의 효과를 제공할 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

유전공학기법을 이용한 고품능, 고효율 단위가축용 미생물 사료 개발을 위하여 본 연구진은 우수한 cellulose분해 균주인 *Trichoderma sp.* C4의 cDNA library구축과 구축된 cDNA library에서 섬유소 분해 효소(endoglucanase, β -glucosidase, exoglucanase, xylanase)를 screening하였다. screening된 섬유소 분해 효소 유전자들을 T-vector에 cloning하여 DNA sequencing을 통해 유전자를 분석하였다. 또한 이 효소들을 효율적으로 분비하는 효모 재조합 균주를 개발하기 위하여 다양한 종류의 효모용 벡터들을 사용하여 연구를 수행하였고, 재조합 효모 균주의 우수 섬유소 분해 효소 대량생산 및 최적발효조건 결정을 하기 위해 배양 연구를 실시하였다. 그리고, 개발된 재조합 효모 균주의 효능 검증 시험 및 시제품의 동물사양시험을 실시하여 사료첨가용 미생물 제제로서의 가능성을 시험하였다. 또한 *Trichoderma sp.* C4 균주로부터 우수 섬유소 분해 효소들을 순수 분리 정제하여 효소학적연구를 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 본 연구기관의 연구개발 결과

가. *C. thermocellum* 유래 endoglucanase (celA)를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

효과적이고 강력한 효모 생균제제의 개발을 위해 endoglucanase (celA)를 대량생산하는 재조합 효모 균주를 개발하였다. 즉, *C. thermocellum* 유래의 내열성 endoglucanase 유전자 (celA)를 pVT-103U에 삽입시켜 pVT-CT1를 구축한 후, 효모 (SEY2102)에 형질전환시켜 효모 형질전환주를 얻었다.

나. *Trichoderma sp.* C4 유래 endoglucanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

Trichoderma sp. C4 유래의 endoglucanase 유전자를 pVT-103U vector에 삽입하여 pVT-C4 plasmid를 제작하였다. 3종의 재조합 효모균주(*S. cerevisiae* YNN27/pVT-C4, *S. cerevisiae* 2805/pVT-C4, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-C4)를 발효조 회분배양한 결과, 균체증식(38 OD₆₀₀)과 총발현량(1003unit/mL) 및 비활성(26 unit/mL/OD₆₀₀)에서 SEY2102 균주가 가장 우수한 반면, plasmid 안정성(80% 이상) 및 분비효율(80% 이상)은 숙주세포에 따른 차이가 크지 않았다. 따라서 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-C4를 이후의 유가배양을 통한 endoglucanase 고발현·생산연구에 사용하였다.

다. *Trichoderma sp.* C4 유래 endoglucanase 발현 수를 극대화를 위한 고발현 재조합 *P. pastoris* 효모 균주의 개발

pVT103-U에 cloning 되어 있는 *Trichoderma sp.* C4 endoglucanase(pVT-103U)를 AOX1 promoter를 가지고 있는 pPICZ α A vector에 PCR방법을 이용하여 1.4kb의 endoglucanase를 cloning하여 pPICZ α A/C4 endo를 구축하였다. 그리고, 이 plasmid를 *P. pastoris*에 형질전환 시켜 재조합 균주를 개발하였다.

라. *Trichoderma sp.* C4 유래 β -galactosidase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

β -glucosidase 고발현 재조합 균주를 개발하기 위해 pVT-103U vector에 *Trichoderma sp.* C4 유래의 β -glucosidase gene을 cloning하여 효모에 형질전환시켜 재조합 효모 균주를 개발하였다.

마. *Trichoderma sp.* C4 유래 exoglucanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

당초 연구계획에는 없었지만, 연구의 효율적 수행으로 *Trichoderma sp.* C4의 exoglucanase 발현 재조합 효모 균주를 추가로 개발하였다.

바. *Trichoderma sp.* C4 유래 Xylanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

본 연구진은 당초 연구계획에는 없었지만, 연구의 효율적 수행으로 *Trichoderma sp.* C4의 cDNA libraries에서 xylanase gene을 screenig하였으며, xylanase gene를 이용하여 *Trichoderma sp.* C4 유래의 Xylanase 발현 재조합균주를 추가로 개발하였다.

사. 재조합 효모 균주의 *in vitro* 효능검증 및 동물사양 실험

미생물제제의 개발을 목적으로 다양한 cellulolytic enzyme 효모형질전환체를 가지고 *In vitro* NDF/ADF 분해율을 측정하였다. 측정결과, cellulose를 완전히 분해하는데는 endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase 의 3가지 효소의 복합 synergism에 의한 효과가 더 우수하다는 결과를 얻었다.

또한 동물사양실험을 수행함으로써 증체량, 사료섭취량 및 사료요구율실험을 측정하였다.

아. *Trichoderma sp.* C4 유래 endoglucanase 유전자의 확보

Trichoderma sp. C4의 endoglucanase 유전자를 확보하기 위하여 cDNA library를 성공적으로 제작하였고, 제작된 cDNA library에서 endoglucanase screening한 결과 positive clone을 찾아내었다. 이 clone을 분석한 결과, endoglucanase유전자인 것으로 밝혀졌다. 그리고 DNA sequencing을 통해 염기 서열을 분석한 결과 *Trichoderma reesei*와의 상동성이 높음을 알게 되었다.

자. *Trichoderma sp.* C4 유래 β -glucosidase 유전자의 확보

Trichoderma sp. C4의 cDNA library를 이용하여 β -glucosidase 유전자를 screening 하였다. screening에 의해 찾아낸 positive clone을 분석한 결과, β -glucosidase 유전자 인 것으로 밝혀졌다. 그리고 DNA sequencing을 통해 분석된 염기 서열을 *Trichoderma reesei*의 β -glucosidase 비교해본 결과 상동성이 높음을 알게 되었다.

차. *Trichoderma sp.* C4 유래 exoglucanase 유전자의 확보

Trichoderma sp. C4의 cDNA library를 screening하여 exoglucanase 유전자를 찾아내었다. DNA sequencing을 통해 분석된 염기 서열을 *Trichoderma reesei*를 비롯한 효모의 β -glucosidase 비교해 본 결과 상동성이 낮아, 신규 단백질로 추정된다.

카. *Trichoderma sp.* C4 유래 endoglucanase의 분리, 정제 및 활성측정

Trichoderma sp. C4 균주를 Mandel's media에 넣어 6일간 배양후 extracellular media를 사용했다. Sephacryl S-200이 충전된 column을 이용하여 분리 및 정제를 하였다. 순수 분리, 정제된 endoglucanase를 화학적, 물리적 연구를 실시하여 pH 5.0에서 가장 활성이 높음을 알 수 있었다.

타. *Trichoderma sp.* C4 유래 β -glucosidase의 분리, 정제 및 활성측정

순수 분리, 정제된 β -glucosidase의 효소학적 특성에 관한 연구를 진행하였다. β -glucosidase의 온도에 의한 반응속도의 상대적 변화율 측정은 35-45°C에서 반응최대 이고 100°C에서도 80-84%의 활성을 보유하고 있었다. pH 5.0에서 가장 활성이 높았다.

파. *Trichoderma sp.* C4 유래 exoglucanase의 분리, 정제 및 각종 cellulase들 사이의 synergism 측정

Sephacryl S-200이 충전된 column을 이용하여 exoglucanase를 분리, 정제하였다. 또한, 우수 섬유소 분해 효소 사이의 synergism 측정 결과, endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase등 3가지 종류의 효소가 모두 들어갔을 때 가장 활성이

높았다.

2. 본 연구기관의 연구개발 활용에 대한 건의

본 연구결과로 개발된 미생물 제제는 가축의 생산성 극대화, 농가의 생산경비 절감과 품질의 고급화에 기여할 수 있다. 또한 활성이 높은 섬유소분해 유전자의 확보는 그 유전자만으로도 귀중한 산업적 정보가 되어 국내의 cellulase 활용 산업에 즉각적으로 적용될 수 있을 뿐 아니라 유효 유전자를 산업화하고자 하는 세계의 여러 연구자들에게 제공될 수 있다.

한편, 향후 자동차 대체연료로서 기대되는 에탄올 생산에 이용될 수 있고, 농·임산 부산물 및 쓰레기등의 처리에 필요한 미생물제제로 개발로도 가능하며, 각 산업의 각 공정에 적당한 효소를 선별 이용함으로써 공정의 경제성과 합리성을 기할 수 있다.

SUMMARY

I . Title

Development of effective microbial feed for domestic animals using recombinant DNA technology

II . Purpose and importance of Research and Development

Development of highly effective microbial feed for domestic animals using genetic engineering is being done extensively around the world. Purpose of this research is development of highly effective microbial feed for domestic animals, by using the recombinant yeast strains that produce very active cellulases. Many problems such as indigestion and low feed efficiency in the domestic animals are mainly due to the composition of feed having cellulosic materials. Therefore, there are great demands on research to solve these problems.

Researches to promote growth of the domestic animals by feeding cultivated microorganism are being performed worldwide. For examples, *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) and *Saccharomyces cerevisiae* fermentation extract were commercialized. However, these strains have little or no enzymes to degrade cellulolytic biomass in nature.

To solve this problem, we screened *Trichoderma sp. C4*, which produces very active endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase. The genes responsible for these cellulases have been cloned and transformed into *Saccharomyces cerevisiae*, result in cellulase producing recombinant yeast strains.

The recombinant yeast strains and microbial feed fortified with these strains have been developed by our research, and these will give good quality of domestic animals and reduce the production cost.

III. Contents and extents of Research and Development

To develop highly effective microbial feed for domestic animals, we screened the genes encoding cellulolytic enzymes such as endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase and xylanase in the cDNA library of *Trichoderma sp.* C4. These genes were analyzed by DNA sequencing and cloned to develop recombinant yeast to overproduce cellulolytic enzymes. Fed-batch experiment was carried out for optimization and overproduction of cellulolytic enzymes. The possibility of recombinant yeast to be used as microbial admixture was examined via in vitro digestion test and animal test. In addition, the several cellulases were purified from *Trichoderma sp.* C4, and enzymological and biochemical studies were carried out.

IV. Results and proposal practical use of research

1. Results

A. Development of recombinant yeast strain that overproduces endoglucanase(*celA*) from *C. thermocellum*.

To develop highly effective microbial feed, recombinant yeast strain was constructed which can overproduce endoglucanase (*celA*). After thermophilus endoglucanase gene (*celA*) from *C. thermocellum* was cloned in pVT-103U, resulting in pVT-CT1, and this was transformed into yeast to construct recombinant strain to overproduce endoglucanase.

B. Development of recombinant yeast strain that overproduced endoglucanase(*celA*) from *Trichoderma sp.* C4

pVT-C4 plasmid was constructed by clone the gene of endoglucanase from *Trichoderma sp.* C4, in PVT-103U. Among three different transformed strains and vector systems, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-C4 was selected, due to its high cell mass(38 OD600), total activity(1003 unit/ml), and specific activity(26unit/mh/O.D600).

Plasmid stability(above 80%) and secretion rate(above 80%) were not affected by different systems and strains.

C. Development of recombinant *Pichia pastoris* strain for high expression of endoglucanase from *Trichoderma sp. C4*

The endoglucanase gene in pVT-C4 was cloned in pPICZ α A vector, resulting in pPICZ α A/C4 endo. This plasmid was transformed to *P. pastoris* to overproduce endoglucanase.

D. Development of recombinant yeast strain that overproduced β -glucosidase from *Trichoderma sp. C4*

To develop yeast strain to express high amount of β -glucosidase, the gene encoding β -glucosidase from *Trichoderma sp. C4* was cloned in pVT-103U and was transformed to yeast.

E. Development of recombinant yeast strain that overproduces exoglucanase from *Trichoderma sp. C4*

The recombinant yeast strain to produce exoglucanase from *Trichoderma sp. C4* was developed by cloning exoglucanase gene and transformation of recombinant plasmid into yeast.

F. Development of recombinant yeast strain that overproduces xylanase from *Trichoderma sp. C4*

Xylanase gene was cloned in the cDNA library from *Trichoderma sp. C4*. Recombinant yeast strain to produce xylanase from *Trichoderma sp. C4* was developed.

G. Efficacy test of developed microbial feed product

For test the efficacy of developed microbial feed product, *in vitro* test for digestion rate of NDF/ADF was conducted with developed yeast transformant. *In vitro* digestion test appeared that the product was effective.

H. Cloning of genes encoding cellulolytic enzymes from *Trichoderma sp. C4*

To clone genes encoding the cellulolytic enzymes such as endoglucanase, β -glucosidase and exoglucanase from *Trichoderma sp. C4*, cDNA library was constructed.

Several cellulases genes were cloned, and the nucleotide analysis showed the homologies with related reported enzymes. However, the similarity of exoglucanase was not significant.

I. Purification and activity test of endoglucanase from *Trichoderma sp. C4*

Trichoderma sp. C4 was cultured during six days in Mendel's media. Endoglucanase was purified by Sephacrl S-200 column. The purified endoglucanase was appeared to have the highest activity in pH 5.

J. Purification and activity test of β -glucosidase from *Trichoderma sp. C4*

β -glucosidase was purified and the activity of β -glucosidase was its highest in 35-45°C and maintained 80-84% in 100°C. Activity of β -glucosidase was its highest in pH 5.

K. Purification of exoglucanase from *Trichoderma sp. C4*, and Synergy effect with various cellulases of *Trichoderma sp. C4*.

Exoglucanase was purified by Sephacrl S-200 column. When three enzymes (Endoglucanase, Exoglucanase, β -glucosidase) were mixed together, the cellulase enzyme activity was the highest due to synergic effect.

2 . Suggestions for the application of research results

Developed microbial feed will contribute to the high efficiency of feed, reduction of production cost, and production of high quality domestic animals. In addition, several cellulases and their genes with high activities obtained in this research can be applied to related industry such as ethanol production and waste treatment.

CONTENTS

Chapter 1. Abstract

I .Purpose of Research and Development -----	18
II .Necessity of Research and Development -----	19
III.Expectation effect of Research and Development -----	20

Chapter 2. Generalization research result and extent

I .research and development's extent -----	22
1. Security of excellence cellulase degrading enzyme endoglucanase gene, identification of enzyme's particularity and development of recombinat strain -----	22
2. Security of excellence cellulase degrading enzyme β -glucosidase gene, identification of enzyme's particularity and development of recombinat strain -----	23
3. Security of excellence cellulase degrading enzyme exoglucanase gene, identification of enzyme's substrate particularity and development of recombinat strain -----	23
4. Security of excellence cellulase degrading enzyme xylanase gene and development of recombinat strain -----	23
5. Synergism measurements between various cellulases in <i>Trichoderma sp.</i> C4 ---	24
6. <i>In vitro</i> digestion test of developed microorganism manufacture and an animal specification experiment -----	24
II.Generalization research result -----	24
1. Development of recombination yeast strain that overexpressed excellence cellulase degrading enzyme -----	24
2. Effect test of recombination yeast strain -----	28
3. Security of excellence cellulase degrading enzyme gene of <i>Trichoderma sp.</i> C4 strain -----	29

4. Separation, purification and activity measurement of excellence cellulase degrading enzyme of <i>Trichoderma sp.</i> C4 strain	30
---	----

Chapter 3. Development of recombination yeast strain that over-produced excellence cellulase degrading enzyme

I. Research and Development method	35
1. Strain development that over-produced excellence cellulase degrading enzyme	35
2. Effect test of Recombinant yeast strain	36
II. Research and Development result and discussion	37
1. Development of recombinant yeast strain that overproduced endoglucanase (celA) from <i>C. thermocellum</i>	37
2. Development of recombinant yeast strain that overproduced endoglucanase from <i>Trichoderma sp.</i> C4	47
3. Development of recombinant <i>Pichia pastoris</i> strain for high expression yield rate of endoglucanase from <i>Trichoderma sp.</i> C4	60
4. Development of recombinant strain that overproduced β -glucosidase from <i>Trichoderma sp.</i> C4 and greatest expression yield rate	64
5. Development of recombinant strain that overproduced exoglucanase from <i>Trichoderma sp.</i> C4 and analysis of enzyme substrate particularity	67
6. Development of recombinant strain that overproduced xylanase from <i>Trichoderma sp.</i> C4 and of selection of high expression yield rate strain	77
7. Effect test of recombinant microbial feeds	81

Chapter 4. Security of excellence cellulase degrading enzyme gene

I. Research and Development method	87
1. cDNA library manufacture of excellence cellulase degrading strain	87

2. Screening of excellence cellulase degrading enzyme -----	87
3. Sequence analysis of excellence cellulase degrading enzyme gene -----	88
4. Endoglucanase promoter's cloning (inverse PCR) -----	88
II. Research and Development result and ancient temple -----	88
1. Security of <i>Trichoderma sp.</i> C4's Endoglucanase gene -----	88
2. Security of <i>Trichoderma sp.</i> C4's β -glucosidase gene -----	101
3. Security of <i>Trichoderma sp.</i> C4's exoglucanase gene -----	108
Chapter 5. Separation and purification of excellence cellulase degrading enzyme and identification of enzyme's particularity	
I. Research and Development method -----	112
1. Separation of excellence cellulase degrading enzyme -----	112
2. Identification of excellence cellulase degrading enzyme's particularity -----	112
3. Synergism measurement of excellence cellulase degrading enzymes -----	113
II. Research and Development result and discussion -----	114
1. Separation, purification and activity measuring of <i>Trichoderma sp.</i> C4's endoglucanase -----	114
2. Separation, purification and activity measuring of <i>Trichoderma sp.</i> C4's β -glucosidase -----	143
3. Separation and purification of <i>Trichoderma sp.</i> C4's exoglucanases -----	157
4. Synergism measurements between various cellulases of <i>Trichoderma sp.</i> C4 -	158
Chapter 6. Reference -----	162

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적	18
제2절 연구개발의 필요성	19
제3절 연구개발의 기대효과	20

제 2 장 총괄연구개발의 범위 및 연구결과

제1절 총괄 연구개발의 범위	22
1. 우수 섬유소 분해 효소 endoglucanase 유전자 확보, 효소 특성 규명 및 재조합 균주 개발	22
2. 우수 섬유소 분해 효소 β -glucosidase 유전자 확보, 효소 특성 규명 및 재조합 균주 개발	23
3. 우수 섬유소 분해 효소 exoglucanase 유전자 확보, 효소 기질 특이성 규명 및 재조합 균주 개발	23
4. 우수 섬유소 분해 효소 xylanase 유전자 확보, 효소 기질 특이성 규명 및 재조합 균주 개발	23
5. <i>Trichoderma sp.</i> C4의 각종 cellulase들 사이의 synergism 측정	24
6. 개발된 미생물재제의 효능 검증	24
제2절 총괄연구결과	24
1. 우수 섬유소 분해 효소를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발	24
2. 재조합 효모 균주의 효능검증	28
3. <i>Trichoderma sp.</i> C4 균주의 섬유소 분해 효소 유전자의 확보	29
4. <i>Trichoderma sp.</i> C4 균주의 섬유소 분해 효소 분리/정제 및 활성측정	30

제 3 장 섬유소 분해 우수 효소를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

제1절 연구개발 방법 -----	35
1. 섬유소 분해 우수 효소를 대량생산하는 균주 개발 -----	35
2. 재조합 효모 균주의 효능 검증 -----	36
제2절 연구개발 결과 및 고찰 -----	37
1. <i>C. thermocellum</i> 유래 endoglucanase(<i>celA</i>)를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발 -----	37
2. <i>Trichoderma</i> sp. C4 유래 endoglucanase를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발 -----	47
3. <i>Trichoderma</i> sp. C4 유래 endoglucanase 발현 수율 극대화를 위한 고발현 재조합 <i>Pichia pastoris</i> 효모 균주 개발 -----	60
4. <i>Trichoderma</i> sp. C4 유래 β -glucosidase를 발현하는 재조합 균주의 개발 및 발현 수율 극대화 -----	64
5. <i>Trichoderma</i> sp. C4 유래 Exoglucanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발 및 기질특이성 분석 -----	67
6. <i>Trichoderma</i> sp. C4 유래 Xylanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발 및 고발현 균주 선별 -----	77
7. 재조합 미생물 사료 시제품의 효능 검증 -----	81

제 4 장 섬유소 분해 우수 효소 유전자의 확보

제1절 연구개발 방법 -----	87
1. 섬유소 분해 우수 균주의 cDNA library 제작 -----	87
2. 섬유소 분해 우수 효소의 Screening -----	87
3. Screening한 섬유소 분해 우수 효소의 염기서열 분석 -----	88
4. Endoglucanase promoter의 클로닝 (inverse PCR) -----	88

제2절 연구개발 결과 및 고찰 -----	88
1. <i>Trichoderma</i> sp. C4의 Endoglucanase 유전자의 확보 -----	88
2. <i>Trichoderma</i> sp. C4의 β -glucosidase 유전자의 확보 -----	101
3. <i>Trichoderma</i> sp. C4의 exoglucanase 유전자의 확보 -----	108
제 5 장 섬유소 분해 우수 효소의 분리, 정제 및 특성 규명	
제1절 연구개발 방법 -----	112
1. 섬유소 분해 우수 효소의 분리 -----	112
2. 분리된 섬유소 분해 우수 효소의 특성 규명 -----	112
3. 분리된 섬유소 분해 우수 효소의 synergism 측정 -----	113
제2절 연구개발 결과 및 고찰 -----	114
1. <i>Trichoderma</i> sp. C4의 Endoglucanase 의 분리, 정제 및 활성 측정 ----	114
2. <i>Trichoderma</i> sp. C4의 β -glucosidase 분리, 정제 및 활성 측정 -----	143
3. <i>Trichoderma</i> sp. C4의 exoglucanases의 분리 및 정제 -----	157
4. <i>Trichoderma</i> sp. C4의 각종 cellulase들 사이의 synergism 측정 -----	158
제 6 장 참고문헌 -----	162

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적

현재 세계적으로 유전공학기법을 이용한 고기능, 고효율 단위가축용 미생물 사료 개발에 관한 연구가 다방면으로 진행되고 있다. 본 연구개발의 목적은 유전공학기법을 이용하여 고역가 cellulase등을 효율적으로 생산, 분비하는 효모 재조합 균주를 개발하여, 이를 상품화함으로써, 단위가축용 고기능, 고효율 미생물사료를 개발하는 것이다.

현재 *A. oryzae*, *T. reesei*등 배양된 미생물을 사료에 직접 첨가함으로써 가축의 성장에 도움을 주고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 1990년 미국 Bio-zyme회사에서 *Aspergillus oryzae* fermentation extract를 상품화하여 Amaferm이라는 상표로 우리나라를 비롯한 전 세계에 공급하고 있고, 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* culture등이 상용되고 있다. 이러한 상품들은 소와 돼지에서 증체량과 산유량을 증가시키며 사료의 소화흡수율을 높이는 효과를 나타내어 선진국에서 사료첨가제로서 널리 사용되어지고 있다. 그러나, *Aspergillus oryzae* fermentation extract(Amaferm)와 *Saccharomyces cerevisiae* culture는 사용된 균주의 특성상 가축의 소화불량과 낮은 소화 흡수율의 주원인이 되는 cellulolytic biomass를 효과적으로 분해할 효소가 전혀 없거나, 극히 소량만이 존재하는 문제점이 있다.

따라서 소화불량 치료나 사료흡수를 제고를 위해 cellulolytic biomass를 분해하는 활성이 높은 효소 및 균주를 찾는 연구가 지속적으로 진행되고 있다. 본 연구진이 한국농가에서 분리한 *Trichoderma sp.* C4 균주는 높은 비활성을 갖는 cellulase를 분비하는 균주로서 특허를 취득하였다. *Trichoderma sp.* C4 균주는 다양한 자연물을 획득한 후, 이들을 cellulose를 유일한 탄소원으로 하는 배지에 접종하여 분해능을 조사하여 1차 분리되었다. 1차 분리된 균주에 대하여 동일배지에 2차 선별함으로써 cellulose 분해능이 뛰어난 본 균주를 분리하였다. 분리된 본 균주의 cellulose분해에 필요한 endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase 활성을 측정 한 결과, Endoglucanase exoglucanase의 경우 *T. reesei*보다 CMCase, Avicelase activity가 각각 2배, 10배 높았다. β -glucosidase의 경우도 10배 정도 활성도가 높았다. 위의 연구를 바탕으로 본 연구과제는 *Trichoderma sp.* C4의 endoglucanase,

exoglucanase, β -glucosidase, xylanase 등의 유전자를 확보하였고, endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, xylanase 등의 효소를 생산하는 재조합 효모 균주를 개발하였다. 또한 개발된 재조합 효모 균주의 *in vitro* 소화율 시험을 실시하여, 사료 첨가용 미생물제제로서의 가능성을 확인하였고, 개발된 미생물제제를 이용하여 동물 사양실험을 실시하였다. 본 연구과제를 통해 개발된 고효율 cellulase 분해능을 가진 재조합효모는 가축의 생산성 극대화, 축산농가의 생산경비 절감과 고품질 축산물 생산 등의 효과를 제공할 것이다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

국내 주요 유전자원의 확보 차원에서 고효율 cellulase 유전자의 확보는 매우 중요하다. 또한 확보된 유전자를 이용한 다양한 cellulase 생산으로 상승적 효율향상을 도모할 수 있고, 대량생산을 위한 적합한 생산체와 유전자-vector recombinant의 조화로 인한 고효율 고기능성 사료개발이 이루어질 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

축산농가의 사료비 경감을 유도할 수 있으므로 소득의 증가를 꾀할 수 있을 뿐 아니라 축산물의 가격을 낮추는 효과를 가지므로 축산물의 소비자 물가를 안정화시킬 수 있고, 농·축산물 개방에 따라 축산물의 가격 경쟁력이 심해짐으로서 고품질 사료의 개발, 우수한 종자의 개발 등을 통한 육질의 향상과 생산성 증가는 가격경쟁력에서 우리축산 농가를 보호 할 수 있다.

또한, 유전공학적인 방법으로 미생물에서 효소의 대량생산은 효소의 효용성이 높은 현상황으로 볼때 대단히 경제성이 뛰어나며, 우리나라에서 사용되고 있는 축산물 사료의 원료, 또는 완제품의 대부분이 외국의 수입에 의존하고 있는 실정에서, 우리나라 기술을 이용한 고품질 축산물 사료의 자급화는 수입으로 인한 경제적 손실을 막을 뿐 아니라 부존자원의 효율성 향상에 이바지 할 수 있다.

3. 사회·문화적 측면

축산 사료의 고품질화와 더불어 사료의 외국 의존도의 감소는 어떤 수입 개방에도 우리나라 축산사업을 보호할 수 있으며 경쟁력 강화를 통한 산업 기술 상품의 수출에도 기여할 수 있고, 고가 축산물의 생산으로 기존의 경쟁력이 부족한 농업이나 다른 축산업에서 산업방향의 전환을 유도하여 농, 축산업 종사자들의 감소를 적극 막을 수 있는 장점을 가지고 있다.

우리나라 축산농가가 선진 축산 농가와 가격경쟁에서 이길 수는 없지만 저가의 미생물제제를 쓰게 됨으로써 품질면에서는 경쟁이 가능하게 되므로 축산업의 경제적 안정화로 축산농가의 사회적 가치를 높일 수 있다.

또한 세계 축산시장의 급작스런 변화에도 국내 축산농가를 보호할 수 있어 소비자나 생산자 모두에 의한 사회적 혼란을 막을 수 있고, 최근의 영국에서 일어난 광우병, 구제역과 같은 국민의 건강을 위협하는 사건을 예방하는 국민 보건에 이바지 할 수 있다.

제3절 연구개발의 기대효과

1. 기술적 측면

본 연구과제 수행으로 확보되는 endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase 효소는 다른 제품과 달리 외국에 기술료를 지불하지 않아도 됨으로서, 모든 기술들에 제약을 받지 않는다. 또한 유전공학적인 기술을 도입하여 미생물에서 유용 효소를 생산함으로써 대량생산이 가능하고, 효소 유전자의 조작 기술은 이미 사료첨가제등의 미생물제제가 시판되고 있어, 쉽게 농가에 접목시킬 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

본 연구과제 수행 결과, 각 종류의 cellulase가 미생물제제에서 대량생산되므로 가축의 영양적인 측면에서 대단한 효과를 기대할 수 있으며, 이는 바로 축산물의 질과 양에 지대한 영향을 주게 된다. 그리고, 고품질 사료의 자급화로 현재 대단히 많은 양을 외국으로부터 수입하고 있는 사료의 수입대체효과를 기대하며, 사료가격의 저하로

농가의 소득향상을 도모할 수 있다.

현재 효소관련시장이 급신장하는 추세에 있고, 효소공학기술의 잠재력과 산업신장을 고려 해볼 때, 각종 cellulase들을 대량생산하여 정제, 판매함으로써 얻어지는 경제적 이익도 클 것으로 예상된다.

제 1 장 총괄 연구개발의 범위 및 연구 결과

제1절 총괄 연구개발의 범위

본 연구는 유전공학기법을 이용한 고기능, 고효율 단위가축용 미생물 사료의 개발에 관한 연구로서 본 연구진에 의해 탐색된 우수한 cellulose분해 균주(*Trichoderma sp. C4*)의 cDNA library구축과 분리된 우수 분해 균주로 부터 분비되는 cellulase들의 효소학적연구, 우수 분해 균주의 cellulase 유전자들의 cloning및 DNA sequencing, 우수 분해균주의 cellulase를 대량생산하는 효모 재조합 균주의 개발, 재조합 균주의 cellulase 대량생산 최적발효조건 결정, 개발된 미생물사료 시제품의 효능 검증 시험 및 동물사양시험등을 실시하였다.

1. 우수 섬유소 분해 효소 endoglucanase 유전자 확보, 효소 특성규명 및 재조합 균주 개발

*Trichoderma sp. C4*균주의 cDNA library 제작을 하고, 섬유소 분해효소 유전자의 1st and 2nd screening을 통하여 endoglucanase 유전자를 cloning했다. cloning한 endoglucanase 유전자를 sequencing을 통해 유전자 분석 실험을 하였고, 재조합 효모 균주 개발을 위해 pVT103U에 cloning하여, 이를 효모 균주에 형질전환 시킴으로서 재조합 균주를 개발하였다. 한편, 재조합균주를 회분배양을 하여 endoglucanase 대량 생산을 위한 실험을 실시하였다. *Trichoderma sp. C4*균주의 endoglucanase 발현 재조합 효모 균주의 in vitro 소화 시험을 통해 새로운 미생물 재제의 가능성을 모색하였다. 그리고, endoglucanase를 정제함으로써 *Trichoderma sp. C4* 균주의 endoglucanase의 성질에 대한 기초 연구를 통해 endoglucanase의 효소학적 특성을 밝혀내었다. 또한 *C thermocellum* 유래의 내열성 endoglucanase를 pVT103U에 cloning하여 효모 균주에 형질전환 시킴으로서 재조합 효모 균주를 개발하였다. 이를 in vitro 소화 시험을 통해 사료첨가제로서의 이용 가능성을 시험하였다.

2. 우수 섬유소 분해 효소 β -glucosidase 유전자 확보, 효소 특성규명 및 재조합 균주 개발

Trichoderma sp. C-4 균주의 cDNA library를 이용하여 1st and 2nd screening을 하여 β -glucosidase 유전자를 cloning하였다. 이를 sequencing을 통해 유전자 분석 실험을 하였고, 재조합 효모 균주 개발을 위해 pVT103U에 cloning하여, 이를 효모 균주에 형질 전환 시킴으로서 재조합 균주를 개발을 시도하였다. 개발된 재조합 균주를 회분배양을 통해 대량 생산을 위한 실험을 실시하였고, β -glucosidase의 분리 및 정제를 통하여 β -glucosidase의 N-terminal sequencing하였고, 효소의 물리적, 화학적 효과를 검증하였다.

3. 우수 섬유소 분해 효소 exoglucanase 유전자 확보, 효소 기질특이성 규명 및 재조합 균주 개발

Trichoderma sp. C4 균주의 cDNA library를 이용하여 1st, 2nd screening을 하여 exoglucanase의 clone을 확보하는 실험을 수행하였다. 확보된 clone을 유전자 분석 실험을 수행하여 exoglucanase 유전자 염기 서열 규명을 시도하였다. 규명된 exoglucanase 유전자를 pVT103U에 cloning하여, 이를 효모 균주에 형질전환 시킴으로서 재조합 균주의 개발을 시도하였다. 또한, Exoglucanase의 활성염색 및 기질 특이성연구를 수행하기 위해 불용성 cellulose와 수용성 cellulose를 사용하여 Exoglucanase의 기질에 대한 cellulase 분해율 실험을 실시하였다. 그리고 회분배양을 통한 대량생산 실험 및 *in vitro* 소화시험을 통한 NDF, ADF 분해율 측정을 시도하였다.

4. 우수 섬유소 분해 효소 xylanase 유전자 확보, 효소 기질특이성 규명 및 재조합 균주 개발

Trichoderma sp. C4 균주의 cDNA library를 이용하여 1st, 2nd screening을 하여 xylanase의 clone을 확보하는 실험을 수행하였다. 수행 결과 얻어진 clone을 염기 서열 분석을 통해 xylanase 유전자를 확보하고, xylanase 유전자를 pVT103U에 cloning하여, 효모 균주에 형질전환 시킴으로서 재조합 효모를 개발하는 실험을 실시하였다. 그리고, 회분배양을 통해 대량생산을 시도하는 실험을 실시하였고, *in vitro* 소화시험을 통한 NDF, ADF 분해율 측정 실험을 하였다.

5. *Trichoderma sp.* C4의 각종 cellulase들 사이의 synergism 측정

Trichoderma sp. C4 균주에서 발견된 4가지 종류의 endoglucanase를 각각 정제하여 다양한 조합에서 CMCase의 활성을 측정하는 실험을 실시하였다. 그리고 cellulolytic activity를 향상 시키기 위하여 *Trichoderma sp.* C4 균주에서 분리한 exoglucanase, β -glucosidase를 첨가하여 CMCase의 활성을 측정하였다.

6. 개발된 미생물제제의 효능검증

개발된 endoglucanase, β -glucosidase, exoglucanase, xylanase를 대량 발현하는 재조합 균주를 발효조를 이용한 대량 생산후, 발효액 및 균주를 동결건조 시켜서 미생물 제제로서 이용가능성을 시험하였다. *in vitro* 소화 실험을 실시하였고, 닭을 이용한 동물사양 실험을 실시하였다.

제2절 총괄 연구 결과

1. 우수 섬유소 분해 효소를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발

가. *C. thermocellum* 유래 endoglucanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

효과적이고 강력한 효모 생균제제의 개발을 위해 cellulase 효소를 대량생산하는 유전자 재조합 *S. cerevisiae*를 제작하였다. 즉, *C. thermocellum* 유래의 내열성 endoglucanase유전자 (celA)를 효모 ADH1 또는 GAPDH promoter 하류에 연결하여 구성적 celA 발현 plasmid인 pVT-CT1를 구축한 후, 효모에 형질전환시켜 효모 형질전환주를 얻었다. YNN27, 2805 및 SEY2102의 세 종류 숙주세포와 ADH1 발현계를 구성적 CMCase 발현의 최적 host-vector계로 선정하였다.

나. *C. thermocellum* 유래 Endoglucanase 발현 수율 극대화

Flask에서와 발효조에서 회분배양한 결과, 균체증식과 plasmid 안정, 분비효율 및 단위균체당 endoglucanase 활성(비활성)은 큰 차이를 보이지 않았지만, endoglucanase 총발현량은 발효조 배양에서 약 40% 증가하였다.

또한, constant feeding 유가배양시 배양 말기의 균체 증식은 회분배양에 비해서

2.4배의 높은 균체 농도를 보여주었다. Plasmid 안정성은 초기 12시간 이후로 80%이상으로 plasmid 안정성이 계속 유지되었으며 endoglucanase 발현량은 세포내와 배지에서 모두 증가하는 양상을 보여주었는데 특히, 세포 내의 증가 양상이 두드러지게 나타났다. 총 발현된 endoglucanase 활성은 493 unit/L로 회분배양에 비해서 약 3.8배의 증가된 활성을 나타낸 반면 분비효율은 20%로 낮은 분비 효율을 보였다. 기질공급 속도를 16시간에서 36시간까지 2 g-glucose/hr와 36시간에서 59시간까지 3.6 g-glucose/hr의 속도로 조절하여 유가배양한 결과 Plasmid 안정성은 모두 80%이상이었으며, 균체 농도는 회분 배양에 비해서 각각 2.07배와 1.85배가 증가하였고, 총 발현된 endoglucanase 활성 또한 회분 배양에 비해 각각 4.36배와 3.15배로 증가하였고 유가배양에 의해 분비 효율은 42%로 크게 증가하였다.

다. *Trichoderma sp.* C4 유래 endoglucanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

섬유소 분해 우수 균주인 *Trichoderma sp.* C4유래 endoglucanase 유전자 (C4) 발현 재조합 효모 균주를 개발하기 위하여 본 연구진에 의하여 cloning된 *Trichoderma* 유래 endoglucanase 유전자 (C4endo)를 이용하여 효모 발현용 재조합 plasmid DNA를 성공적으로 제작하였고, 이를 3종류의 효모균주 (YNN27, 2805, SEY2102)에 transformation하여 최적 host-vector system을 결정하였다. 즉, *Trichoderma sp.* C4 유래의 endoglucanase 유전자를 *ADH1* promoter 하류에 연결하여 구성적 발현 plasmid인 pVT-C4를 제작한 후, 이를 3종의 *S. cerevisiae* 숙주 세포(YNN27, 2805, SEY2102)에 형질전환시켜 각 숙주세포당 80개의 형질전환체를 시험배양하여, 균체증식과 endoglucanase 발현량이 뛰어난 형질전환 효모 균주를 선별하였다. 3종의 재조합 효모를 YPD 배지에서 회분배양 했을 때, YNN27 균주가 가장 낮은 균체농도($OD_{600}=19$)를, 2805 균주가 가장 높은 균체농도($OD_{600}=33$)를 보였으며, 총 발현된 endoglucanase 활성은 균체농도에 의존적인 양상으로 나타나 YNN27의 경우 586 unit/l, 2805의 경우 1023 unit/l, SEY2102의 경우 1142 unit/l 순서로 증가하였다. 비활성(균체농도당 endoglucanase활성)은 세 균주 모두 31~34 unit// OD_{600} 값을 보여 단위 균체당 발현능 차이는 거의 없었다. Plasmid 안정성은 배양 72시간에서 세 균주 모두 80% 이상의 높은 값을 보였다. 발현된

endoglucanase의 분비 국재성은 세포밖 배지에 약 80%, periplasmic space 잔존 활성이 11~13%, 세포질 분획에서의 활성이 8~10% 정도로 세 균주에서 모두 비슷한 분포를 보였다. 또한, 재조합 효모균주에서 발현된 endoglucanase를 순수 분리하여 nondenaturing-PAGE 상에서 전형적인 당단백질의 disperse band를 두개 발견하였다. 세가지 숙주세포에 따른 재조합 endoglucanase 활성 band들의 이동상의 차이는 거의 나타나지 않고, 당쇄부가 양상은 야생형보다 훨씬 더 복잡하고 불균일하게 발생했음을 알 수 있었다.

라. *Trichoderma sp.* C4 유래 endoglucanase 발현 수율 극대화

Trichoderma sp. C4 유래의 endoglucanase 발현 수율 극대화시키기 위하여 pVT-C4 plasmid를 함유하는 재조합 효모 균주의 회분배양 결과를 비교하였다. 3종의 재조합 효모균주(*S. cerevisiae* YNN27/pVT-C4, *S. cerevisiae* 2805/pVT-C4, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-C4)를 발효조 회분배양한 결과, 균체증식(38 OD600)과 총발현량(1003unit/mL) 및 비활성(26 unit/mL/OD600) 관점에서 SEY2102균주가 가장 우수한 반면, plasmid 안정성(80% 이상) 및 분비효율(80% 이상)은 숙주세포에 따른 차이가 크지 않음을 발견, 이후 유가배양을 통한 endoglucanase 고발현·생산연구에 SEY2102/pVT-C4의 사용을 결정하였다.

마. *Pichia pastoris*를 이용한 endoglucanase 재조합 균주 개발

당초 연구 계획상에는 없으나, 우수한 효모 생균제품 개발을 위하여 새로운 시스템인 *Pichia pastoris*를 이용한 실험을 추가로 수행하고 있다. *Trichoderma sp.* C4 endoglucanase를 AOX1 promoter를 가지고 있는 *Pichia pastoris*용 pPICZ α A vector에 cloning하여 pPICZ α A/C4 endo를 구축하였고, 이를 *Pichia pastoris*에 transformation하여 transformant 중 activity가 높은 것을 screening하였다.

바. *Trichoderma sp.* C4 유래의 β -glucosidase 발현 재조합 효모 균주 개발

β -glucosidase 고발현 재조합 균주를 개발하기 위해 ADH1 promoter를 가지고 있는 pVT-103 u vector를 사용하여 β -glucosidase 유전자를 cloning하여 pVT- β G로 명명하

였다. pVT-βG를 *S. cerevisiae* SEY2102에 transformation하여 β-glucosidase 재조합 균주를 개발하였다.

Saccharomyces cerevisiae (SEY 2102)에 형질전환된 균주를 200ml YNBCAD(0.67% Yeast nitrogen without amino acid, 0.5% Casamino acid, 2% Glucose) 배지에 배양하여 72시간 배양하면서, 효소활성을 측정하였다. 그 결과 β-glucosidase를 고발현하는 균주를 screening하였다.

사. *Trichoderma sp.* C4 유래 Exoglucanase 발현 재조합 효모 균주의 개발

1) Exoglucanase(E3 gene) 발현 재조합 plasmid의 구축

pVT103-U의 구성적 promoter인 *ADHI* promoter 하류에 *Trichoderma sp.* C4의 exoglucanase 유전자를 subcloning하여 구성적 발현계인 plasmid pVT-TExo를 제작하였다. Plasmid pVT-TExo를 전 실험에서 최적의 host로 선정한 *S. cerevisiae* SEY2102와 2805에 각각 형질전환 시켰다. Uracil 결핍 SD 평판 배지로 효모 형질전환체를 1,2차 선별에 의해 10개의 형질전환체를 선별하였다. 선별된 형질전환체 가운데 시험관 배양을 통하여 높은 균체량과 exoglucanase (avicelase) 활성을 보이는 균주를 선별하여 플라스크 배양을 하였다. 균체 증식은 배양 12시간에서 정지기에 들어갔으며 배양 말기의 균체 증식은 SEY2102가 25 OD₆₀₀, 2805가 26 OD₆₀₀였으며, 탄소원의 소모는 배양 12시간에 거의 모두 소모되는 양상을 보였다. SEY2102/pVT-TExo의 배지와 세포내의 exoglucanase의 활성은 60시간때를 제외하고는 거의 비슷한 활성을 나타낸 반면, 2805/pVT-TExo는 배지에서 활성이 세포내 보다 높게 나타났다. 총 생산된 exoglucanase는 SEY2102와 2805 균주에서 각각 190 unit/L와 143 unit/L로, 분비효율은 50%와 36%, 그리고 비활성은 7.6 unit/L · OD₆₀₀와 5.6 unit/L · OD₆₀₀로 나타났다. Plasmid 안정성은 각각 91%와 80%로 분비효율 및 비활성 그리고 plasmid 안정성을 고려해 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo를 최적의 host-vector계로 선별하였다.

2) Exoglucanase의 활성염색 및 기질 특이성

재조합 endoglucanase인 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1 과 SEY2102/pVT-C4 (편의상 각각 균주에서 발현된 조효소액을 CelA와 C4로 약칭함)와 exoglucanase인 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo (E3로 약칭함)에 대해서 CMC를 함유하고 있는 평판배

지 (Fig.3-16)와 MUC상 (Fig.3-16)에서의 활성 염색을 행하였다. CMC를 함유한 평판배지에서는 속주세포 SEY2102와 E3에서 흰 환이 형성되지 않은 반면, CelA와 C4에서 흰 환을 형성을 볼 수 있었다. 또한, 흰 환의 크기에 의한 정성적인 비교를 해 보면 C4가 CelA 보다 높은 CMC 분해능을 가지고 있음을 알 수 있었다. MUC에 의한 UV 조사상에서의 발광을 보았을 때 속주세포를 제외한 모든 형질전환체에서 발광이 보였다. Endoglucanase는 CMC와 MUC를 함유한 평판배지에서 기질 모두 분해가 일어난 반면, exoglucanase는 MUC만을 함유한 평판배지에서 활성이 나타났다. 이와 같은 결과는 exoglucanase의 일반적인 기질 특이성으로 사료된다.

수용성과 불수용성의 기질에 대한 분해능을 조사한 결과 수용성 cellulose (cellodextrin, swollen cellulose)의 경우에는 endoglucanase가 높은 분해능을 보여 주었다. 그러나, 불수용성 cellulose (native cellulose, crystalline cellulose)에 대해서는 exoglucanase의 분해능이 높았다. E3는 수용성 기질인 CMC에서 C4와 CelA에 비교해 각각 40배와 2.6배의 낮은 분해능을 차이를 보인 반면, 불수용성 기질에 대해 C4와 CelA 보다 높은 분해능을 보였다.

2. 재조합 효모 균주의 *in vitro* 효능검증 및 동물사양실험

미생물사료의 개발을 목적으로 개발된 다양한 cellulolytic enzyme 효모형질전환체를 가지고 *In vitro* NDF/ADF 분해율 실험한 결과, 특히 NDF 분해율의 경우 48시간 배양시 다른 형질전환체 보다도 endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase가 혼합된 균체에서 유의적으로 NDF 분해율이 높게 나타났다. 이 결과는 cellulose를 완전히 분해하는데는 한가지의 cellulolytic enzyme만의 효과보다는, endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase의 3가지 효소의 복합 synergism 효과가 필요하다는 결과와 동일하다. 한편 ADF 분해율의 경우에는 균주간 배양시간별 유의적인 결과를 나타내지는 못했지만 다른 형질전환체보다도 48시간 배양시 endoglucanase, endoxylanase를 첨가한 균주 처리구에서 분해율이 높게 나타났다.

또한, 개발된 재조합 효모 균주를 대량 배양후, 배양액을 동결건조하여 미생물제제를 생산하였다. 사용된 미생물제제 혼합성분은 SEY2102/pPYX1(Endoxylanase) SEY2102/ pVT-C4 (Endoglucanase), SEY2102/pVT-TExo(Exoglucanase), SEY2102/pVT- β G(β -glucosidase)균주 배양액을 동결건조한후, 혼합하여 사용하였다.

동물사양 실험 동물인 닭을 5개의 실험군으로 나누어 실험을 진행하였다. 본 시험의 공시동물은 Ross broiler 중에서 체중이 균일한 건강계 120수를 선발하여 무첨가구

인 대조구(0%)와 항생제 (chlortetracycline HCL + cyanocobalmine) 0.05%첨가구 및 Cellulase 배합수준을 Cellulase I (Endo+Exo+ β -glu 0.3%), Cellulase II (Endoxyl 0.3%), Cellulase III (Endo+Exo+ β -glu 0.15%+endoxyl 0.15%) 5처리 4반복으로 반복당 6수씩 완전 임의 배치하여 사육하였다.

Cellulase를 첨가하여 4주간 사양 시험한 결과 증체량은 대조구에 비해서 cellulase II, III과 항생제구가 높은 경향을 보였고, 사료섭취량은 대조구에 비해서 cellulase II, III가 높은 경향을 보였다. 사료효율은 항생제구 및 cellulase II, III구가 대조구와 cellulase I에 비해서 높은 경향을 보였다.

3. *Trichoderma sp.* C4 균주의 섬유소 분해 효소 유전자의 확보

가. 우수 섬유소 분해 균주의 Endoglucanase 유전자의 확보

본 연구진에 의하여 분리된 우수 섬유소 분해 균주 *Trichoderma sp.* C4의 endoglucanase 유전자를 확보하기 위하여 cDNA library를 성공적으로 제작하였고, 충분한 숫자의 library 두 batch가 제작되었으므로 우리가 계획한 endoglucanase 유전자의 cloning을 성공적으로 수행할 수 있었다. 10여차례의 반복된 1차 선별작업과 여기서 얻어지는 clone들의 2차 선별, 또는 필요한 경우 3차 선별을 통하여 총 100 여개의 phage clone을 얻었다. 이를 plasmid clone으로 전환하여본 결과 현재까지 1 종류의 endoglucanase 유전자만이 다수의 clone에서 얻어졌다. Cloning된 endoglucanase transformant들에서 단백질을 추출하여 non-SDS/PAGE에서 separation시키고 4-methylumbelliferyl- β -D-cellubiosid를 기질로 사용한 gel blot에서의 activity 실험과 CMC agar gel blot를 congo-red staining하여 효소 활성도를 test한 결과 효소 활성도에서 다른 clone들보다 뛰어난 결과를 보여주었으며, 우수 섬유소 분해효소의 유전자를 성공적으로 cloning하였다.

동일한 방법으로 만들어진 cDNA library에서 5개의 positive clone을 찾아내었고 Polyacrylamide gel 전기영동과 active staining결과 모두 endoglucanase활성을 가지고 있었다. 섬유소 우수 분해 균주인 C4를 가지고 제작된 2 개의 cDNA library batch(약 1×10^5 pfu)에서 선별된 5 개의 endo -glucanase 클론을 모두 염기 분석한 결과 *T. reesei*와 75.9 %의 유사성을 갖고 있었다.

나. *Trichoderma sp. C4*의 β -glucosidase 유전자의 확보

증폭된 *Trichoderma sp. C4* 균주의 cDNA library 5×10^5 pfu를 가지고 탐색을 시작하여 3차 탐색까지 수행된 결과 총 6 개의 클론이 얻어졌다. 6 개의 클론 모두를 5' 방향으로부터 염기를 분석한 결과 모두 같은 유전자에서 만들어진 클론임을 알았지만 클론링 과정중 full size cDNA 합성이 이루어지지 않아 각각 다르게 5'쪽이 소실된 클론 들임이 밝혀졌다. β -glucosidase의 전체염기서열을 찾아내기 위하여 확보된 6개의 clone중 가장 5'쪽의 소실이 적은 clone을 선정하여 양방향으로 전체 염기 분석을 마쳤다. β -glucosidase 유전자 5'쪽의 개시코돈 부위 복구에 의한 전체염기서열 분석 완성을 위하여 β -glucosidase 유전자 5'쪽의 개시코돈 부위 primer 제작하여 PCR를 통해 전체 염기서열을 확보하였다.

다. *Trichoderma sp. C4*의 exoglucanase 유전자의 확보

PCR을 이용한 exoglucanase 유전자 특이 probe를 만들어 염기를 확인한 후 이를 가지고 cDNA library를 screening하여 맞는 clone을 선별하였다. 1차 screening에서 2개의 clone을 찾아 2차, 3차 선별 작업을 통하여 exoglucanase 유전자 clone을 확보하였다. Screening으로 얻어진 exo-glucanase 유전자를 양방향으로 전체 염기서열을 분석하였다.

4. *Trichoderma sp. C4* 균주의 섬유소 분해 효소의 분리/정제 및 활성 측정

가. *Trichoderma sp. C4* 균주의 Endoglucanase 의 분리/정제 및 활성 측정

1) *Trichoderma sp. C4* 균주의 Endoglucanase 의 분리/정제

Trichoderma sp. C4 균주에서 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography를 행하여, endoglucanase가 포함된 부위(F-I, F-II)를 얻었다. F-I 부위를 농축하고 인산완충 용액(20 mM, pH 7.0)으로 교환한 후 DEAE-Sepharose ion exchange를 행하였다. 그 결과 3개 부위의 endoglucanase를 확인하여 각각 F-I-I, F-I-II, F-I-III라고 명명하였다. F-I-I에는 exoglucanase 활성과 β -glucosidase 활성을 포함하였다. 이 부위를 Mono P (FPLC) chromatography를 행하여 분리하였고, 분리된 효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 나타났다. 또한, F-I-II부위는 Mono-P (FPLC) chromatography를 행하여 분리하였고, 역시 분리된 효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 분리함으로써, 2개의 endoglucanase를 성공적으로 순수 분리하였다.

그리고, endoglucanase F-I-III의 amino acid sequencing을 성공적으로 수행하였다. 순수 분리된 F-I-III에 pyroglutamate aminopeptidase를 처리하여 N-terminal block을 제거하고 sequencing을 행한 결과 17개의 sequence를 얻을 수 있었다. 이는 *Trichoderma reesei*에서 분리된 EG-I precursor의 24-40번, *T. longibrachiatum*에서 분리된 endoglucanase의 24-40번 amino acid sequence와 일치하였다 (89 %).

또한, 당초의 계획에는 없었으나, 과제의 효율적 수행을 위하여 endoglucanase의 하나인 F-I-II의 protein sequencing을 추가적으로 행하였다. 효소를 Arg-C endoproteinase로 부분 분해한 후 SDS-PAGE 하고 이중 2개의 peptide를 sequencing을 행한 결과 두 peptide에서 동일한 결과를 얻었다 (11 amino acid sequence). 이는 *T. reesei*의 EG-III와 90%의 homology를 보였다. 연구결과 3종류의 endoglucanase에 대한 protein sequence를 얻음으로서 endoglucanase cloning에 필요한 많은 정보를 제공하게 되었다.

또한 부분정제 되었던 endoglucanase F-II를 순수 분리, 정제 하기 위하여 다양한 chromatography를 이용하여 endoglucanase F-II를 순수분리 하였다. F-II는 분리 후 trypsin(2 %)으로 30분 처리한 결과 2개 peptide의 주 분해산물을 얻었는데, 이들의 protein sequence를 행한 결과 각각 15, 12 개의 sequence를 얻었다. 이들은 지금까지 알려진 다른 단백질과 homology가 발견되지 않은 새로운 endoglucanase 이다.

2) *Trichoderma sp.* C4 균주의 Endoglucanase 의 활성 측정

섭유소 우수분해 균주의 물리화학적 특성을 조사하였다. 분리된 효소들은 모두 50℃에서는 12시간 동안 활성을 전혀 상실하지 않았다. 최적온도는 모두 50℃에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한, 모든 효소들은 pH 4.0-8.0까지의 범위에서 안정하였으며, pH 5.0에서 모두 가장 높은 활성을 보였다. 금속이온 및 환원제에 대한 안정성에 대해서도 모두 안정하였으며, Ox-gall에 대한 안정성도 80- 100% 안정성을 나타냄으로서 최적의 효소체계를 이루고 있음을 확인하였다.

순수 분리된 F-II는 분자량이 26,000, pI가 8.0으로 나타났으며, CMC에 대한 Km 값이 0.16 %로 나타났으며, CMC에 대한 specific activity는 350U/mg으로 나타났다. 또한 endoglucanase F-II의 비활성을 측정하였으며, isoelectric focusing을 수행하여 정확한 pI 값을 구하였다. 또한 이 효소의 활성부위에 관여하는 아미노산을 알기 위하여 chemical modification을 행하였다.

나. *Trichoderma sp.* C4 균주의 β -glucosidase 단백질 분리/정제 및 활성 측정

1) *Trichoderma sp.* C4 균주의 β -glucosidase의 순수 분리/정제

Trichoderma sp. C4 균주를 배양하고, 다양한 정제방법을 통하여 β -glucosidase를 순수 분리하였다. 정제된 β -glucosidase는 Sephadex G-150 gel filtration column (1.8×88cm)에서 native molecule의 분자량이 76 KDa로 추정할 수 있었고, SDS-PAGE에서 측정시 75KDa monomer로 존재하고 있는 것으로 확인하였다.

2) *Trichoderma sp.* C4 균주의 β -glucosidase의 활성 측정

열에 의한 효소의 안정도는 각 온도에서 15분씩 배양시 60°C까지는 80%의 활성을 보유하나 70°C부터 40%의 활성만이 남는 것을 관찰하였다. 사료로 투여시 함께 존재하는 담즙산에 의한 영향을 알아보기 위해 Ox Gall의 농도별로 β -glucosidase 활성에 미치는 영향을 측정한 결과 1% 첨가시는 92% 활성이 보유하고 5% 첨가시에도 84% 활성보유로 Ox gall존재시도 상당히 안정했다. protease에 의한 영향을 알아보기 위해 trypsin, pepsin, chymotrypsin모두에 기질과 효소를 20:1의 비율로 첨가하여 37°C, 60분간 배양해본 결과 활성에 거의 영향을 받지 않아 소화효소에 대해 안정성이 상당히 높은 것으로 보였다. 또한 각 pH에서 60분 방치후 활성을 측정시 pH 5.0에서 가장 활성이 높았고 산성쪽, 알칼리성쪽 모두 급격히 활성이 저하되었다. 각 pH가 반응속도에 미치는 영향을 측정시 pH 5.0에서 가장 활성이 높아 β -glucosidase는 lysozyme과 유사한 작용기작을 가지고 있음을 추정할 수 있었다. β -glucosidase에 있어서 metal ion, site-specific inhibitor에 의한 영향은 조사된 시약중 1% SDS를 제외하고는 심각한 활성의 저하를 보인 것이 없어 상당히 활성이 안정한 것으로 보이고 금속 ion중 Mn^{2+} , Zn^{2+} 은 첨가시 상당량의 활성의 증가를 보였다. 정상기질로 사용하는 *p*-nitrophenyl β -glucopyranoside (PNPG)와 유사화합물과 반응을 측정시 기질특이성은 PNPG > *o*-nitrophenyl β -glucopyranoside (ONPG) > *p*-nitrophenyl α -glucopyranoside (PINP α G) > *p*-nitrophenyl β -galactopyranoside (PNPGal) > *p*-nitrophenyl β -fucopyranoside (PNPfuc)의 순이었고, *p*-nitrophenyl β -L-arabinopyranoside, *p*-nitrophenyl N-acetyl β -D-glucosamide, *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide, *p*-nitrophenyl β -D-maltoside는 기질로 전혀 작용하지 못하는 것을 발견하였다.

다. *Trichoderma sp.* C4 균주의 exoglucanase 단백질 분리/정제 및 synergistic effects

1) *Trichoderma sp.* C4 균주의 exoglucanase 단백질 분리/정제

C-4 균주를 potato dextrose agar에 접종하여 28°C에서 3-4일후에 균을 배양하고, soluble fraction을 Mandel's media에 넣어 배양후 extracellular media를 사용했다. 배양액에 75% ammonium sulfate를 첨가하여 농축 및 투석을 통하여 정제했다.

2) Exoglucanase의 avicel binding과 synergistic effects

CMC 분해에 의한 당 생성은 C4(*Trichoderma sp.* C4의 exoglucanase)가 가장 높은 당생성을 보였으며, 다음으로 CelA(*C. Thermocellum*의 exoglucanase), exoglucanase 순이었다. exoglucanase 경우 C4에 비해 3.7배 낮은 당 생성을 보였다. 그러나, avicel에 대한 binding을 보았을 때 100 mg-avicel/mL에서의 exoglucanase 결합능을 100%로 보았을 때 CelA는 42%의 결합능을 보였으며 C4는 전혀 binding을 하지 않음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때 exoglucanase는 불수용성 기질에 높은 결합능을 가지고 있음을 알 수 있었다. exoglucanase의 경우 avicel에 대한 결합능은 높으나 결합능이 낮은 C4나 CelA에 비해 당 생성이 낮은 이유로는 exoglucanase에 의한 생성물질인 cellobiose의 저해 (inhibition)를 받은 것으로 추정된다.

라. Cellulose 가수분해에 대한 endoglucanase와 exoglucanase에 의한 synergism

섬유소 가수분해를 위한 최적의 exoglucanase(E3)와 endoglucanase(CelA) 효소의 혼합비를 조사하기 위해 exoglucanase와 endoglucanase의 일정량 (avicelase 활성; 3.6 unit/L)을 섞어 각 혼합비에 대한 avicel분해에 대한 상승효과와 당 생성을 보았다. 가장 좋은 포도당 생성은 exoglucanase와 endoglucanase의 혼합비가 4:1일 때 관찰되었으며 이때의 avicelase 활성도 가장 높았다. 각 cellulase를 단독으로 사용했을 경우와 가장 높은 상승효과를 보여준 혼합비에 대한 시간별 avicel 분해 양상을 보았다. Endoglucanase (CelA) 단독으로 작용을 한 것이 가장 낮은 분해능을 나타냈으며, E3와 CelA를 혼합시에는 초기 10분 동안의 분해능은 exoglucanase (E3)단독으로 사용한 것과 비슷한 당 생성을 보였으나 10분 이후로는 E3와 CelA에 의한 상승효과로 인해서 보다 높은 당 생성을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 exoglucanase인 E3의 insoluble에 대한 분해능과 높은 avicel 결합능, 그리고 endoglucanase와 exoglucanase에 의한 상승 작용을 이용하면 섬유소

(crystalline cellulose)로 이루어진 벚집이나 옥수수껍질 같은 사료의 분해를 크게 높일 수 있을 것으로 사료된다.

바. 섬유소 분해 우수 균주인 *Trichoderma sp.* C4 endoglucanase와 exoglucanase 및 beta-glucosidase들의 상호 작용을 분석

섬유소 분해 우수 균주인 *Trichoderma sp.* C4 endoglucanase와 exoglucanase 및 beta-glucosidase들의 상호 작용을 분석하였다. C-4 균주에서 발견된 4가지 종류의 endoglucanase를 각각 정제하여 다양한 조합에서 CMCase의 활성을 측정결과 endoglucanase 사이의 상호 작용에서는 두 종류 이상의 endoglucanase를 섞었을 경우 모든 경우에서 한 종류만 작용시켰을 경우보다 활성이 높았으며, 세 종류를 섞었을 경우 가장 상승효과가 높았다. 각각의 조합에 exoglucanase를 섞은 경우도 가장 높은 상승효과를 보였고, beta-glucosidase를 넣어 세가지 효소를 섞었을 경우 가장 상승효과가 뛰어났다.

제 3 장 섬유소 분해 효소를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발

제1절 연구개발 방법

본 세부과제는 cellulose 분해능을 갖는 효소의 유전자를 효모에 형질전환시켜 cellulose 분해능을 최대화시킨 재조합효모를 개발하여, *in vitro* 소화율 측정 및 동물 사양실험을 통한 고기능, 고효율 미생물사료를 개발하는 연구를 수행하였다.

1. 섬유소 분해 우수 효소를 대량생산하는 균주 개발

효모 *S. cerevisiae*에서 이중단백질의 생산을 위해 episomal vectors(ARS vectors, 2 μ -based vectors, regulated copy number vectors)와 integrating vectors(Ylp vectors, transplacement, transposition vectors)등이 사용될 수 있으나, 현재 2 μ -based vectors가 높은 copy number(100 copies per haploid genome) 및 plasmid 안정성을 고려하여 가장 널리 이용되고 있다 (Romanos et al. 1992). 또한, 사용되는 promoter로는 유전자 발현이 균체증식과 비례하여 일어나는 구성적(constitutive) promoters(*ADH1*, *PGK*, *GAP*등), galactose-regulated promoters(*GAL1*, *GAL7*, *GAL10*), phosphate-regulated promoters(*PHO5*), glucose-repressible promoters(*ADH2*, *SUC2*, *CYC1*등)가 있으나, 발효 공정의 경제성(galactose 1 kg은 6만원, Sigma사 기준)과 용이성(*PHO5* promoter의 경우 배양도중 인산염 농도를 인위적으로 낮추어 주어야 함)로 인해 구성적 promoter가 본 연구에 가장 적합하다고 판단되었다. 실제로 이들 구성적 promoters는 *S. cerevisiae*에서 가장 강력한 promoters로 알려져 있고 산업적으로도 성공적으로 응용되고 있다 (Tuite et al. 1982, McAleer et al,1984).

따라서, 본 연구에서는 이미 확보된, 2 μ -based vectors상에 *PGK*, *GAP*, *ADH1* promoter를 각각 함유한 세가지 발현 systems (pVT-103U)에 cellulase 유전자를 subclone하여 효모 발현 vector를 제조했다. 이들 cellulase 발현 vectors를 다양한 *S. cerevisiae* 숙주세포에 형질전환하여 고역가 재조합 균주를 다음과 같은 방법으로 선별했다. 형질전환균주(transformant)는 uracil결핍 최소배지(yeast nitrogen base without amino acids 0.67% 함유 SD배지)를 사용하여 1차 선별하였다. 1차 선별된 transformant를 적절한 배지(YPD 또는 SD배지)에서 flask 배양 후 발현된 재조합 cellulase단백질은

SDS-PAGE 및 효소역가 측정으로 그 생산량을 정량하며 가장 높은 발현양을 보이는 고역가 균주를 2차 선별하였다.

2차로 선별된 고역가 균주에서 발현된 cellulase 단백질의 분비국재성을 조사하고 효율적인 분비생산을 위한 기초결과로 활용했다. 즉, 배양한 호모broth를 배양상등액(배지), periplasmic space, 세포질의 세분획으로 나누어 각 분획의 cellulase 분포를 측정 후, 분비효율이 낮은 경우 기존에 개발된 여러가지 단백질 분비신호(남수완, 1994)와 fusion시켜 고분비 재조합 균주를 개발하였다.

2. 재조합 호모 균주의 효능 검증

In vitro 소화율 측정은 cellulose 분해율 측정 실험을 위하여 Tilly and Terry의 two-stage 방법을 이용하였다. 분쇄기로 분쇄한 dried alfalfa meal을 인공 반추위 속에 넣고, 배양액 20 ml과 반추위액 5 ml를 섞어 넣었다. 15초 동안 CO₂ 가스를 주입한 후, 39°C의 water bath에 넣어 미생물에 의한 발효를 시켰다. 8시간 마다 1번씩 흔들며 주면서 48시간 동안 배양한 후, cellulose의 분석을 하였다.

가. 단위동물에서 개발된 사료첨가제(미생물제제; cellulase) *In vitro* NDF, ADF 분해율 측정을 위한 방법

1) 인공장액

멸균된 0.5%(w/v) NaCl 용액내에 pancreatin(1g/L)이 포함된 용액(pH 8.0)

2) 기구

가) 조섬유 분석장치(Fiber analyzer)

나) 37°C 항온 incubator (shaking 가능; *In vitro* NDF/ADF 분해율 분석장치)

다) Filter bag

3) 방법

가) 먼저 섬유소 분해기질 자체에 함유된 NDF/ADF 함량을 계산한다.

나) 개발된 미생물제제(동결건조된 것, 0.2mg/ml)를 섬유소 분해기질(0.5g)과 잘 혼합하여 filter bag에 넣고 봉합한다. 이것을 인공장액 2L가 함유된 유리 Jar에 넣고 37°C에서 72시간 배양한다. 배양이 끝난 다음 증류수로 2차례 washing 한 뒤 조섬유 분석장치에서 NDF/ADF 함량을 구하여 *In vitro* NDF/ADF 분해율을 계산한다.

개발된 미생물제제(동결건조된 것)를 무첨가구인 대조구(0%)와 항생제(chlortetracycline HCL + cyanocobalmine) 0.05%첨가구 및 Cellulase 배합수준을 Cellulase I (Endo+Exo+ β -glu 0.3%), Cellulase II (Endoxyl 0.3%), Cellulase III (Endo+Exo+ β -glu 0.15%+endoxyl 0.15%) 의 5개 처리구를 이용하여 실험을 실시하였다.

가) 축종 : 닭

나) 연구방법 :

- 개발될 재조합 균주의 첨가수준을 4수준으로 하여, 사양시험을 실시한다.
- 처리방법: 5처리 X 4 반복 X 반복당 6 두 = 120 마리
- 사양시험기간 : 4주
- 조사항목 : 사료섭취량, 성장률, 사료효율, 각종 영양소(셀룰로스 소화율, 탄수화물, 지방, 단백질) 이용률

제2절 연구개발 결과 및 고찰

1. *C. thermocellum* 유래 endoglucanase(*celA*)를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발

가. *C. thermocellum* 유래 endoglucanase를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발

재조합 효모의 균체증식과 동시에 *celA* 유전자가 발현 (growth-associated expression) 되는 구성적 발현계를 구축하기 위해 *ADH1* 구성적 promoter 하류에 *C. thermocellum* 의 endoglucanase A 유전자 (*celA*)를 subcloning하여 재조합 plasmid인 pVT-CT1 (8.3 kb)을 제작하였다 (Fig. 3-1). 이 plasmid의 장점은 선택표지로 *URA3* 유전자를 함유하고 있어 uracil 영양요구성 변이주 효모세포 (*ura3*)는 모두 숙주세포로 사용할 수 있다. CMC 평판배지에서 CMCCase 발현을 확인한 후, 균체증식과 plasmid 안정성 및 CMCCase 발현량 등을 고려하여 YNN27, 2805 및 SEY2102의 세 종류 숙주세포와 *ADH1* 발현계를 구성적 CMCCase 발현의 최적 host-vector계로 선정하였다. 발효조 회 분배양에서 CMCCase 발현은 균체농도 증가에 비례하는 양상을 보였고, 균체증식과 plasmid 안정성 및 CMCCase 발현량은 각각 11~13 g-DCW/L, 75% 이상, 약 200 unit/L

의 비슷한 수준을 보였다. 분비국재성은 배양상등액에 25~38%, peiplasmic space에 53~64%, 세포내에 10~14% 수준으로 숙주세포에 따라 약간의 차이가 났으며, celA의 자체 분비신호 (32개 아미노산 길이)를 사용하고도 효모에서 효율적으로 발현·분비를 관찰하여 재조합 효모 생균제 개발에의 활용을 가능하게 하였다. 또한 ADH1 promoter와 같은 구성적 promoter의 사용은 경제적으로 값싼 포도당을 이용하여 값싼 재조합 생균제를 대량 생산을 가능하게 한다.

나. Fermentor 회분 배양을 통한 endoglucanase 발현과 분비

SEY2102/pVT-CT1 재조합 효모 균주를 YPD 배지에서 회분배양하여 그 결과 (균체 증식, plasmid 안정성, 포도당 소모, 균체 내외의 endoglucanase 활성)를 Fig. 3-2에 나타내었다. 배양 10시간을 전후하여 배지내 포도당은 고갈되었으며, 균체 증식은 약 24시간까지 계속되었고 균체 증식과 비례하여 endoglucanase 발현 (growth-associated expression)이 일어났다. 24시간 이 후 균체 증식이 정지기에 도달함과 동시에 endoglucanase 발현도 정지되고 이 후 균체내 endoglucanase 활성이 크게 감소하는 반면 세포외 배지의 endoglucanase 활성은 크게 변하지 않았다. 배양 후기에 나타나는 endoglucanase 활성의 감소는 세포내외에 존재하는 미지의 proteases에 의한 것으로 생각되며, 세포외의 것보다 세포내 proteases에 의한 endoglucanase의 분해가 더 심했다.

다. 유가 배양(fed-batch)

1) Constant-feeding에 의한 유가배양

재조합 endoglucanase의 대량 생산을 위해서 유가배양을 하였다(Fig. 3-3). 즉, 기질 공급속도를 15시간에서 48시간까지 6 g-glucose/hr의 속도로 포도당을 feeding해 주었다. 균체증식은 24시간까지 계속되었으며 24시간 이후에 약간씩의 균체 증식을 보여주었다. 배양 말기의 균체 증식은 12 OD₆₀₀으로 회분배양에 비해서 2.4배의 높은 균체 농도를 보여주었다. Plasmid 안정성은 초기 12시간 이후로 80%이상으로 plasmid 안정성이 계속 유지되었으며 endoglucanase 발현량은 세포내외 배지에서 모두 증가하는 양상을 보여주었는데 특히, 세포 내의 증가 양상이 두드러지게 나타났다. 총 발현된 endoglucanase 활성은 493 unit/L로 회분배양에 비해서 약 3.8배의 증가된 활성을 나타낸 반면 분비효율은 20%로 낮은 분비 효율을 보였다. Feeding 직전 발

효조 내의 포도당 농도는 0.49 g/L였으며 feeding 말기의 발효조 내의 포도당 농도는 8.78 g/L를 보였다. 이와 같은 포도당의 축적은 기질(포도당) 공급속도가 빨랐기 때문으로 보이며, 포도당 공급속도가 너무 빠르면 에탄올 생성에 의해 증식수율($Y_{x/s}$)이 감소하므로(Crabtree effect) 세포농도와 외래 단백질 생산의 감소를 가져 온다. 이상과 같은 결과를 종합하여 발효조 내에서 재조합 효모가 포도당을 충분히 소모할 수 있도록 기질 공급속도를 조절하여 다음의 유가배양 실험을 계속하였다.

2) 기질 공급속도 변화에 의한 유가배양

기질공급 속도를 배양 16시간에서 36시간까지 2 g-glucose/hr와 배양 36시간에서 59시간까지 3.6 g-glucose/hr의 속도로 조절하여 유가배양 하였다(Fig. 3-4). 배양 양상은 전 실험과 비슷하였으며 배양 말기의 세포 농도는 70.9 OD₆₀₀였다. 또한 배양 말기의 발효조내의 잔존 포도당 농도는 1.8 g/L로 전 유가배양 결과와 비교해 볼 때 포도당 축적이 일어나지 않았으며 배양 말기의 총 발현된 endoglucanase의 활성은 636 unit/L였다.

최적 host-vector계로 선택한 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1의 배양 결과를 Table 3-2에 요약하였다. Plasmid 안정성은 모두 80%이상 이었으며, 유가배양의 경우 균체 농도는 회분 배양에 비해서 각각 2.07배와 1.85배가 증가하였고, 총 발현된 endoglucanase 활성 또한 회분 배양에 비해 각각 4.36배와 3.15배로 증가하였다. 유가배양에 의해 분비 효율은 42%로 크게 증가하였고, 배양 환경 차이에 의한 재조합 세포의 생리적 또는 세포벽 구조적 변화에 기인하여 분비효율이 증가한 것으로 추정된다.

일반적으로 효모의 고농도 세포 배양에서 최적 증식을 위한 영양 요구성이 복잡하고, 외래 유전자 발현을 높은 수준으로 장기간 유지하기 곤란하다. 특히, 제한 기질이 포도당일 경우 catabolite repression 조절이 매우 중요하며, 포도당 공급속도 또한 중요한 변수로 작용을 하게 된다. 산소 제한조건에서 *S. cerevisiae*가 증식할 때 에탄올 생산은 불가피하며, 결과적으로 ATP 수율 감소, 독성물질생성, 증식 수율감소 등으로 이어진다. 따라서, 균체 또는 균체 유래산물 (이종 단백질) 생산시 용존 산소농도의 조절이 매우 중요하다. 실제로, 효모의 유가배양에서 기질(포도당) 공급 지표로 포도당 농도나 비증식속도(μ)를 주로 사용해 왔다.

결과적으로, 더욱 정밀하고 정확한 기질 공급으로 발효조 내의 기질(포도당)이 효모에 의해 모두 대사 산물 (균체)로 소모되고 또한, 용존 산소의 제한에 의해서 생성된 ethanol이 효모의 증식에 저해를 주지 않는 환경으로 유가배양을 수행하면 더 높은

균체 농도와 endoglucanase를 생산할 것으로 추정된다.

라. 재조합 효모 균주의 효능검증

C. thermocellum 유래 endoglucanase 발현 재조합 효모균주의 기질(orchardgrass)에 대한 *in vitro* NDF 분해율을 조사한 결과 배양시간이 증가할수록 NDF 분해율이 높게 나타났다(Table 3-2). 효모 균주에 있어서 24, 48시간 배양시에 Cellulase 활성을 보이는 재조합 *Saccharomyces cerevisiae* 균주가 wild type의 *Saccharomyces cerevisiae* 균주보다 유의적으로 NDF 분해율이 높게 나타났고 특히 72시간배양시에는 cellulase activity를 보이는 재조합 균주(III)가 최고 32.11 %의 NDF 분해율을 나타내어 유의적인 효과가 인정되었다. 이는 재조합 효모자체의 높은 cellulase activity와 더불어 가축영양분야에서 사료첨가제로써 특히 각종 아미노산, 미지성장인자(UGF), 비타민의 공급원으로 인정되고 있는 효모가 반추위내 Cellulolytic rumen bacteria의 활성을 촉진시킨 것으로 사료된다.

C. thermocellum 유래 endoglucanase 발현 재조합 효모균주의 기질(orchardgrass)에 대한 *in vitro* ADF 분해율을 조사한 결과 NDF 분해율과 마찬가지로 배양시간이 증가할수록 ADF 분해율이 높게 나타났다(Table 3-4). 효모균주에 있어서 배양시간에 따라 Cellulase 활성을 보이는 재조합 효모균주(II, III)가 wild type 보다 유의적으로 ADF 분해율이 증가하였으며 특히 72시간 배양시에 재조합 효모균주(III)가 19.98 %의 가장 높은 ADF 분해율을 나타내어 유의적인 효과가 인정되었다. 이는 역시 재조합 효모자체의 높은 cellulase activity와 더불어 가축영양분야에서 사료첨가제로써 특히 각종 아미노산, 미지성장인자(UGF), 비타민의 공급원으로 인정되고 있는 효모가 반추위내 Cellulolytic rumen bacteria의 활성을 촉진시킨 것으로 사료된다.

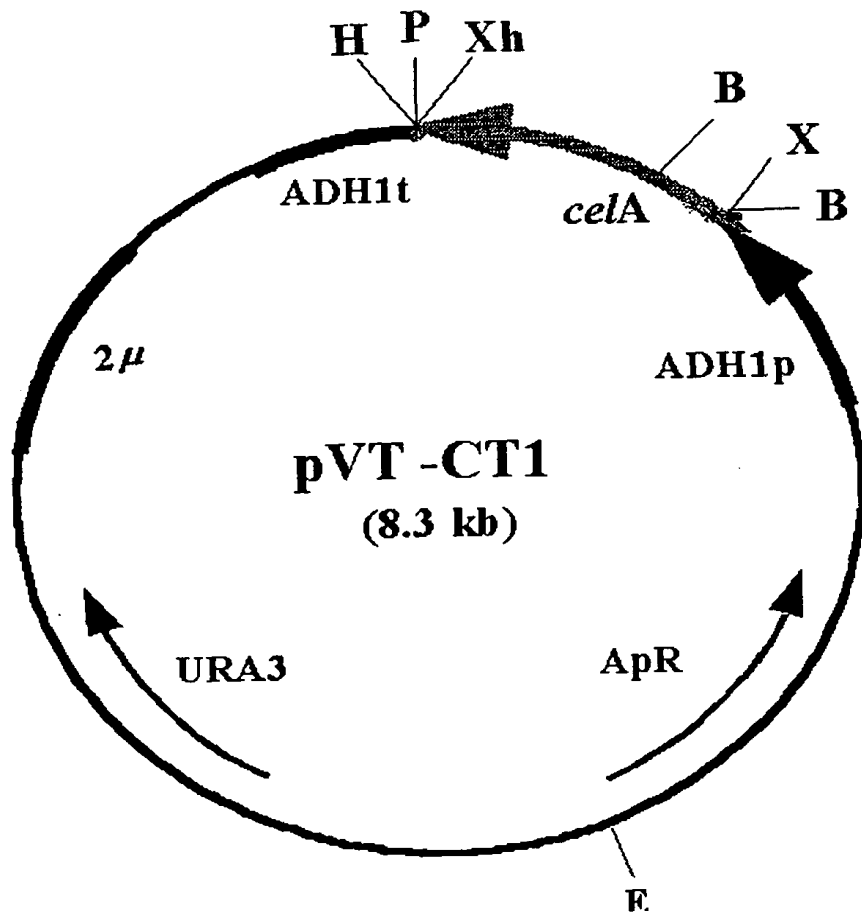


Fig. 3-1. Restriction map of the yeast plasmid pVT-CT1

Restriction enzyme: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; P, *Pst*I; X, *Xba*I; Xh, *Xho*I

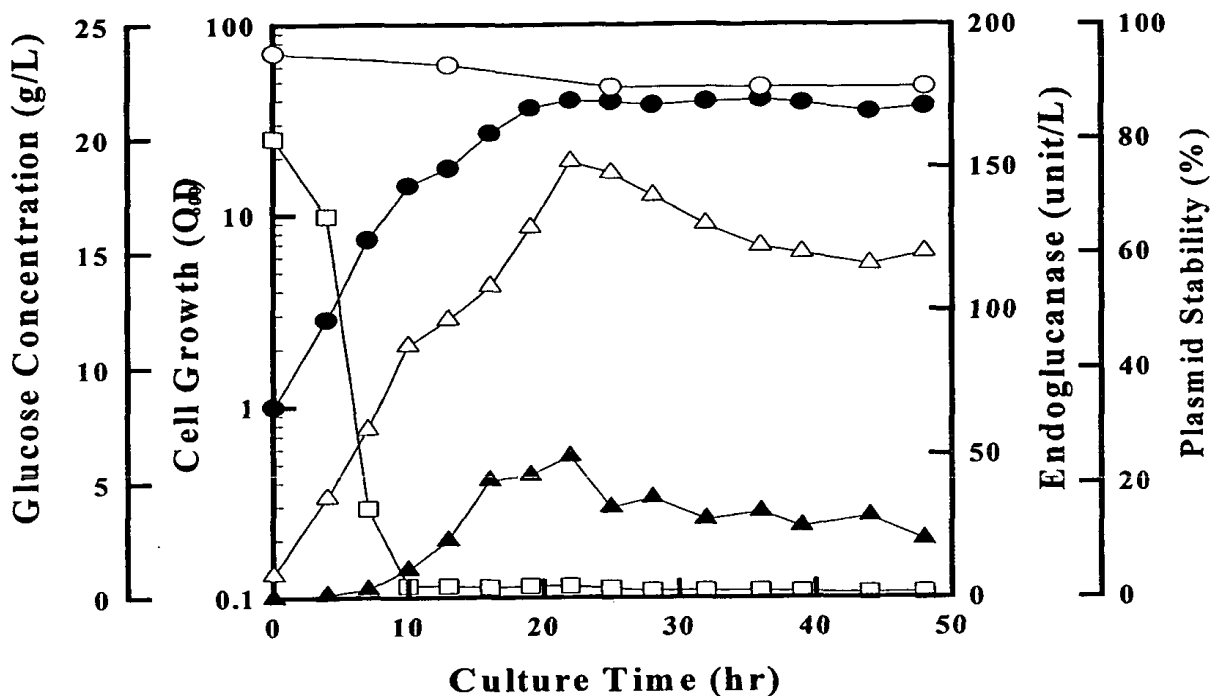


Fig. 3-2. Time profiles of cell growth, glucose consumption and endoglucanase production by batch fermentation of *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1 on YPD medium.

Symbols are : (●), cell concentration (OD₆₀₀); (□), glucose concentration (g/L); (○), plasmid stability (%); (▲), endoglucanase in extracellular medium; (△), endoglucanase in cell lysate.

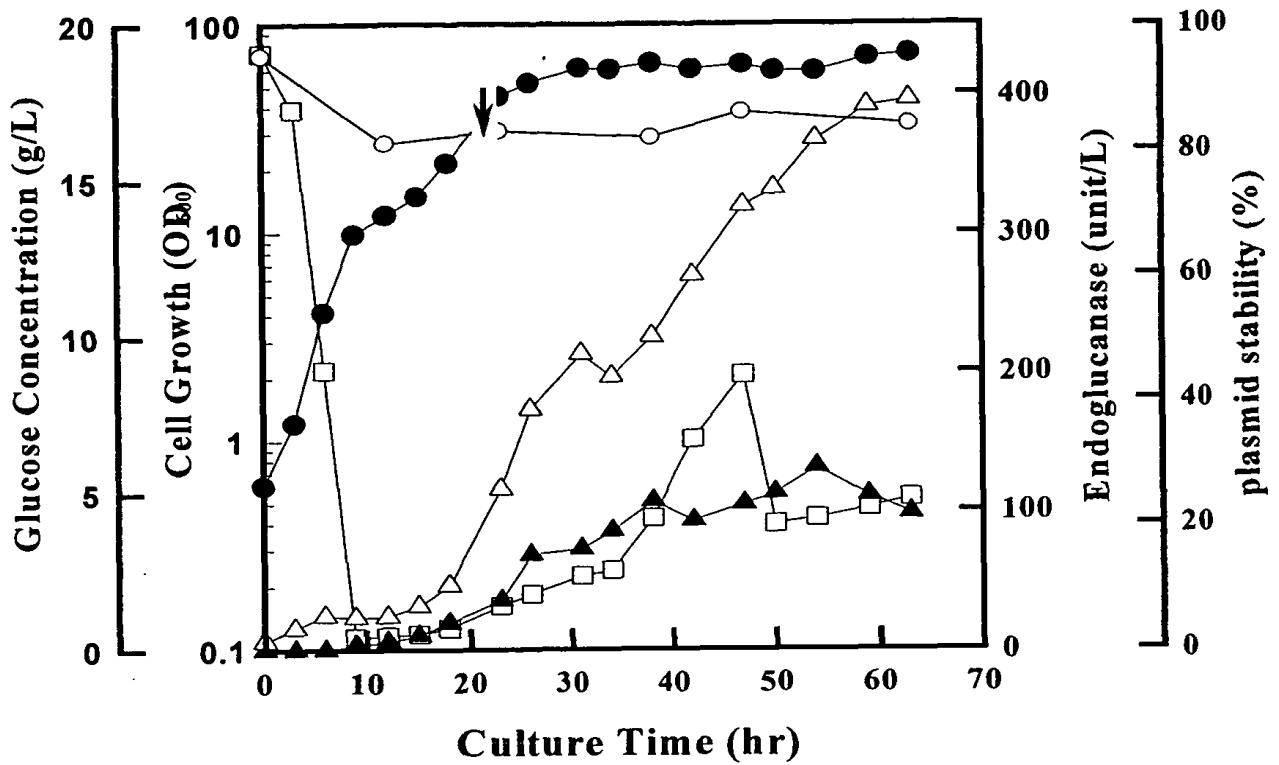


Fig. 3-3. Time profiles of cell growth, glucose consumption and endoglucanase production by fed-batch fermentation of *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1.

Fed-batch culture was performed by feeding the concentrated glucose (300 g/L). Feeding rate was adjusted at 6g-glucose/hr from 15hr to 48hr.

Symbols are : (●), cell concentration (OD₆₀₀); (□), glucose concentration (g/L); (○), plasmid stability (%); (▲), endoglucanase in extracellular medium; (△), endoglucanase in cell lysate.

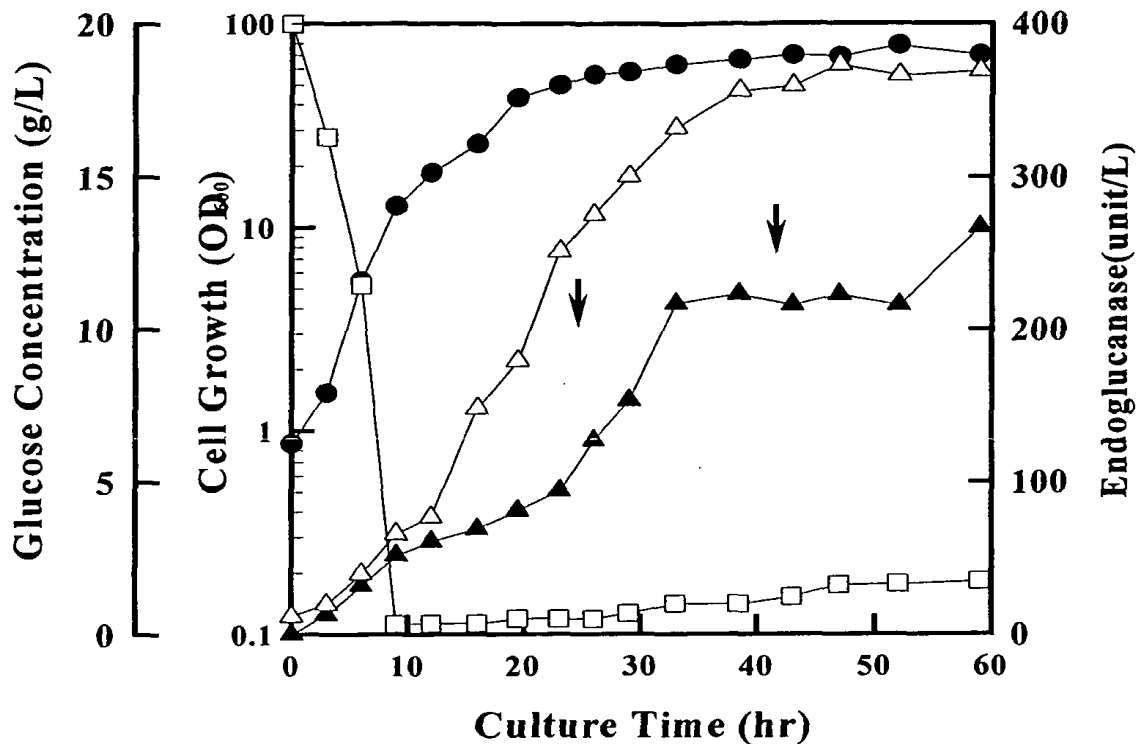


Fig. 3-4. Time profiles of cell growth, glucose consumption and endoglucanase production by fed-batch fermentation of *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1.

Fed-batch culture was performed by feeding the concentrated glucose (300 g/L). Feeding rate was adjusted at 2 g-glucose/hr from 10hr to 36hr, and 3.6 g glucose/hr from 36hr to 59hr.

Symbols are : (●), cell concentration (OD₆₀₀); (□), glucose concentration (g/L); (○), plasmid stability (%); (▲), endoglucanase in extracellular medium; (△), endoglucanase in cell lysate.

Table 3-1. Comparison of the batch fermentation results for cell growth, plasmid stability, CMCCase activity and secretion efficiency between yeast strains YNN27/pVT-CT1, 2805/pVT-CT1, and SEY2102/pVT-CT1

Trans -formant	Cell ¹⁾	Plasmid ²⁾	CMCase Activity ¹⁾				Secretion	Specific
	Growth	Stability	(unit/L)				Efficiency	Activity
	(g-DCW/L)	(%)	Medium	Periplasm	Cytoplasm	Total	(%)	(unit/g-DCW)
YNN27/ pVT-CT1	12.32	75	64	102	27	193	33	15.7
2805/ pVT-CT1	11.01	79	79	110	20	209	38	19.0
2102/ pVT-CT1	12.77	89	50	130	22	202	25	15.8

- 1) Cell growth and CMCCase activity were the maximal values during the culture period of 21 hr to 28 hr.
- 2) Plasmid stability was determined at 48 hr of cultivation.

Table 3-2. Expression and localization of endoglucanase from recombinant *S. cerevisiae* SEY2102 transformed with pVT-CT1

Culture mode	Cell growth (g-DCW/L)	Plasmid Stability (%)	Endoglucanase Activity (unit/L)				Secretion Efficiency (%)	Specific Activity (unit/g-DCW)
			Medium	Periplasm	Cytoplasm	Total		
batch	12.77	89	50	130	22	202	24.7	15.82
Fed-batch (6g-glucose/hr)	20.01	84	98	358	72	528	18.56	26.39
Fed-batch (2g-3.6g-glucose/hr)	23.68	89	267	311	58	636	41.98	26.86

Table 3-3. *In vitro* NDF digestibility of orchard grass

Strains	Time(hr)	% NDF digestibility		
		24	48	72
I		19.99 ^d	22.99 ^d	26.39 ^d
II		20.66 ^c	24.42 ^c	27.86 ^c
III		23.51 ^a	29.84 ^a	32.11 ^a

* I. *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102: wild type

II. *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102 harboring pVT-CT1 (1.234U/100mg)

III. *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102 harboring pVT-CT1 (1.453U/100mg)

* Alphabetic letters(superscript) : P<0.01

Table 3-4. *In vitro* ADF digestibility of orchard grass

Strains	Time(hr)	% ADF digestibility		
		24	48	72
I		11.10 ^d	13.49 ^d	16.84 ^d
II		15.01 ^a	17.33 ^a	19.98 ^a
III		12.87 ^c	13.44 ^c	15.82 ^c

* I. *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102: wild type

ii. *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102 harboring pVT-CT1 (1.234U/100mg)

III. *Saccharomyces cerevisiae* SEY 2102 harboring pVT-CT1 (1.453U/100mg)

* Alphabetic letters(superscript) : P<0.01

2. *Trichoderma* sp. C4 유래 endoglucanase를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발

가. *Trichoderma* sp. C4 유래 endoglucanase를 대량생산하는 재조합 효모 균주의 개발

재조합 효모의 균체증식과 동시에 외래 유전자가 발현 (growth-associated expression)되는 구성적 발현계를 구축하기 위해 효모의 구성적 promoters 중 plasmid 안정성을 고려하여 *ADH1* promoter를 선정하였다. *Trichoderma* sp. C4 유래의 endoglucanase 유전자(*egl6*)의 ORF(1.254kb)를 함유한 약 1.4 kb 단편을 pVT103-U vector에 subcloning하여 재조합 plasmid인 pVT-C4 (8.2 kb)를 제작하였다(Fig 3-5). Plasmid pVT-C4를 uracil 영양요구성 변이주(*ura3*)인 효모속주세포 3종(*S. cerevisiae* YNN27, 2805, SEY2102)에 각각 형질전환시켰다.

Uracil 결핍 SD 배지로 효모 형질전환체를 1차 선별한 다음, uracil 결핍 SD 배지에서 자란 효모 형질전환체 100-200 colony를 1% CMC 함유 평판배지에 옮긴 다음 Congo-red 염색을 통하여 비교적 큰 투명한을 보이는 colony 80개씩의 총 240개(속주 세포 3종 × 80 개 = 240 개) 형질전환체를 2차 선별하였다.

나. 최적 형질전환체의 선별

사용하는 속주세포에 따라 또한 하나의 속주세포에서 얻어진 형질전환체들 사이에서도 외래 유전자의 발현은 크게 달라짐이 보고되고 있어, 상기 3종의 속주세포로부터 얻은 형질전환체들 사이에도 이러한 발현량 차이가 있는지를 먼저 조사하였다. Congo-red 염색으로 2차 선별된 각각의 형질전환체를 10 ml 시험관 배양을 통해 배양 48시간 때의 균체농도 및 endoglucanase 활성을 측정하였다. 속주세포 각각에 대한 80개의 형질전환체 중에서 대표적으로 10개에 대한 최종 균체농도와 세포외 endoglucanase 활성을 Fig. 3-6A (YNN27/pVT-C4), Fig. 3-6B (2805/pVT-C4), Fig. 3-6C (SEY2102/pVT-C4)에 각각 나타내었다. 균체 증식을 비교해 볼 때 SEY2102 (17~25 OD₆₀₀)와 2805 (20~29 OD₆₀₀) 균주에 비해 YNN27 균주가 낮은 균체농도(9~19 kvl,m.₆₀₀)을 보였다. 균체농도가 높을수록 endoglucanase 활성도 대체로 높아 2805 균

주가 130~590 unit/l, SEY2102 균주가 263~424 unit/l, YNN27 균주가 97~233 unit/l를 보였다. YNN27/pVT-C4 균주의 경우 균체농도가 높을 수록 endoglucanase 활성도 높은 반면에, 2805/pVT-C4와 SEY2102/pVT-C4 균주의 경우는 각 형질전환체 사이에서도 endoglucanase 활성은 균체농도에 크게 좌우되지 않음을 알 수 있었다.

이상의 시험관 배양을 통해 비교적 높은 균체농도와 endoglucanase 발현을 나타내는 형질전환체, 즉 YNN27/pVT-C4 #2 (233 unit/l, 19.8 OD₆₀₀), 2805/pVT-C4 #8 (424 unit/l, 23.5 OD₆₀₀) 및 SEY2102/pVT-C4 #10 (589 unit/l, 23.7 OD₆₀₀)의 세 균주를 최적 형질전환체로 선별하여 향후의 실험에 사용하였다.

다. 발현된 Endoglucanase의 분비국재성과 Plasmid 안정성

선별된 3종의 형질전환체를 플라스크 회분배양을 통해 균체증식에 따른 endoglucanase 분비 국재성을 조사하였다(Fig. 3-7). 대수증식기 구간인 24시간까지 균체증식은 큰 차이를 보이지 않으나, 배양 24시간 이후의 정지기부터 형질전환체에 따라 균체증식은 약간의 차이를 보이며 최종 균체농도는 SEY2102/pVT-C4 균주가 가장 높았다. *egl6*의 발현은 배양 24시간까지 균체증식에 따라 약간의 차이를 보이다가 24시간 이후 급격한 발현양상을 보였다. YNN27/pVT-C4 균주는 예외적으로 급격한 발현의 증가를 보이지 않았으며 SEY2102/pVT-C4 균주가 가장 빠른 발현속도를 보였다. 세포외 발현량이 높을수록 세포내 잔존하는 endoglucanase 활성도 높았다. 배양 48시간 이후의 endoglucanase 활성감소는, 균체증식이 느리지만 계속되고 있고 세포내 endoglucanase 활성도 크게 감소하지 않기 때문에, proteases에 의한 분해로 판단된다. Protease에 의한 분해가 SEY2102/pVT-C4 균주에서 보이지 않는 것은 SEY2102 숙주세포의 proteases 결손(*pep4::HIS3 prb1*) 때문인 것으로 사료된다. 대수증식기에 낮은 발현량(약 200 unit/l)과 정지기 초기구간인 24~48시간 사이에서의 급격한 발현(200 unit/l에서 800 unit/l까지 증가)은 세포농도의 차이에 의한 것으로 생각되며, 포도당이 고갈(12시간 이내)되고 에탄올 소모 기간(12~48시간)에서도 높은 발현속도를 보이는 것은, 다른 구성적 promoter인 *PGK* promoter에 의한 mouse α -amylase 발현과 *CYC1* promoter에 의한 *E. coli* β -galactosidase의 발현에서도 관찰된 바 있다. 즉, 소모할 탄소원이 에탄올이라도 증식저해농도 이하로 존재하여 균체증식이 어느 정도 유지되면

구성적 promoter의 전사능은 계속 효율적으로 발휘되는 것으로 추정된다.

정지기에서의 endoglucanase 분해를 고려하여 배양 48시간 때의 배양결과와 endoglucanase 분비 국제성을 Table 3-5에 요약하였다. YNN27 균주가 가장 낮은 균체농도($OD_{600}=19$)를, 2805 균주가 가장 높은 균체농도($OD_{600}=33$)를 보였으며, 총 발현된 endoglucanase 활성은 균체농도에 의존적인 양상으로 나타나 YNN27의 경우 586 unit/l, SEY2102의 경우 1023 unit/l, 2805의 경우 1142 unit/l 순서로 증가하였다. 비활성(균체농도당 endoglucanase 활성)은 세 균주 모두 31~34 unit/l/ OD_{600} 값을 보여 단위 균체당 발현능 차이는 크게 나타나지 않았다. Plasmid 안정성은 배양 72시간에서 세 균주 모두 80% 이상의 높은 값을 보였다.

발현된 endoglucanase의 분비 국제성은 세포밖 배지에 약 80%, 세포내 잔존 활성중 periplasmic space 잔존 활성이 11~13%, 세포질 분획에서의 활성이 8~10% 정도로 세 균주에서 모두 비슷한 분포를 보였다. 즉, 본 연구에서 사용한 세가지 숙주세포는 *Trichoderma* sp. C4 endoglucanase 분비능에 큰 차이를 보이지 않으며, endoglucanase의 signal peptide는 *S. cerevisiae*에서 단백질 분비 기능을 효과적으로 발휘함을 알 수 있었다. *Trichoderma* 유래의 cellulases 외에도 α -L-arabinofuranosidase, β -xylosidase, β -xylanase, endochitinase, β -mannanase 등의 유전자도 cloning되어 *S. cerevisiae*에서 발현되었는데 이들 균체의 효소는 효모에서도 효율적으로 분비되었다.

이상의 결과로부터 *Trichoderma* endoglucanase의 발현·분비수율을 향상시키기 위한 유가식 배양(공급 탄소원이 포도당)에는 빠른 균체증식속도와 높은 증식수율을 보이는 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-C4 균주가 가장 적합할 것으로 판단된다.

라. pVT-C4 plasmid를 함유하는 재조합 효모 균주의 회분배양

Trichoderma sp. C4 유래 endoglucanase 유전자를 pVT-103U vector에 subcloning 하여 pVT-C4 plasmid를 제작하였다. Table 3-6에 나타낸 바와 같이 3종의 재조합 효모 균주 (*S. cerevisiae* YNN27/pVT-C4, *S. cerevisiae* 2805/pVT-C4, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-C4)를 발효조 회분배양한 결과, 균체증식(38 OD_{600})과 총발현량(1003 unit/mL) 및 비활성(26 unit/mL/ OD_{600}) 관점에서 SEY2102 균주가 가장 우수한 반면, plasmid 안정성(80% 이상) 및 분비효율(80% 이상)은 숙주세포에 따른 차이가 크지

않았다. 따라서 SEY2102/pVT-C4를 이후의 유가배양을 통한 endoglucanase 과발현·생산연구에 사용했다.

마. 효모에서 발현된 endoglucanase의 전기영동 분석

3종의 효모 형질전환체에서 세포밖으로 분비된 단백질을 전기영동으로 분석했을 때, 정제된 야생형 endoglucanase (SDS-PAGE에서의 분자량은 약 63 kDa)와 동일한 위치에 뚜렷한 band의 확인은 곤란하였다(Fig. 3-8A). 그러나, nondenaturing-PAGE에서는 endoglucanase 활성 band가 두개로 나타났으며 당단백질의 전형적인 disperse band를 보였다(Fig. 3-8B). 세가지 숙주세포에 따른 재조합 endoglucanase 활성 band들의 이동상의 차이는 거의 나타나지 않았지만 야생형과 비교해서는 큰 차이를 보이고 있다. *Trichoderma sp.* C4 *egl6*의 결정된 염기서열로부터 ORF는 1254 bp이며 예상 아미노산 417개 (분자량은 약 46 kDa)를 고려하면, 야생형에 추가었던 당쇄 (당쇄함량 약 40%)가 재조합형에도 상당한 비율로 발생했고, *Trichoderma* 균주와는 다른 훨씬 더 복잡하고 불균일하게 당쇄가 추가되었음을 알 수 있다. 이와 같은 당쇄부가 차이는 *egl1*, *egl4*, *cbh1*, *cbh2* 등을 효모에서 발현시켰을 때도 관찰되며, 특히 *Trichoderma* CBH I (*cbh1* 산물)과 EG I (*egl1* 산물)의 경우 N-linked 당쇄부가 위치 중에 N-acetylglucosamine unit가 하나인 곳도 보고되었고(효모에서는 두 개), 핵심 당쇄(core glycosylated moiety)의 구조가 효모와 다름도 밝혀졌다. 즉, 당쇄합성과 절단에 관련된 효소로써, 효모의 endoglycosidase F 또는 H와 α -1,2-mannosidase와는 특이성이 틀린 효소들이 *Trichoderma* 균주에 존재하며, 이와 같은 당쇄절단기작(glycosylation trimming mechanism) 관련 효소들의 작용에 의해 당쇄에 차이가 발생하는 것으로 추정된다.

바. 재조합 효모 균주의 효능검증

Trichoderma sp. C4 유래 endoglucanase 발현 재조합 효모 균주의 in vitro 효능 검증을 위해 각 균주별 기질 (orchard grass) 에 대한 In vitro NDF 분해율을 조사하였고, 이때 사용한 공시균주의 cellulase activity와 단백질 농도는 Table 3-7과 같다. Wild type인 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102와 섬유소 분해 우수 균주인 *Trichoderma sp.* C4유래 endoglucanase 유전자 (C4) 발현 재조합 효모 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* pVT-C4를 배양하여 동결건조 시킨후 50ml screw cap tube에 orchard grass 기질 0.8g 과 인공타액(McDougall's buffer) 24ml, 반추위액(Rumen fluids) 6ml을 넣고 각

각의 공시균주(0.2mg/ml)를 접종하여 37°C shaking incubator에서 시간별(0, 24, 48, 72h)로 배양한 후 분해된 NDF(Neutral detergent fiber), ADF(Acid detergent fiber) 양(%)을 측정하였다. 배양 24 시간때에는 *Trichoderma* sp. C4에서 분리한 cellulase 유전자가 발현된 형질전환 재조합 사료 첨가제 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 (pVT-C4) whole cell extract에서 다른 공시 균주보다 NDF 분해율이 높았지만 유의적 수준의 효과는 보이지 않았다. 그러나, 배양시간을 증가하여 48시간, 72시간까지 배양시켰을 때 유의적으로 다른 공시 균주보다 현저한 NDF 분해율이 증가되는 양상을 나타내었다.(Table 3-8)

또한 같은 형질전환 균주에서도 supernatant만을 동결건조시킨 제재(III)보다 supernatant를 포함한 whole cell extract에서 NDF 분해율에 대한 효과가 좋게 나타났다. 이것은 기질, 즉 cellulose를 분해하는데 있어서 균주내에 가지고 있던 intracellular enzyme의 일종인 여러효소(esterase) 등의 복합적인 작용으로 말미암아 p-coumaric acetic acid와 결합하고 있는 기질 cellulose를 분해하는데 상승적으로 작용하여 supernatant만을 동결건조시킨 제재(III) 보다 더 효과적으로 cellulose 기질을 분해한 것으로 보인다. 또한 *Saccharomyces cerevisiae* 균주 자체가 cell 자체로 각종 아미노산, 미지성장인자(UGF), 비타민의 공급원으로 반추위액내 cellulolytic bacteria의 성장을 촉진시킴으로써 간접적으로 NDF 분해율을 증가시켰을 것으로 생각된다. 이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때 배양시간 48에서 72시간까지 유의적으로 재조합 cellulase 분비 제제 (*Saccharomyces cerevisiae* SEY2102(pVT-C4) whole cell extract)가 NDF 분해율에 큰 효과를 보였다. 따라서, Endo-glucanase 발현 재조합 효모 균주 첨가로 인한 가축의 소화불량 및 영양소 이용률을 개선됨으로서 고품질의 축산물 생산을 도모할 수 있는 고부가가치 사료를 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

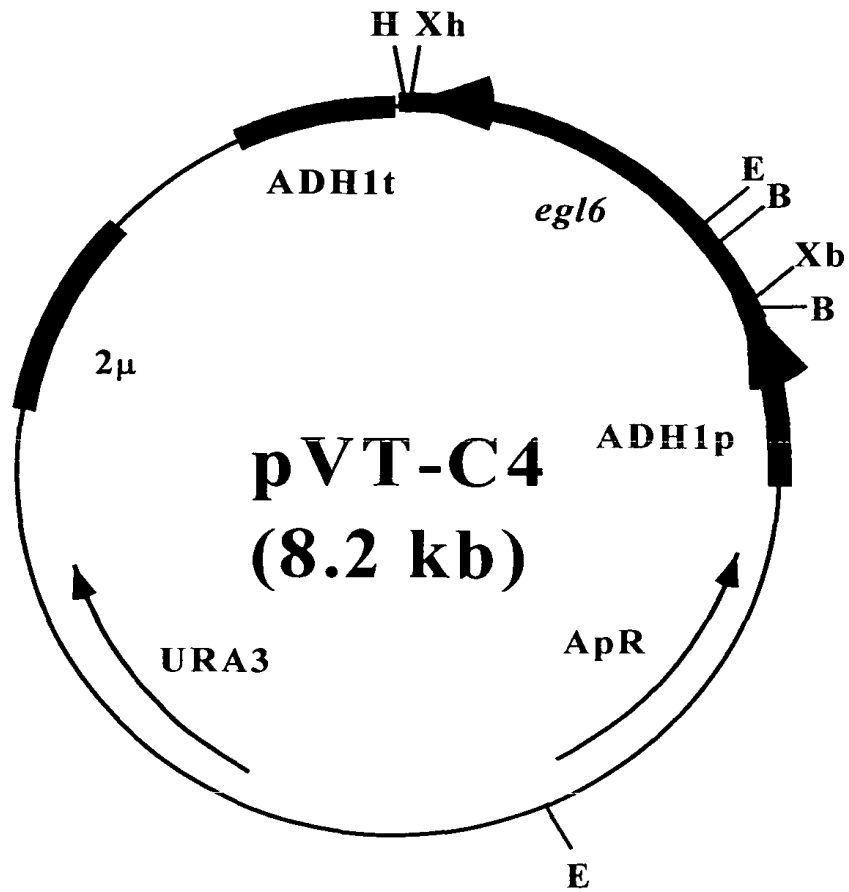


Figure 3-5. Schematic diagram of pVT-C4 plasmid.

Restriction enzymes : B, *Bam* HI; E, *Eco* RI; H, *Hind* III; Xb, *Xba* I; Xh, *Xho* I

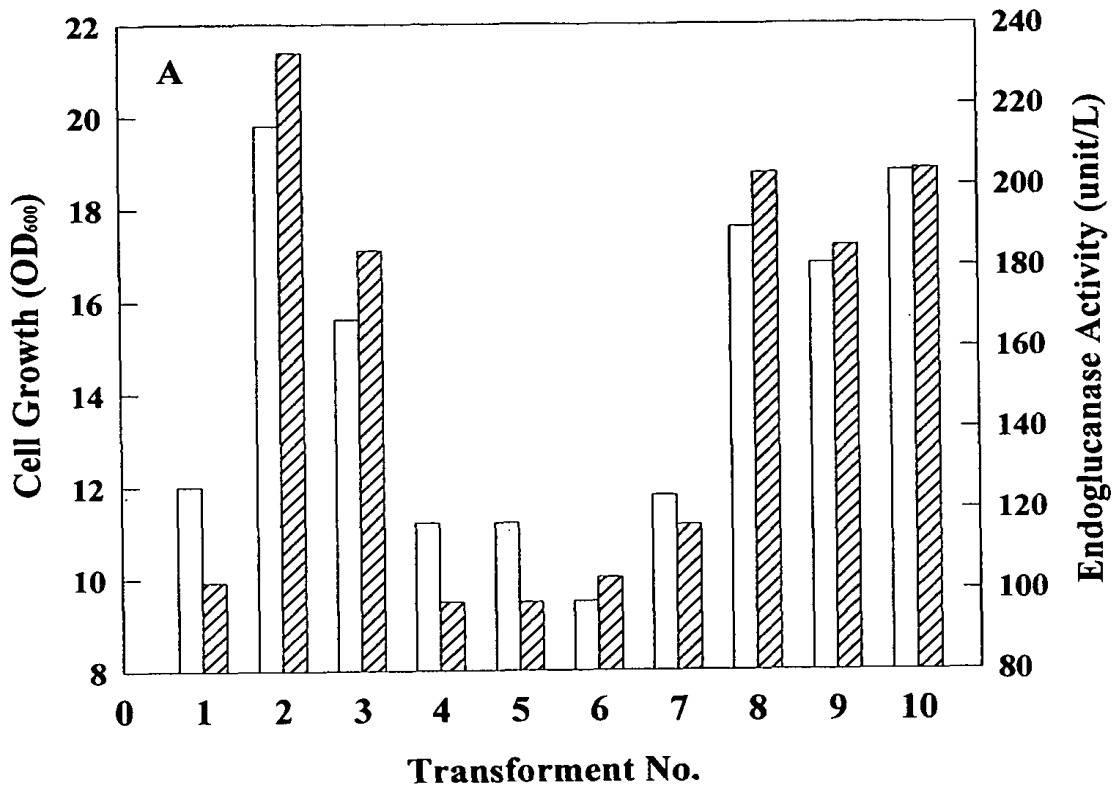
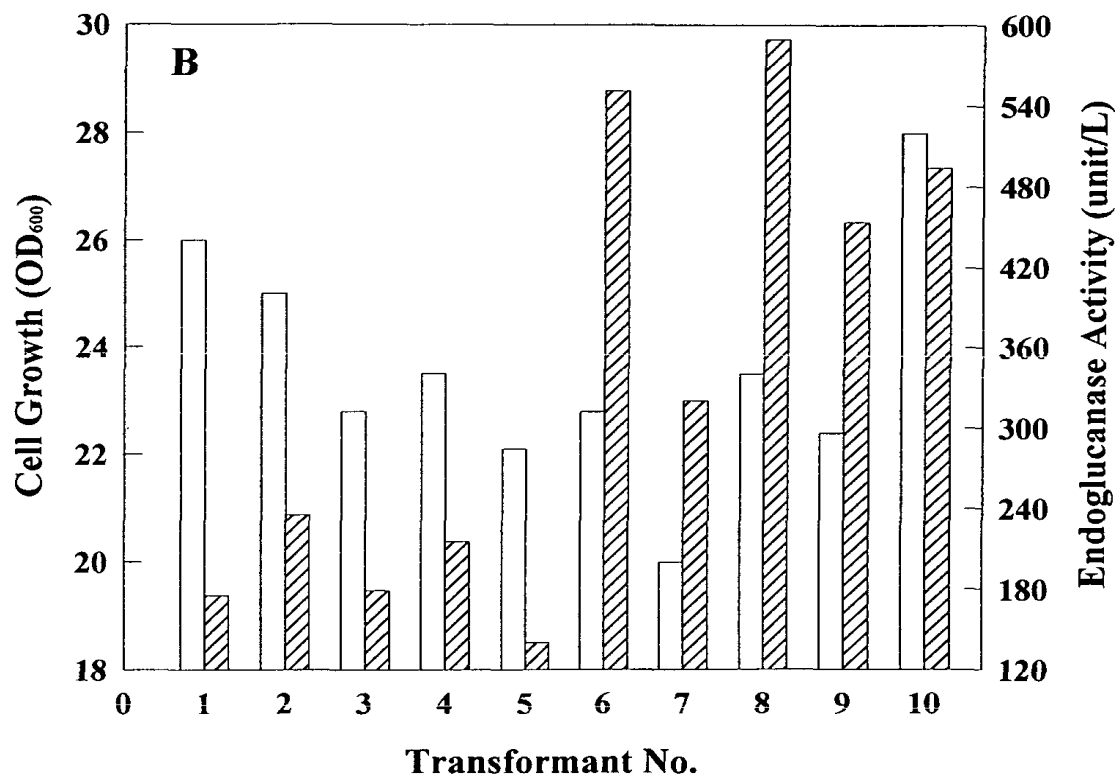


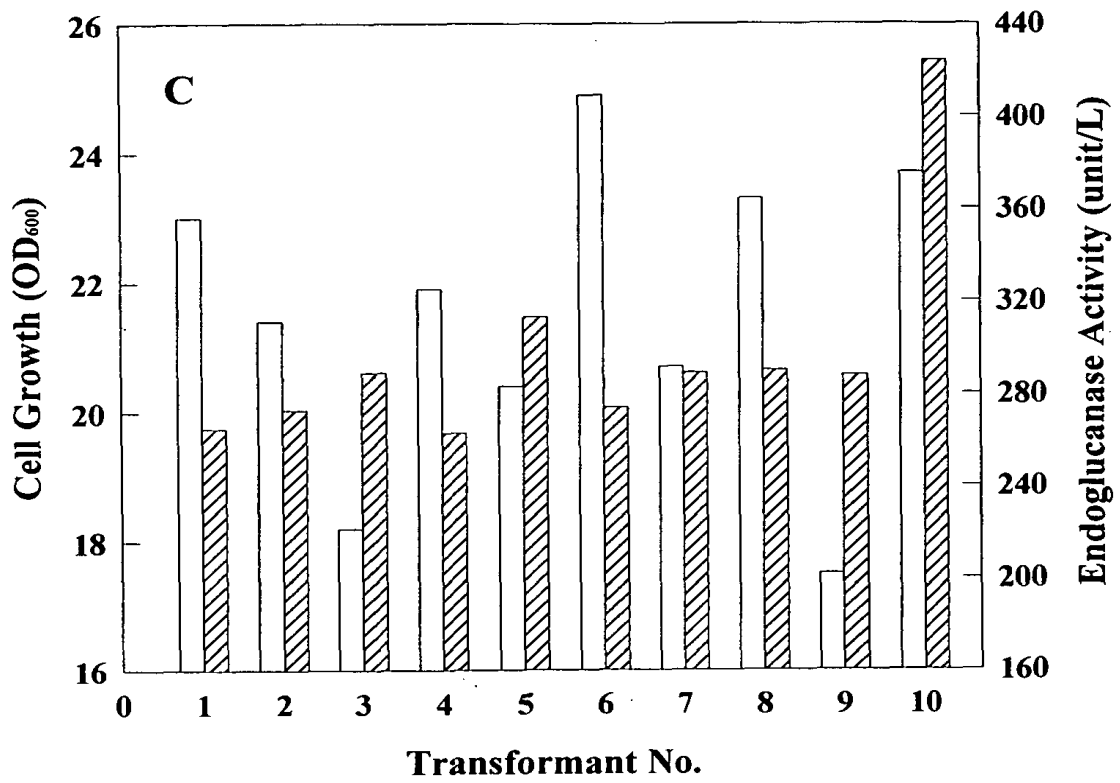
Figure 3-6. Cell growth and endoglucanase expression between *S. cerevisiae* YNN27/pVT-C4 (A), SEY2102/pVT-C4 (B), and 2805/pVT-C4 (C) transformants.

Open bar(□), cell growth; hatched bar(▨), endoglucanase activity.

(Figure3-6. continued)



(Figure3-6. continued)



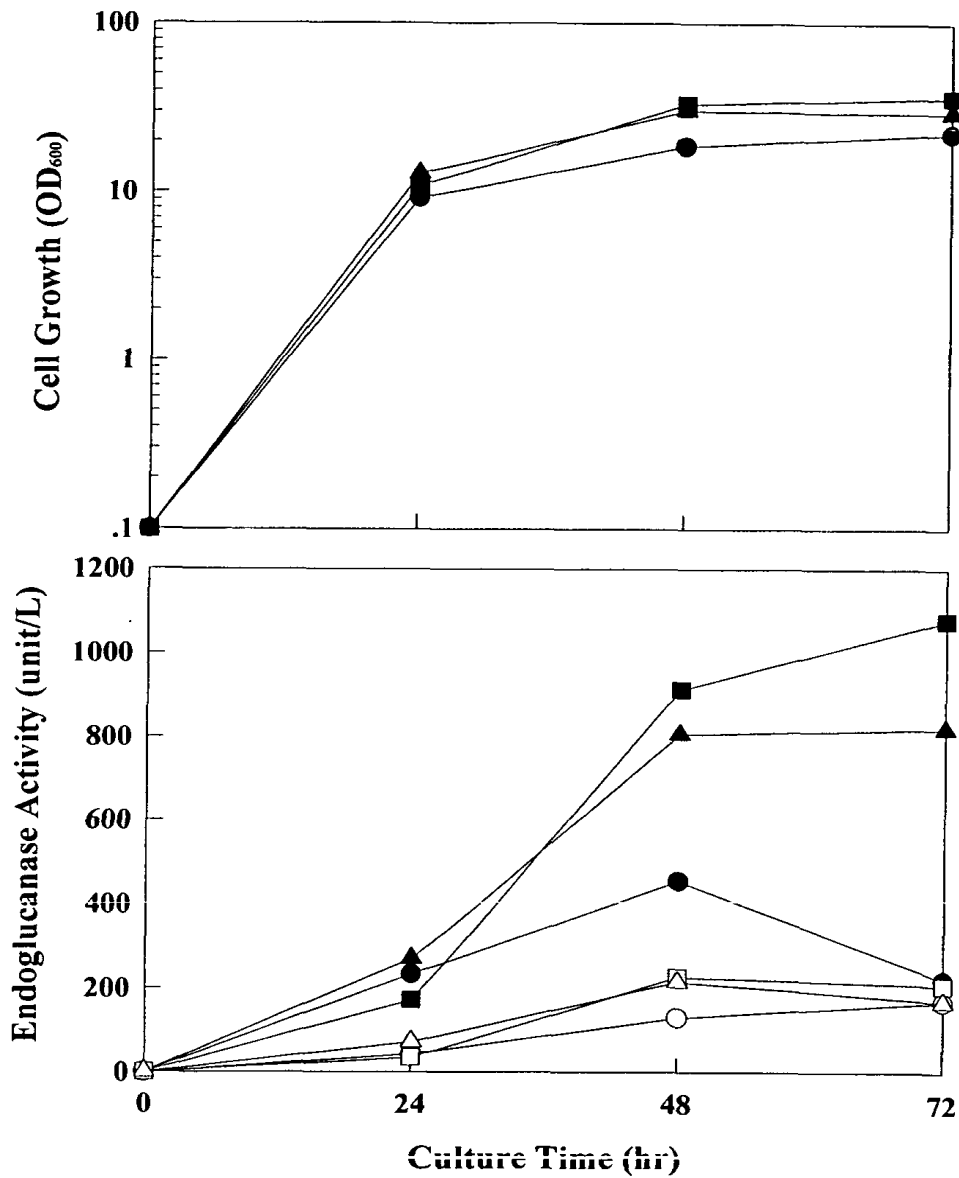


Figure 3-7. Comparison of cell growth and endoglucanase activity between *S. cerevisiae* transformants.

Symbols are: (●, ○), YNN27/pVT-C4; (■, □), SEY2102/pVT-C4; (▲, △) 2805/pVT-C4. In bottom figure: (closed symbols), extracellular endoglucanase activity (open symbols), intracellular endoglucanase activity.

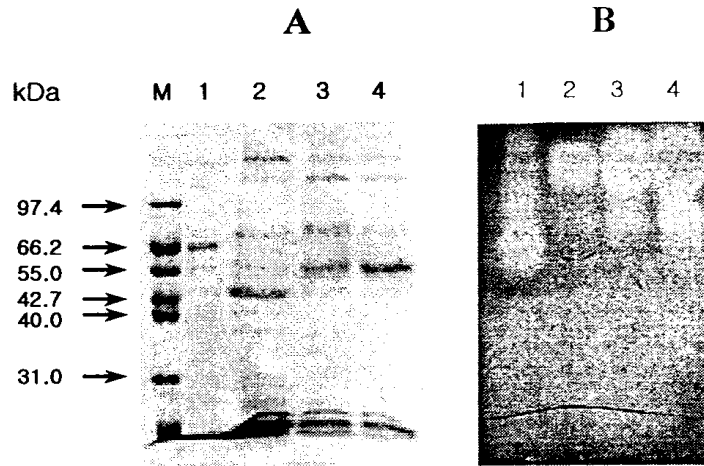


Fig. 3-8. SDS-PAGE (A) and nondenaturing-PAGE (B) analyses of wild-type and recombinant extracellular endoglucanases.

SDS- and nondenaturing-polyacrylamide gels were stained with Coomassie Brilliant blue R-250 and Congo-red, respectively. Lane M, protein molecular weight marker; lane 1 purified wild-type endoglucanase; lane 2, YNN27/pVT-C4; lane 3, 2805/pVT-C4; lane 4, SEY2102/pVT-C4.

Table 3-5. Cell growth, plasmid stability, and localization of endoglucanase activity in three yeast transformants grown on YPD medium for 48 hr.

Host Strain	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Plasmid Stability* (%)	Endoglucanase Activity (unit/l)				Secretion Efficiency (%)
			Medium	Periplasm	Cytoplasm	Total	
YNN27	18.7	83	456	74	56	586	78
2805	33.4	80	914	130	98	1142	80
SEY2102	30.5	86	807	132	84	1023	79

*Plasmid stability at 72 hr cultivation.

Table 3-6. Comparison of batch fermentation results for cell growth, plasmid stability, endoglucanase activity, secretion efficiency, and specific activity between *S. cerevisiae* YNN27, 2805, and SEY2102 cells transformed with pVT-C4 plasmid

Culture Time (hr)	Host cell	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Plasmid Stability (%)	Endoglucanase Activity (unit/L)				Secretion Efficiency (%)	Specific Activity (unit/L/OD ₆₀₀)
				Medium	Periplasm	Cytoplasm	Total		
24	YNN27	23.8	86	454	57	27	538	84.5	22.6
	2805	29.7	89	731	128	37	896	81.2	30.2
	SEY2102	33.2	85	700	108	49	857	81.7	25.8
36	YNN27	27.8	78	493	75	23	591	83.4	21.3
	2805	38.3	81	808	153	42	1003	80.6	26.2
	SEY2102	35.4	86	729	123	43	895	81.5	25.3

Table 3-7. Freeze dried samples of SEY 2102 and 2102/ pVT-C4 for In vitro test

	Freeze dried Weight (g)	Glucose Conc. (mg/100mg power)	CMCase Activity (Unit/100mg power)	Protein Conc. (mg/100mg power)
SEY2102	2.75	31.61	N.D	36.72
2102 supernatant	2.61	29.14	N.D	30.99
2102/pVT-C4	3.08	25.78	5.410	33.64
2102/pVT-C4 supernatant	2.31	28.94	4.549	19.96

Table 3-8. In vitro NDF digestibility of orchard grass

Strains	Time(hr)	% NDF digestibility		
		24	48	72
I		3.61	6.54 ^b	19.71 ^b
II		1.28	3.09 ^a	13.52 ^a
III		2.18	4.92 ^a	16.1 ^{ab}
IV		0.99	3.91 ^a	14.65 ^{ab}

- * I. *Saccharomyces cerevisiae* 2102 harboring pVT-C4: whole cell
- II. *Saccharomyces cerevisiae* 2102: whole cell
- III. *Saccharomyces cerevisiae* 2102 harboring pVT-C4: supernatant
- IV. *Saccharomyces cerevisiae* 2102: supernatant

* Alphabetic letters(superscript) : P<0.01

3. *Trichoderma sp.* C4 유래 endoglucanase 발현 수율 극대화를 위한 고발현 재조합 *Pichia pastoris* 효모 균주 개발

가. Endoglucanase 고발현 효모균주 구축

pVT103-U에 cloning 되어 있는 *Trichoderma sp.* C4 endoglucanase를 AOX1 promoter 를 가지고 있는 *Pichia pastoris*용 pPICZ α A vector에 PCR방법을 이용하여 cloning하기 위하여, 다음과 같이 primer를 제작하였다.

5'-TTTTGAATTCATGAATAAGCCTA-3'

5'-CTCTCTCGAGTAATTGTGGATGT-3'

위의 primer를 이용하여 PCR한 결과 1.4kb의 band가 형성되었다. 따라서 이 band를 pPICZ α A에 cloning하여 pPICZ α A/C4 endo를 구축하였다 (Fig. 3-9).

나. *Pichia pastoris*용 최적 형질 전환체 선별

대량 발현을 하기 위해서는 Multi copy transformant의 선별이 요구되었다. 따라서 multi copy transformant를 개발하기 위하여 in vitro, in vivo mutimerization을 수행하였다. 연속된 electroporation을 수행하면서 zeocin 농도를 100 μ g/ml에서 1000 μ g/ml까지 늘려 가는 실험을 3차례 반복한 결과, multi copy transformant를 찾았다.

multi copy transformant 5개를 BMGY 배지에서 2일간 배양한 후, BMMY 배지에서 5일간 methanol에 의해 induction하며, 배양한 결과 형질 전환체 B에서 314U/l의 cellulase activity를 나타냈다. 이 수치는 약 50U/l를 나타내는 Wild type host *Pichia pastoris*의 cellulase activity에 약 6배에 해당한다(Table 3-9, Fig. 3-10).

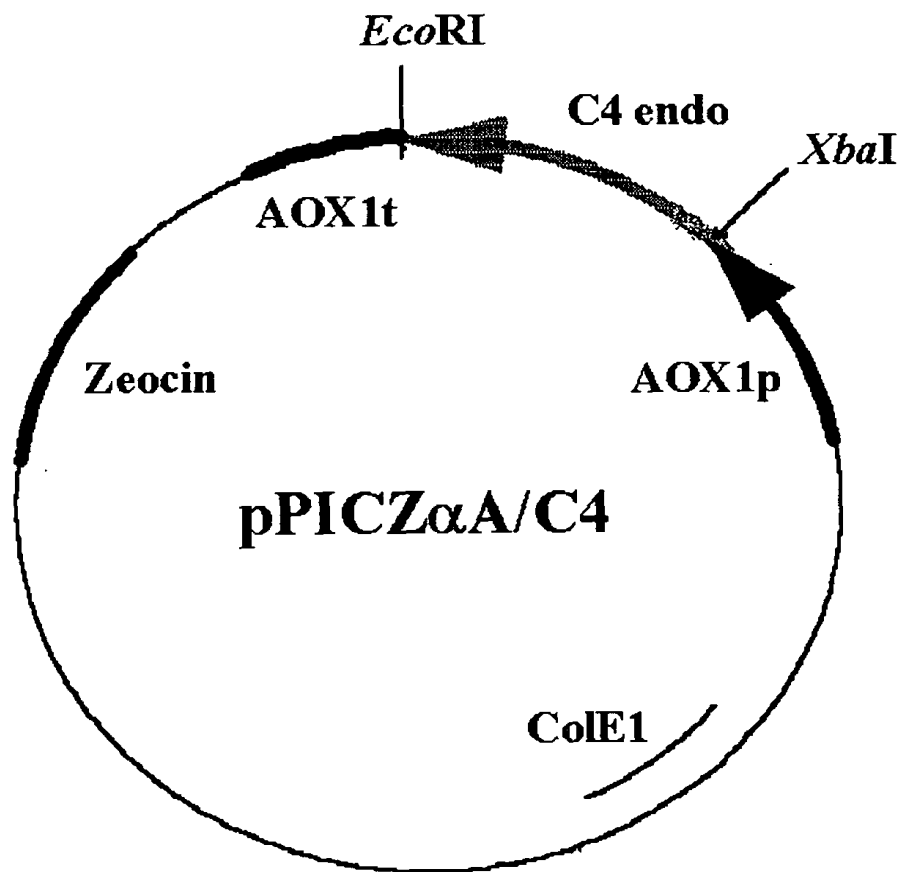


Figure 3-9. Restriction map of pPICZ α A/C4 endo

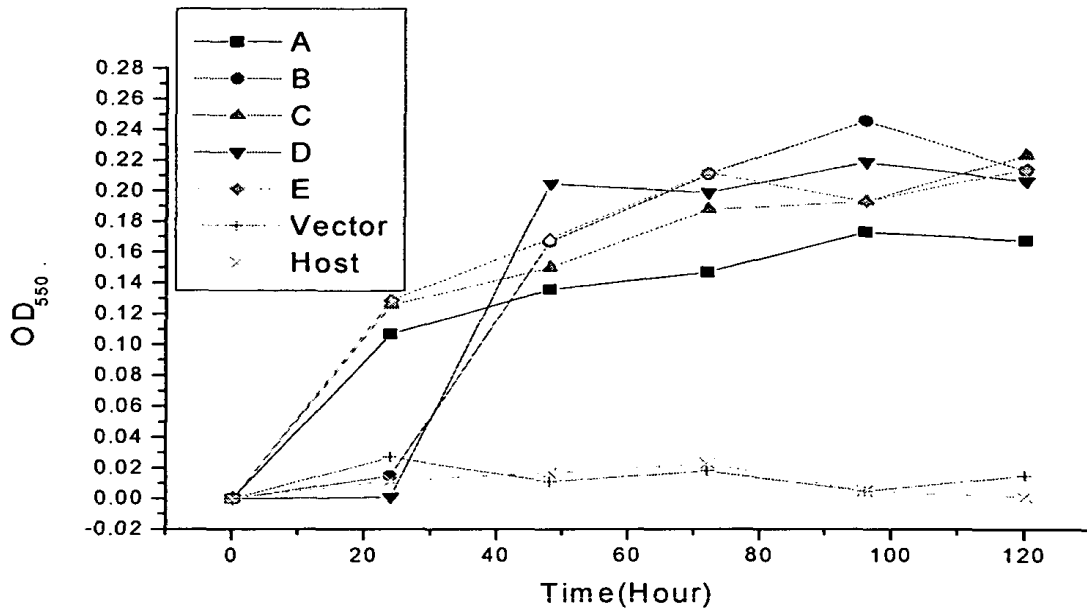


Figure 3-10. Comparison of Cellulase activity between *Pichia pastoris* transformants harboring pPICZ α A/C4 endo

Table 3-9 . Cellulase activity of *Pichia pastoris* transformant harboring pPICZ α A/C4 endo (Activity(U/ ℓ) : ACT로표기)

Sample	<i>Pichia pastoris</i> transformants harboring pPICZ α A/C4 endo										Host with vector itself		Wild type host	
	A		B		C		D		E		OD ₅₅₀	ACT	OD ₅₅₀	ACT
	OD ₅₅₀	ACT	OD ₅₅₀	ACT	OD ₅₅₀	ACT	OD ₅₅₀	ACT	OD ₅₅₀	ACT				
1 day	0.107	151	0.015	43	0.126	173	0.001	26	0.129	177	0.027	57	0.012	39
2 day	0.136	185	0.167	221	0.150	201	0.205	266	0.169	224	0.011	38	0.017	45
3 day	0.147	198	0.211	273	0.188	246	0.199	259	0.212	274	0.018	46	0.023	52
4 day	0.173	228	0.246	314	0.193	252	0.219	282	0.193	252	0.005	31	0.005	31
5 day	0.168	199	0.214	276	0.224	288	0.207	268	0.215	278	0.015	43	0.001	26

4. *Trichoderma sp.* C4 유래 β -glucosidase를 발현하는 재조합 균주의 개발 및 발현 수율 극대화

가. *Trichoderma sp.* C4 유래 β -glucosidase 발현 재조합 균주 구축

균체증식과 외래유전자를 동시 발현하는 β -glucosidase 고발현 재조합 균주를 개발하기 위해 ADH1 promoter를 가지고 있는 pVT-103 u vector를 사용하였다. 먼저 pGEM T-easy vector에 cloning되어 있던 *Trichoderma sp.* C4 유래의 β -glucosidase gene을 *Xba* I으로 digestion한 후 β -glucosidase gene 내에 *Xho* I recognition site가 두 개 있으므로 *Xho* I으로 partial digestion하여 yeast - *E. coli* shuttle vector인 pVT-103 u에 subcloning하고 pVT- β G로 명명하였다.(Fig. 3-11) pVT- β G를 *S. cerevisiae* SEY2102에 transformation하여 β -glucosidase 재조합 균주를 개발하였다.

나. 최적 형질 전환체 선별

Saccharomyces cerevisiae (SEY 2102)에 형질전환된 균주를 200ml YNBCAD(0.67% Yeast nitrogen without amino acid, 0.5% Casamino acid, 2% Glucose) 배지에 배양하여 72시간 배양하면서, 효소활성을 측정하였다. 그 결과 β G-5 균주가 활성측정에 있어서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3-12).

다. β -glucosidase의 발현 수율 극대화

최적 활성을 나타낸 β G-5 균주를 YNBCADT배지(0.67% Yeast nitrogen without amino acid, 0.5% Casamino acid, 2% Glucose, 0.01% Tryptophan)에서 1일간 5 l fermentor에서 30°C, pH 5.5, 600rpm, 2wcm으로 전배양 한 후, 60 l YPDG배지(1% Yeast extract, 2% Peptone, 1% Glucose, 1% Galactose)에서 동일조건으로 4일간 배양하였다. 그 결과 $OD_{600} = 23.4$ 에서 0.07unit/mL의 효소 활성이 측정되었다.

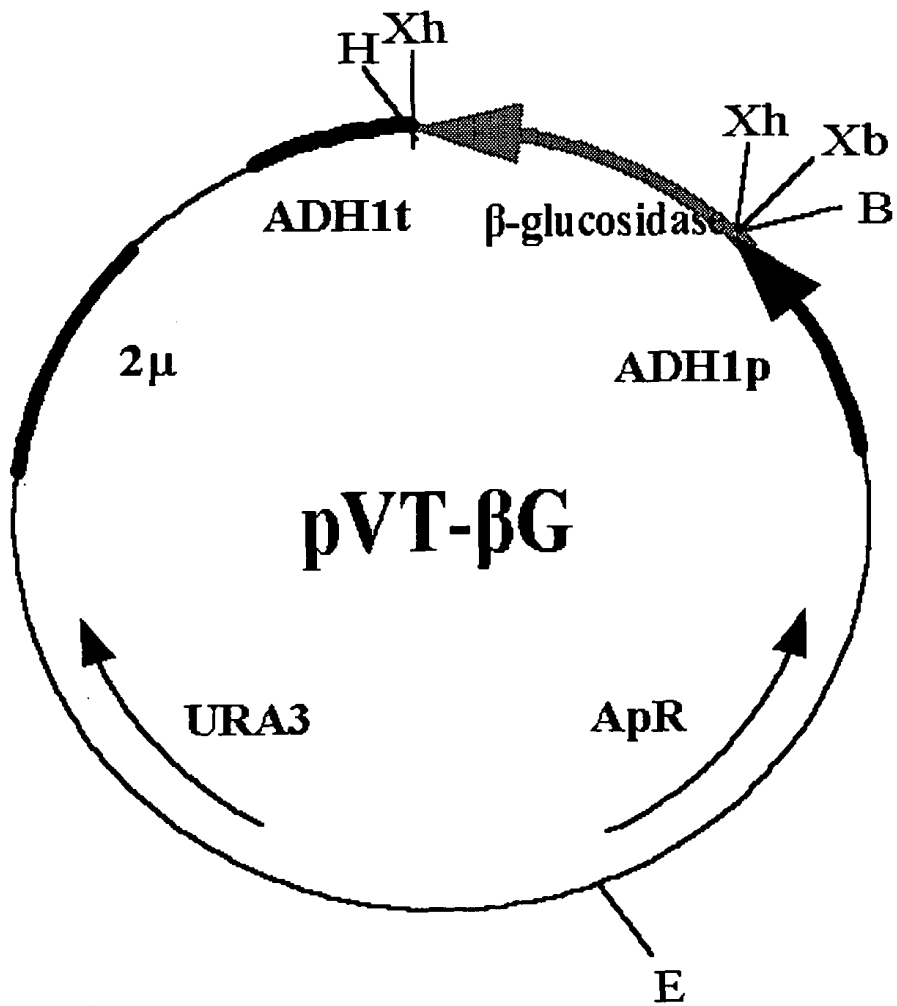


Fig. 3-11. Schematic diagram of pVT-βG plasmid.
 Restriction enzymes: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Xb, *Xba*I; Xh, *Xho*I

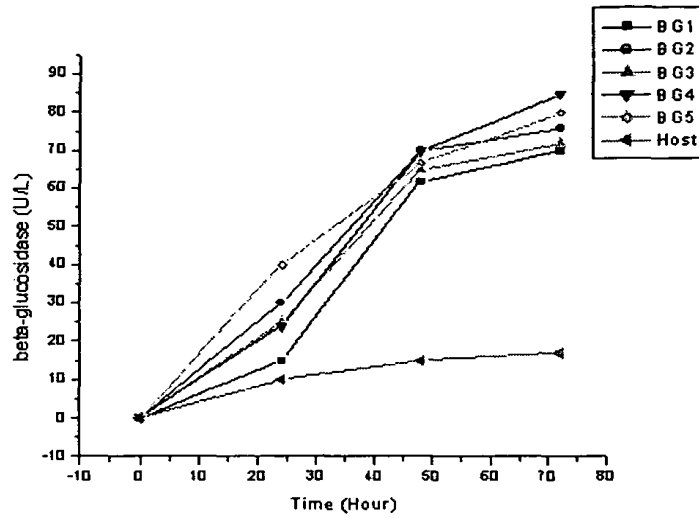


Fig. 3-12. β -glucosidase expression of *S. cerevisiae* transformants harboring pVT- β G plasmid after 72hrs shake flasks cultivation in 200ml YPD medium.

5. *Trichoderma sp.* C4 유래 Exoglucanase를 대량 생산하는 재조합 효모 균주의 개발 및 기질특이성 분석

가. *Trichoderma sp.* C4 유래 Exoglucanase(E3 gene) 발현 재조합 균주 개발

본 연구진은 당초 연구계획에는 없었지만, 연구의 효율적 수행으로 *Trichoderma sp.* C4의 exoglucanase 발현 재조합균주를 추가로 개발하였다. pVT103-U의 구성적 promoter인 *ADH1* promoter 하류에 *Trichoderma sp.* C4유래의 exoglucanase(E3 유전자)을 subcloning하여 구성적 발현체인 plasmid pVT-TExo를 제작하였다(Fig.3-13). Plasmid pVT-TExo를 앞 실험에서 최적의 host로 선정한 *S. cerevisiae* SEY2102와 2805에 각각 형질전환 시켰다.

나. 최적 형질 전환체 선별

Uracil 결핍 SD 평판 배지로 효모 형질전환체를 1차 선별한 후, 선별한 형질전환체 100~200 colony를 SD 평판 배지로 옮긴 다음에 48시간 동안 배양하였다. 효모 형질전환체를 증류수로 세척 후 4-methylumbelliferyl cellobiose (MUC) 용액을 중첩시키고 50°C에서 1~2시간 반응후, UV 조사에 의한 발광의 강도(Fig.3-14)에 의해 효모 형질전환체중 10개의 형질전환체를 선별하였다. 선별된 형질전환체 가운데 시험관 배양을 통하여 높은 균체량과 exoglucanase (avicelase) 활성을 보이는 균주를 선별하여 플라스크 배양을 하였다 (Fig.3-15). 균체 증식은 배양 12시간에서 정지기에 들어갔으며 배양 말기의 균체 증식은 SEY2102가 25 OD₆₀₀, 2805가 26 OD₆₀₀였으며, 탄소원의 소모는 배양 12시간에 거의 모두 소모되는 양상을 보였다. SEY2102/pVT-TExo의 배지와 세포내의 exoglucanase의 활성은 60시간때를 제외하고는 거의 비슷한 활성을 나타낸 반면, 2805/pVT-TExo는 배지에서의 활성이 세포내 보다 높게 나타났다. 총 생산된 exoglucanase는 SEY2102 와 2805 균주에서 각각 190 unit/L와 143 unit/L로, 분비효율은 50%와 36%, 그리고 비활성은 7.6 unit/L · OD₆₀₀와 5.6 unit/L · OD₆₀₀로 나타났다. Plasmid 안정성은 각각 91%와 80%로 분비효율 및 비활성 그리고 plasmid 안정성을 고려해 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo를 최적의 host-vector계로 선별하였다.

다. Exoglucanase의 활성염색 및 기질 특이성

앞에서 연구한, 재조합 endoglucanase인 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CT1 과 SEY2102/pVT-C4 (편의상 각각 균주에서 발현된 조효소액을 CelA와 C4로 약칭함)와

exoglucanase인 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-TExo (E3로 약칭함)에 대해서 CMC를 함유하고 있는 평판배지 (Fig.3-16)와 MUC상 (Fig.3-16)에서의 활성 염색을 행하였다. CMC를 함유한 평판배지에서는 숙주세포 SEY2102와 E3에서 흰 환이 형성되지 않은 반면, CelA와 C4에서 흰 환을 형성을 볼 수 있었다. 또한, 흰 환의 크기에 의한 정상적인 비교를 해 보면 C4가 CelA 보다 높은 CMC 분해능을 가지고 있음을 알 수 있었다. MUC에 의한 UV 조사상에서의 발광을 보았을 때 숙주세포를 제외한 모든 형질전환체에서 발광이 보였다. Endoglucanase는 CMC와 MUC를 함유한 평판배지에서 기질 모두 분해가 일어난 반면, exoglucanase는 MUC만을 함유한 평판배지에서 활성이 나타났다. 이와 같은 결과는 exoglucanase의 일반적인 기질 특이성으로 사료된다.

수용성과 불수용성의 기질에 대한 분해능을 조사한 결과 수용성 cellulose (cellodextrin, swollen cellulose)의 경우에는 endoglucanase가 높은 분해능을 보여 주었다. 그러나, 불수용성 cellulose (native cellulose, crystalline cellulose)에 대해서는 exoglucanase의 분해능이 높았다. E3는 수용성 기질인 CMC에서 C4와 CelA에 비교해 각각 40배와 2.6배의 낮은 분해능을 차이를 보인 반면, 불수용성 기질에 대해 C4와 CelA 보다 높은 분해능을 보였다.

라. Exoglucanase의 avicel binding과 synergistic effects

재조합 exoglucanase의 avicel에 대한 binding과 avicel 분해에 의한 당 생성을 Fig. 3-17에 나타내었다. Avicel 분해에 의한 당 생성은 C4가 가장 높은 당생성을 보였으며, 다음으로 CelA, E3 순이었다. E3 경우 C4에 비해 3.7배 낮은 당 생성을 보였다. 그러나, avicel에 대한 binding을 보았을 때 100 mg-avicel/mL에서의 E3 결합능을 100%로 보았을 때 CelA는 42%의 결합능을 보였으며 C4는 전혀 binding을 하지 않음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때 E3는 불수용성 기질에 높은 결합능을 가지고 있음을 알 수 있었다. E3의 경우 avicel에 대한 결합능은 높으나 결합능이 낮은 C4나 CelA에 비해 당 생성이 낮은 이유로는 E3에 의한 생성물질인 cellobiose의 저해 (inhibition)를 받은 것으로 추정된다. 실례로서, *C. thermocellum*의 exoglucanase인 CelS에서도 cellobiose의 저해를 보였으며, *T. fusca*의 cellulase와 *T. reesei* CBH I 사이에서의 상승 작용에서도 cellobiose에 의한 저해가 보고되었다.

마. Cellulose 가수분해에 대한 endoglucanase와 exoglucanase에 의한 synergism

Cellulose 가수분해에 대한 endoglucanase와 exoglucanase의 상승효과(synergistic effect)를 조사하기 위해 endoglucanase로는 CelA를 exoglucanase는 E3를 조효소액으로 사용하였다(Fig.3-19). Exoglucanase와 endoglucanase는 효소의 혼합비율에 따라, 그리고 섬유소의 결정도에 따라 효소 가수분해 반응속도가 영향을 받는다는 보고가 있다. 섬유소 가수분해를 위한 최적의 E3와 CelA 효소의 혼합비를 조사하기 위해 E3와 CelA의 일정량 (avicelase 활성; 3.6 unit/L)을 섞어 각 혼합비에 대한 avicel분해에 대한 상승효과와 당 생성을 보았다(Fig.3-19). 가장 좋은 포도당 생성은 E3와 CelA의 혼합비가 4:1일 때 관찰되었으며 이때의 avicelase 활성도 가장 높았다. 각 cellulase를 단독으로 사용했을 경우와 가장 높은 상승효과를 보여준 혼합비에 대한 시간별 avicel 분해 양상을 보았다(Fig.3-18). Endoglucanase (CelA) 단독으로 작용을 한 것이 가장 낮은 분해능을 나타냈으며, E3와 CelA를 혼합시에는 초기 10분 동안의 분해능은 exoglucanase (E3)단독으로 사용한 것과 비슷한 당 생성을 보였으나 10분 이후로는 E3와 CelA에 의한 상승효과로 인해서 보다 높은 당 생성을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 exoglucanase인 E3의 insoluble에 대한 분해능과 높은 avicel 결합능, 그리고 endoglucanase와 exoglucanase에 의한 상승 작용을 이용하면 섬유소 (crystalline cellulose)로 이루어진 볏짚이나 옥수수껍질 같은 사료의 분해를 크게 높일 수 있을 것으로 사료된다.

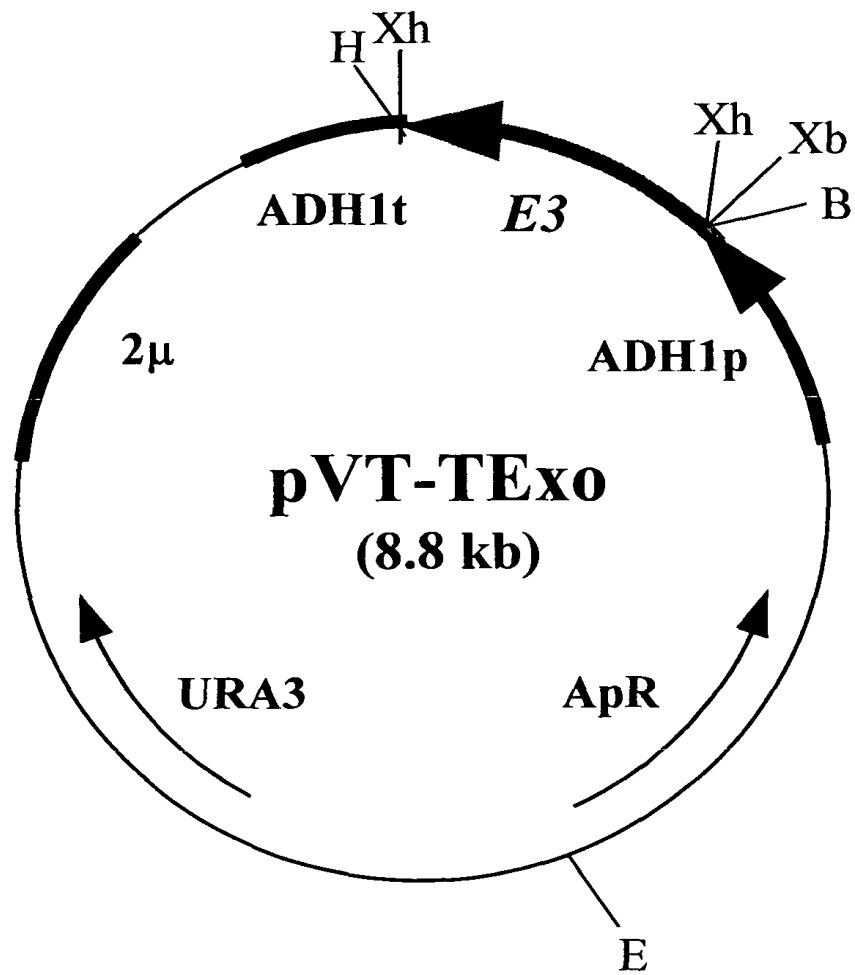
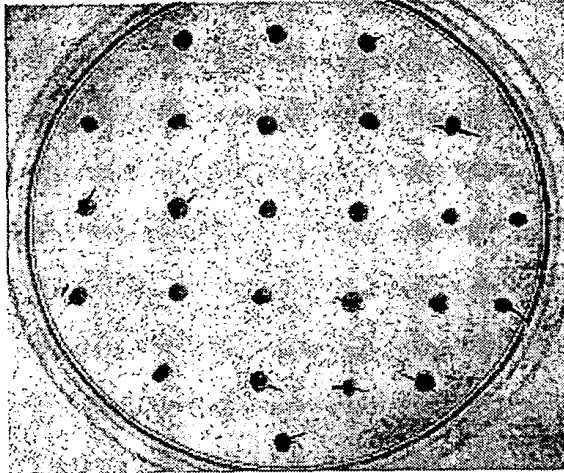


Fig. 3-13. Schematic diagram of pVT-TExo plasmid.
 Restriction enzymes: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Xb, *Xba*I; Xh, *Xho*

A



B

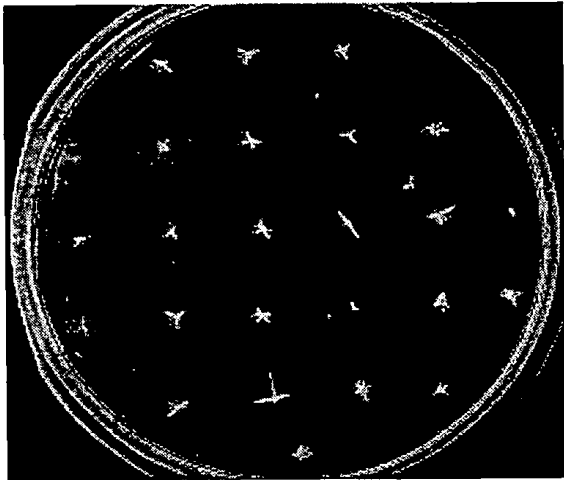
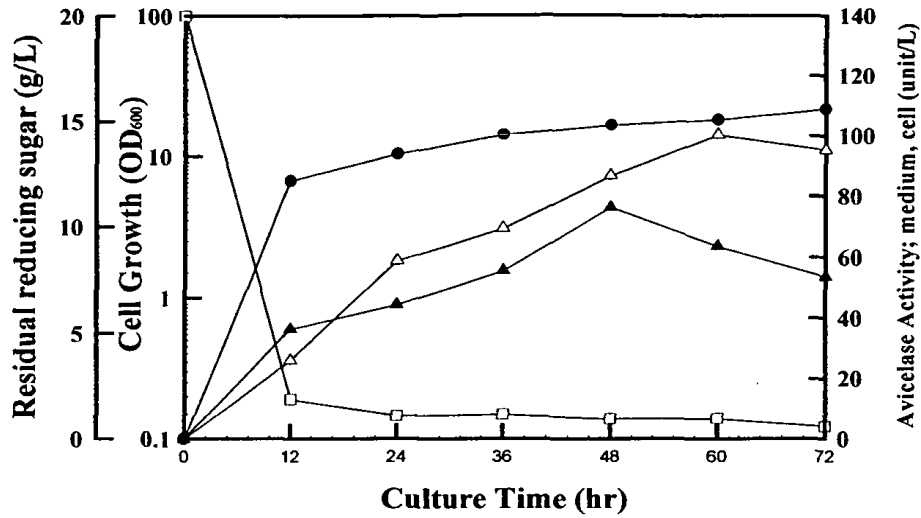


Fig. 3-14. Active staining of transformants grown on YNBCAD medium.
(A), Grown on YNBCAD medium; (B), UV irradiation after MUC addition

A



B

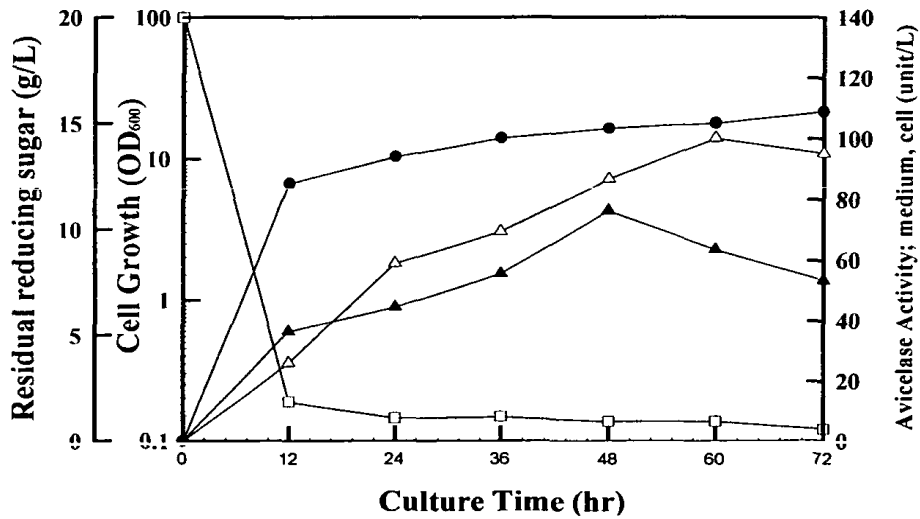
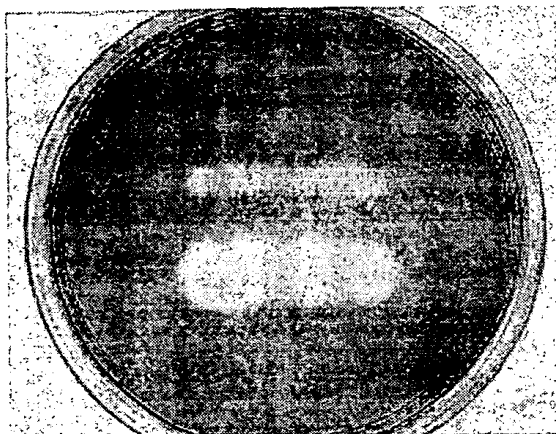


Fig. 3-15. Comparison of cell growth and exoglucanase expression between *S. cerevisiae* 2805/pVT-TEXo (A) and SEY2102/pVT-TEXo (B).

Symbols are : (●), cell concentration (OD₆₀₀); (□), glucose concentration (g/L); (▲), endoglucanase in extracellular medium; (△), endoglucanase in cell lysate.

A



B

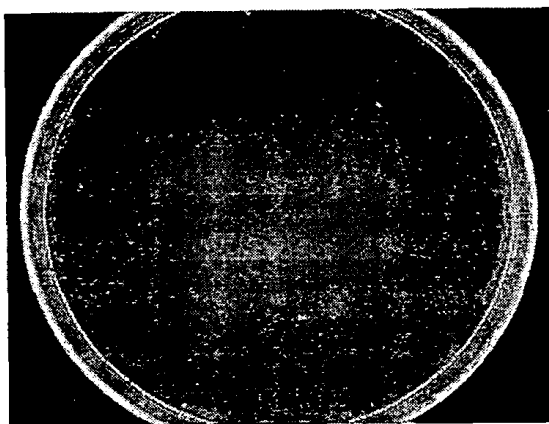


Fig. 3-16. Active staining of recombinant yeasts grown on CMC - containing medium (A) and YNBCADU (B).

(A), Congo-red staining; (B), UV irradiation after MUC addition.

- | | |
|--|--|
| 1; Host (<i>S. cerevisiae</i> SEY2102), | 2; <i>S. cerevisiae</i> SEY2102/pVT-CT1 |
| 3; <i>S. cerevisiae</i> SEY2102/pVT-C4 | 4; <i>S. cerevisiae</i> SEY2102/pVT-TExo |

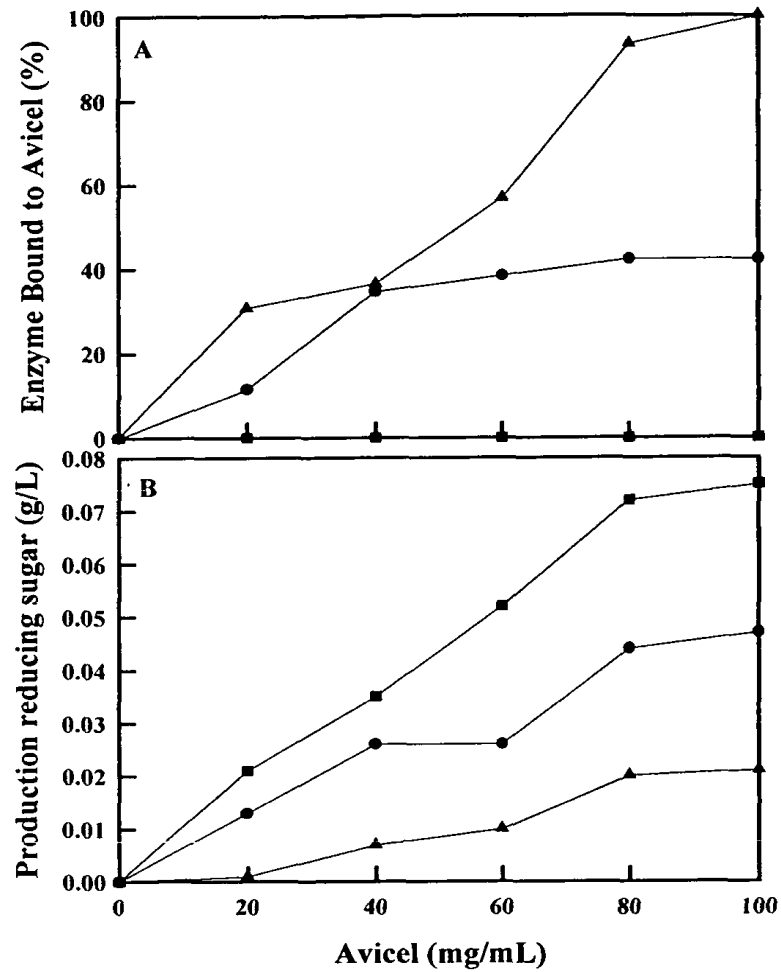


Fig. 3-17. Binding to avicel (A) and production residual reducing sugar (B) by recombinant endo- and exo-glucanases.

Symbols are: (●), CelA; (■), C4; (▲), E3

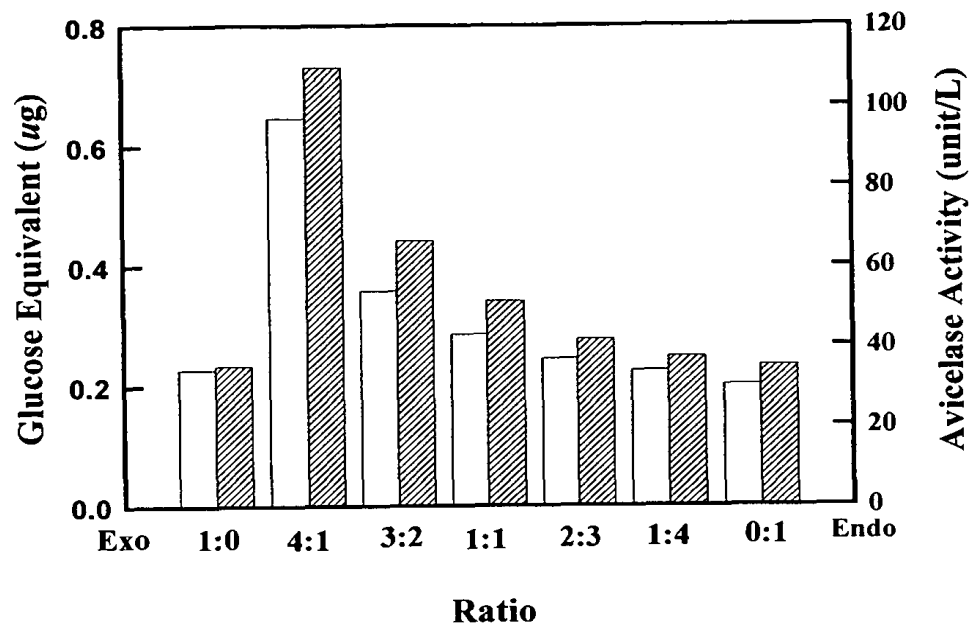


Fig. 3-18. Relationship among synergistic degradation on insoluble CMC (Avicel).

Symbols are : (□), Glucose equivalent; (▨), Avicelase activity

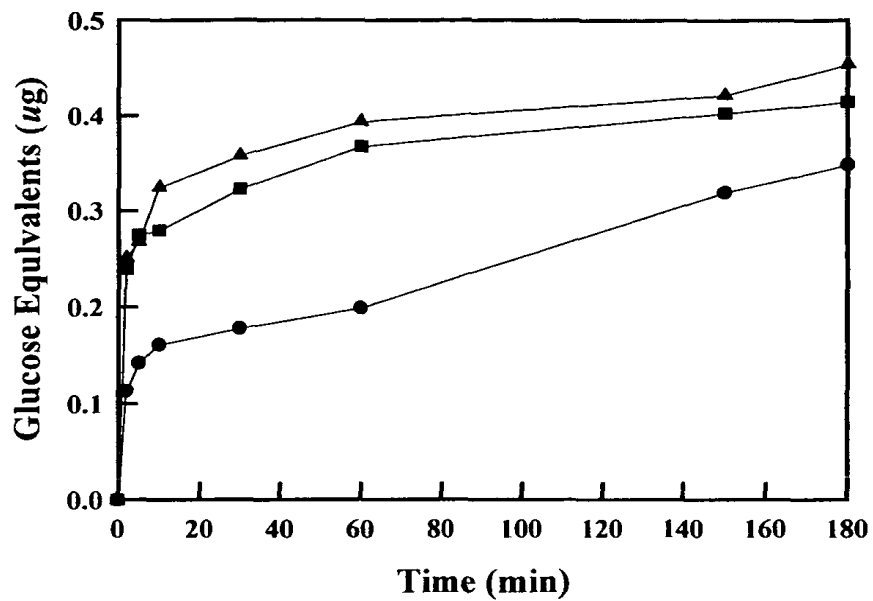


Fig. 3-19. Cooperative action of endo- and exo-glucanase and their mixture on the hydrolysis of avicel.

Symbols : (●), endoglucanase; (■), exoglucanase;
 (▲), endo- and exo-glucanases

6. *Trichoderma sp.* C4 유래 Xylanase를 대량 생산하는 재조합 호모 균주의 개발 및 고발현 균주 선별

가. *Trichoderma sp.* C4 유래 Xylanase를 발현하는 재조합 균주 개발

본 연구진은 당초 연구계획에는 없었지만, 연구의 효율적 수행으로 *Trichoderma sp.* C4 유래의 Xylanase 발현 재조합균주를 추가로 개발하였다.

먼저 *Trichoderma sp.* C4의 cDNA libraries에서 β -1,4 xylanase gene을 암호화하는 xylanase gene을 PCR을 이용하여 다음과 같이 screening하였다. xylanase의 cDNA를 screening하기 위해 이미 알려진 xylanase gene의 homology search를 통해 C1 primer를 제작하였다.

5'-GACGGTGATGGAAGCAGA-3

cDNA library 제작시 5' adaptor로 사용된 CA primer (5'-ACATGGATCCGAACAACA ACTTGAACCATG-3')와 homology search를 통해 제작된 C1 primer로 cDNA library를 PCR하여 얻은 product를 pGEM T-easy vector (Promega, U.S.A)에 cloning하였다.

그리고 cloning된 xylanase의 전체 DNA sequencing을 수행하여 674bp의 *Trichoderma harziaum* C4 xylanase cDNA gene의 염기서열을 밝히고(Fig. 3-20), xylanase 유전자를 yeast vector(pVT-103U)에 cloning하여 pPYX1을 구축한 후, *Saccharomyces cerevisiae* (SEY 2102)에 transformation하였다.(Fig. 3-21)

나. 최적 형질전환체 선별

Saccharomyces cerevisiae (SEY 2102)에 형질전환된 균주를 200ml 플라스크에 배양하여 72시간 배양하면서, 효소활성을 측정하였다. 그 결과 PS 5-3균주가 활성측정에 있어서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 3-22).

gaacaacaac ttgaaacat ggttgctttt acttcccttc tcgctggctt cgccgccatt gccggagtcc 70
tgtctgcgcc cactgagtcc tcggtgagg tagaaaagcg tcagaccatt ggacctggca cgggctacag 140
caatggctac tactactctt actggaacga tggccatgct ggogtgacat acaccaacgg tgggtggcgt 210
tcattcacgg tcaactggtc caactctggc aactttgtcg gaggcaaggg atggcagccg ggcaccaaga 280
acaaggtcat caacttctcc gtagctaca accccaacgg aaacagctat ctctccatct acggctggtt 350
cgcaaccctc tcatogagta ctacatgct gagaactttg gaacctaca cccatccact ggcgccacaa 420
agctgggtga ggttacgtct gacggcagtg tctacgacat ctaccgaact cagcgtgtca accagccctc 490
catcatcgga accgccacct ttaccagta ctggtcggtc cgccgcaacc accgtccagc ggctcgggtca 560
acacggccaa ccacttcaac gcctgggctt ctacggcct tactctcggc accatggact accagattgtt 610
gctgtgaggg atactttagc tctggctctg cttccatcac cgtc 674

Fig.3-20. DNA sequence of xylanase from *Trichoderma sp. C4*

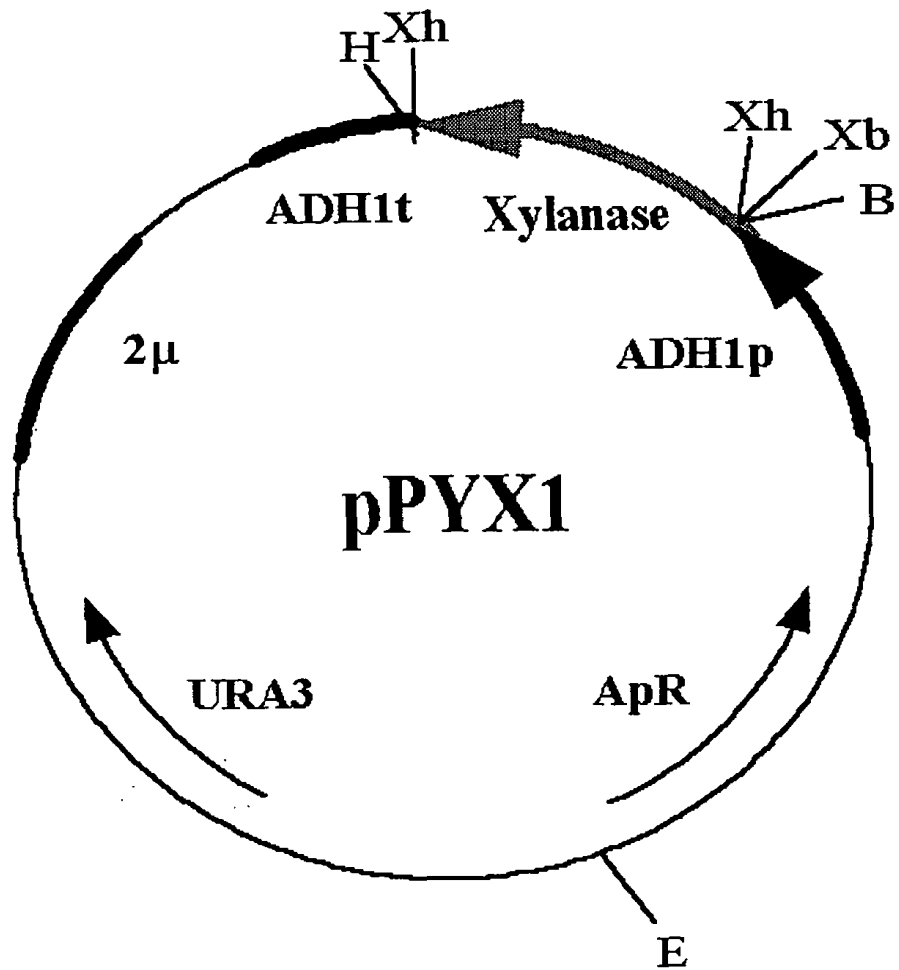


Fig. 3-21. Schematic diagram of pPYX1 plasmid.
 Restriction enzymes: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; Xb, *Xba*I; Xh, *Xho*

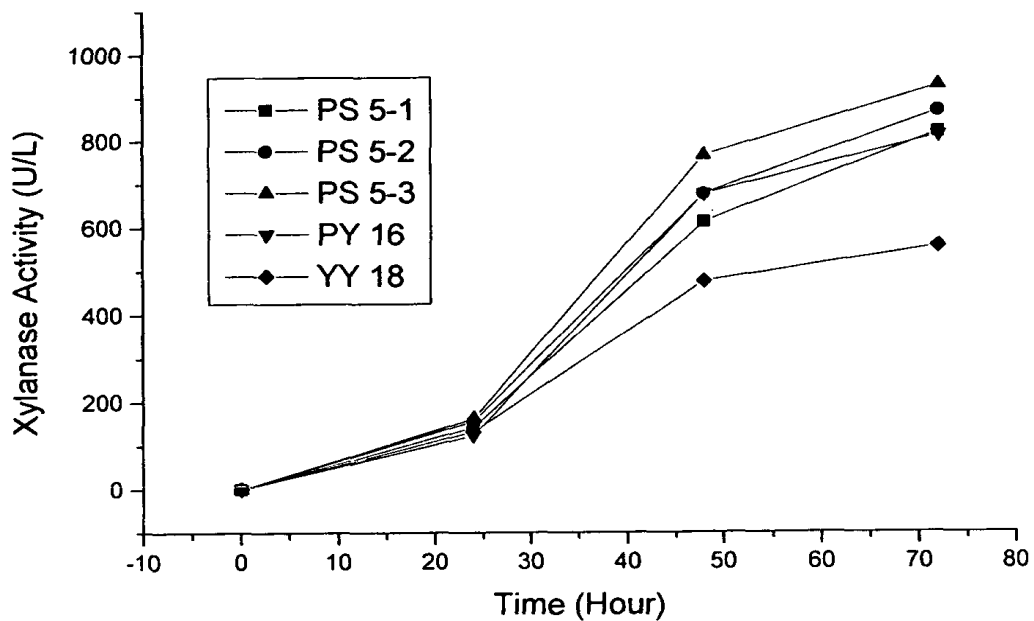


Fig. 3-22. Xylanase expression of *S. cerevisiae* transformants harboring pPYX1 after 72hrs shake flasks cultivation in 200ml YPD medium.

7. 재조합 미생물 사료 시제품의 효능 검증

가. 재조합 미생물 사료 시제품의 *in vitro* 효능 검증

1) 공시균주; *Saccharomyces cerevisiae* transformant

I. 2102/pPYX1(Endoxylanase)

II. 2102/pVT-C4(Endoglucanase)

III. 2102/pVT-TExo(Exoglucanase)

IV. 2102/pVT- β G(β -glucosidase)

V. II+III+IV(endoglucanase+exoglucanase+ β -glucosidase) mix

2) 통계처리

SAS 통계 package의 공분산분석을 이용하였고 처리간 유의성 검정은 완전임의배치법에 의한 Duncan의 다중비교분석법으로 분석하였다.

3) 실험결과 및 고찰

재조합 미생물 사료 시제품의 개발을 목적으로 본 연구진이 개발한 재조합 효모균주를 다양한 cellulolytic enzyme 효모형질전환체를 가지고 *In vitro* NDF/ADF 분해율 측정 하였다. 특히 NDF 분해율의 경우 48시간 배양시 다른 형질전환체 보다도 endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase가 혼합된 균체에서 유의적으로 NDF 분해율이 높게 나타났다($p < 0.05$)(Table 3-10). 이 결과는 cellulose를 완전히 분해하는데는 한가지의 cellulolytic enzyme보다는 endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase 의 3가지 효소의 복합 synergism 효과가 필요하다는 결과와 어느정도 부합한다고 하겠다. 한편 ADF 분해율의 경우에는 균주간 배양시간별 유의적인 결과를 나타내지는 못했지만 다른 형질전환체보다도 48시간 배양시 endoglucanase, endoxylanase를 첨가한 균주 처리구에서 분해율이 높게 나타났다.(Table 3-11)

이러한 결과로 미루어 볼 때 경제가축의 섬유소로 인한 영양학적 문제점을 해결하기 위한 유전공학 기법을 도입하여 개발한 재조합 효모 균주를 사료첨가제로 이용할 경우 가축의 생산성 능력을 극대화시키는 동시에 나아가 고품질의 축산물 생산 및 사료자원의 고급화를 꾀할 것으로 기대된다.

나. 재조합 미생물 사료 시제품의 동물사양 실험

개발된 재조합 효모 균주를 대량 배양하여 우수 섬유소 분해효소를 생산하였다. 배양된 섬유소 분해효소는 endoglucanase와 xylanase의 경우 각각 4일동안 30ℓ 배양을 하였고, Exoglucanase, β -glucosidase의 경우 두 균주를 혼합하여 4일동안 60ℓ 배양을 하였다(Table 3-12). 그리고, 배양후 배양액을 동결건조하여 미생물제제를 생산하였다. 사용된 미생물제제 혼합성분은 SEY2102/pPYX1(Endoxylanase), SEY2102/pVT-C4(Endoglucanase), SEY2102/pVT-TExo(Exoglucanase), SEY2102/pVT- β G(β -glucosidase) 균주 배양액을 동결건조한후, 혼합하여 사용하였다.

본 시험의 공시동물은 Ross broiler 중에서 체중이 균일한 건강계 120수를 선발하여 무첨가구인 대조구(0%)와 항생제 (chlortetracycline HCL + cyanocobalbmine) 0.05%첨가구 및 Cellulase 배합수준을 Cellulase I (Endo+Exo+ β -glu 0.3%), Cellulase II (Endoxyl 0.3%), Cellulase III (Endo+Exo+ β -glu 0.15%+endoxyl 0.15%) 5처리 4반복으로 반복당 6수씩 완전 임의 배치하여 사육하였다.

본 시험에 사용된 시험사료의 사료 배합율표와 영양소 함량은 육계전기 사료 Table 3-14과 육계 후기사료 Table 3-15에 각각 표시하였다.

Cellulase를 첨가하여 4주간 사양 시험한 결과 증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 Table 3-13에 나타나 있다. 무첨가구인 대조구 (0%)와 항생제 (chlortetracycline HCL + cyanocobalbmine) 0.05%첨가구 및 Cellulase 배합수준을 Cellulase I (Endo+Exo+ β -glu 0.3%), Cellulase II (Endoxyl 0.3%), Cellulase III (Endo+Exo+ β -glu 0.15%+endoxyl 0.15%)로 첨가한 결과이다. 증체량은 대조구에 비해서 cellulase II, III과 항생제구가 높은 경향을 보였고, 사료섭취량은 대조구에 비해서 cellulase II, III가 높은 경향을 보였다. 사료효율은 항생제구 및 cellulase II, III구가 대조구와 cellulase I에 비해서 높은 경향을 보였다.

Table 3-10. *In vitro* NDF digestibility of orchard grass

NDF digestibility (%)

Strains	Time(hr)	24	48
I		4.87	^a 11.17
II		2.48	^a 13.04
III		4.65	^a 12.22
IV		3.08	^a 10.62
V		3.38	^b 17.41

- * I. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pYX1(Endoxylanase)
- II. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pVT-C4(Endoglucanase)
- III. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pVT-TExo(Exoglucanase)
- IV. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pVT- β G(β -glucosidase)
- V. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/endoglucanase+exoglucanase+ β -glucosidase mix

* Alphabetic letters(superscript) : P<0.01

Table 3-11. *In vitro* ADF digestibility of orchard grass

ADF 분해율(%)

Strains	Time(hr)	24	48
I		0.57	5.07
II		2.67	5.06
III		0.15	4.49
IV		0.11	4.78
V		1.73	3.40

- * I. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pYX1(Endoxylanase)
- II. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pVT-C4(Endoglucanase)
- III. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pVT-TExo(Exoglucanase)
- IV. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/pVT- β G(β -glucosidase)
- V. *Saccharomyces cerevisiae* 2102/endoglucanase+exoglucanase+ β -glucosidase mix

Table 3-12. Enzyme Activity of microbial feed

Strains	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Enzyme Activity			
		Before freeze drying		After freeze drying	
		Extra (unit/mL)	Intra (unit/mL)	Extra (unit/g-powder)	Intra (unit/g-powder)
2102/pPYX1 (Endoxylanase)	30.7	4.95	0.71	159.71	11.02
2102/pVT-C4 (Endoglucanase)	24.6	1.34	0.57	13.35	20.11
2102/pVT-TExo (Exoglucanase)	47.8	0.76	0.18	28.21	8.12
2102/pVT-β G (β-glucosidase)		0.06	0.01	0.31	0.50

Table 3-13. Effects of dietary cellulase on performance of broiler

treatment	Weight gain(g)	Feed intake(g)	Feed efficiency(g)
Control	1,798	3,441	0.52
Antibiotics	1,934	3,393	0.57
Cellulase I	1,723	3,299	0.52
Cellulase II	1,901	3,528	0.54
Cellulase III	1,627	3,466	0.53

Table 3-14. Formula and chemical composition of experiments diets (Starter)

Ingredient (%)	Control	Antibiotics	Cellulase	Cellulase	Cellulase
		0.05%	I	II	III
Corn grain	53.67	53.67	53.67	53.67	53.67
Wheat brain	1.50	1.37	1.20	1.20	1.20
Soybean meal-45	25.80	25.80	25.80	25.80	25.80
Fish meal	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Corn gluten meal-60	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
Soybean oil	5.32	5.32	5.32	5.32	5.32
L-lysine · HCL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Methionine	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14
Tricalcium phosphate	1.32	1.32	1.32	1.32	1.32
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Vit-min. Premix ¹⁾	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antibiotics	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
Endo+Exo+ β -glu	0.00	0.00	0.30	0.00	0.15
Endoxyl	0.00	0.00	0.00	0.30	0.15
Chemical composition ²⁾					
ME(kal/kg)	3200.01	3198.12	3195.63	3195.63	3195.63
C. Protein (%)	23.02	23.00	22.97	22.97	22.97
Lysine (%)	1.13	1.13	1.13	1.13	1.13
Methione (%)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Ca (%)	1.24	1.24	1.24	1.24	1.24
Avail. P (%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45

¹⁾ Vit-min. mix provided following nutrients per kg of diet : Vitamin A,9,000,000 IU; Vitamin D3, 2,100,000 IU; vitamin E, 15,000 IU; Vitamin K, 2,000mg; VitaminB1, 1,500mg; VitaminB2, 4,000mg; VitaminB6, 3,000mg; VitaminB12, 15mg; Pan-Acid-Ca, 8,500mg; Niacin, 20,000mg; Biotin, 110mg; folic-Acid, 600mg; Fe, 40,000mg; Co, 300mg; Cu, 3,500mg;Mn, 55,000mg; Zn, 40,000mg; I, 600mg; Se, 130mg

Table 3-15. Formula and chemical composition of the experiments diets (Finisher)

Ingredient (%)	Control	Antibiotics	Cellulase	Cellulase	Cellulase
		0.05%	I	II	III
Corn grain	59.65	59.65	59.65	59.65	59.65
Wheat brain	1.50	1.50	1.20	1.20	1.20
Soybean meal-45	26.31	26.31	26.31	26.31	26.31
Corn gluten meal-60	5.10	5.10	5.10	5.10	5.10
Soybean oil	5.15	5.15	5.15	5.15	5.15
L-lysine · HCL	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
Methionine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Tricalcium phosphate	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Vit-min. Premix ¹⁾	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Antibiotics	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00
Endo+Exo+ β -glu	0.00	0.00	0.30	0.00	0.15
Endoxyl	0.00	0.00	0.00	0.30	0.15
Chemical composition ²⁾					
ME(kal/kg)	3200.02	3200.02	3195.64	3195.64	3195.64
C. Protein (%)	20.02	20.02	19.97	19.97	19.97
Lysine (%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Methione (%)	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
Ca (%)	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Avail. P (%)	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35

¹⁾ Vit-min. mix provided following nutrients per kg of diet : Vitamin A,9,000,000 IU; Vitamin D3, 2,100,000 IU; vitamin E, 15,000 IU; Vitamin K, 2,000mg; VitaminB1, 1,500mg; VitaminB2, 4,000mg; VitaminB6, 3,000mg; VitaminB12, 15mg; Pan-Acid-Ca, 8,500mg; Niacin, 20,000mg; Biotin, 110mg; folic-Acid, 600mg; Fe, 40,000mg; Co, 300mg; Cu, 3,500mg;Mn, 55,000mg; Zn, 40,000mg; I, 600mg; Se, 130mg

²⁾ Calculated values

제 4 장. 섬유소 분해 우수 효소 유전자의 확보

제1절 연구개발 방법

본 세부과제의 연구목표는 *Trichoderma sp.* C4 균주에서 cellulose 분해능을 갖는 효소를 screening하여 이 유전자의 염기서열을 밝히는 것이다. 이들의 유전자를 이용하여 제 1세부과제에서는 재조합 효소를 개발하고, 제 3세부과제에서는 이 효소를 정제하여 효소의 활성을 측정하게 되는 만큼 본 과제에서 중요한 역할을 수행하는 세부과제이다.

1. 섬유소 분해 우수 균주의 cDNA library 제작

본 세부과제는 본 연구진에 의해 분리된 섬유소 분해 우수균주인 *Trichoderma sp.* C4로부터 total RNA를 추출하여, Fungus의 세포내 RNase의 활성이 매우 높아 RNA가 분해되지 않도록 매우 단시간에 dry ice위에 올려진 막자사발에서 액체질소를 계속적으로 공급하며 분쇄를 한 다음 buffer와 acidic phenol을 첨가하여 다시 homogenizing하였다.

원심분리로 상층액을 분획시키고 다시 acidic phenol/chloroform, chloroform의 순서로 두세번 중간층이 없어질 때까지 정제과정을 반복으로 얻어진 total RNA를 formamid agarose gel에서 전기영동하여 정제 과정중의 degradation 유무를 판단하고 mRNA를 분리하였다. mRNA isolation kit(oligotex-polyT 사용)를 써서 순도 높은 mRNA를 추출하여, 5 µg의 mRNA를 주형으로 first strand cDNA library를 제작하였다.

2. 섬유소 분해 우수 효소의 Screening

cDNA 분자들을 adaptor에 의해 만들어진 제한효소 결합자리에서 self-ligation을 막기 위해 선 처리된 phagemid vector(lamda-ZAP XR)과 ligation을 수행하였다. *In vitro* packaging extract(Gigapak Gold III)를 써서 phage library를 제작하였다. Endoglucanase, β-glucosidase, exoglucanase, xylanase clone을 screening하기 위하여 helper phage를 써서 phagemid를 전환시켰다.

CMC 배지와 Mandel 배지 그리고 LB 배지에 동일한 replica를 만들어 4-methylumbelliferyl-β-D-cellobiopyranoside로 형광발색을 congo red로 환의 형성을 이

루는 clone을 찾았다.

3. Screening한 섬유소 분해 우수 효소의 염기서열 분석

Molecular Cloning Lab Protocol의 일반적인 alkali 추출방법으로 plasmid DNA를 얻고 순도를 높이기 위하여 RNase 처리하여, phenol/chloroform 처리, PEG/NaCl 로 침전등의 과정을 적용하였다. 그리고, plasmid DNA를 Sequencing하여 sequence를 *T. reesei*와 비교하여 상동성을 찾아내었다.

4. Endoglucanase promoter의 클로닝 (inverse PCR)

*Trichoderma*용 고효율 백터 개발을 위하여 promoter 개발 연구를 실시하였다. endoglucanase유전자를 이용하여 promoter cloning에 관한 기초 연구를 다음과 같이 수행하였다.

PCR을 이용한 flanking region 클로닝을 위해서는 적당한 절편을 만드는 제한효소를 찾아야 하므로 먼저 C4 genomic DNA를 가지고 Southern blot을 수행하였다. 그리고 C4 genomic DNA를 제한효소 PvuII로 절단하고 0.8%의 agarose gel에서 전기영동하여 2-3kb 정도의 DNA 절편을 gel로부터 분리하였다. 분리된 DNA 분자를 self-ligation 하였다. 분석된 C4EGII의 내부 염기서열에 따라 두 개의 synthetic primer를 제작하였다. self-ligation된 genomic DNA 절편을 주형으로 하여 PCR을 수행하였다. 얻어진 PCR 산물을 gel에서 isolation 하여 pGEM-Teasy vector에 클로닝 하였고 얻어진 클론을 분석 중이다.

제2절 연구개발 결과 및 고찰

1. *Trichoderma sp.* C4의 Endoglucanase 유전자의 확보

가. *Trichoderma sp.* C4의 cDNA library의 제작 및 Endoglucanase유전자의 cloning

Trichoderma sp. C4에서 추출된 RNA를 DEPC H₂O에 녹여서 OD₂₆₀을 측정한 결과 총량은 약 1.9 mg으로 mRNA를 추출하여 cDNA library를 제작하는데 충분한 양을 얻었다. 약 5 µg의 tRNA을 formaldehyde agrose gel에서 전기영동하여 확인한 결과 추

출중에 거의 파괴된 것이 없는 것으로 보여졌다. 두 set의 다른 ligation sample로 시도한 결과 #1 batch에서는 46×10^4 pfu/ μ g, #2 batch에서는 26×10^4 pfu/ μ g인 C4 균주의 cDNA library를 제작하였다. 이들 두 batch를 amplify하여 각각 1.4×10^7 (17 mL)와 2.2×10^7 (15 mL)의 library를 만들어 분주한 후 -80°C 냉동고에 screening할 때까지 보관하였다. 충분한 숫자의 library 두 batch가 제작되었으므로 우리가 계획한 endoglucanase 유전자의 cloning을 성공적으로 수행할 수 있었다. 10여차례의 반복된 1차 선별작업과 여기서 얻어지는 clone들의 2차 선별, 또는 필요한 경우 3차 선별을 통하여 총 100 여개의 phage clone을 얻었다. plasmid clone으로 전환하여 본 결과 1 종류의 endoglucanase 유전자만이 다수의 clone에서 얻어졌다. Cloning된 endoglucanase transformant들에서 단백질을 추출하여 non-SDS/PAGE에서 separation시키고 4-methylumbelliferyl- β -D-cellubiosid를 기질로 사용한 gel blot에서의 activity 실험과 CMC agar gel blot를 congo-red staining하여 효소 활성도를 test한 결과, 상대적으로 #28 clone이 단백질 양이 많이 gel에 loading되기는 하였지만 효소 활성도에서 다른 clone들보다 뚜렷한 결과를 보여주었다.

나. Endo-glucanase clone 선별과 insert 크기 확인

cDNA library에서 선택된 clones의 plasmid에 삽입된 insert DNA크기를 확인하기 위하여 EcoRI와 XhoI, PstI, HaeIII 제한 효소로 절단한 후 0.8%와 2% agarose gel에서 전기영동하였다. 모두 7개의 clones이 약 1.4kb 크기의 insert를 갖고 있었다. 그래서 이들 7 clones를 각각 #Endo-12, Endo-21, Endo-28로 명명하였다.

다. DNA sequencing of endoglucanase C4-endo (EG II)

#Endo-12, 21, 28 clones을 Sequenase version 2.0 sequencing kit(USB)를 이용한 dideoxy nucleotide termination 방법으로 sequencing하였다. 부분적으로 sequencing을 했는데, 7 clones이 모두 같은 clone으로 확인되었다. 그래서, # Endo-12 clone를 선택하여 유전자의 염기배열을 분석하였다. 결정된 endoglucanase 유전자의 염기 서열은 Fig. 4-1과 같다.

라. *Trichoderma* sp. C4 균주에서 새로운 endoglucanase (EG1) 유전자 clone 선별

다른 균주의 경우 일반적으로 endoglucanase 유전자가 하나만 존재하지 않으며 이들에 의하여 만들어진 cellulase들이 서로 상승작용을 하며 cellulase 분해에 작용하리라는 가능성이 높으므로 C4 균주에서 다른 endo-glucanase 유전자를 찾아내기 위하여 *T. reesei*에서 발견된 EG1 유전자의 염기 배열을 근거로 PCR primer를 제작하였다 (EG1-U1과 EG1-D1). C4 균주로부터 genomic DNA를 추출하고 이를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 agarose gel electrophoresis로 분석하였다(Fig. 4-2). 예상되는 PCR product를 gel에서 추출하여 이를 pGEM-Tease vector에 cloning하였다. Cloning된 유전자 부분을 염기 분석을 한 결과 EG1과 유사한 유전자의 일부임을 증명하였다(Fig. 4-3).

마. Endoglucanase (EG 1) 유전자 염기서열 분석

Screening으로 얻어진 endoglucanase 유전자를 양방향으로 전체 염기서열을 분석하였다. (Fig. 4-4). 분석된 염기로 추정된 아미노산 서열을 *T. reesei*와 비교하였다 (Fig. 4-5).

바. endoglucanase promoter의 클로닝 (inverse PCR)

당초 본 연구계획에는 없었으나, 향후 *Trichoderma*용 고효율 벡터 개발을 위하여 promoter 개발이 필요하므로, 본 연구를 수행하면서 확보된 endoglucanase 유전자를 이용하여 promoter cloning에 관한 기초 연구를 다음과 같이 수행 중에 있다.

1) Southern blot

PCR을 이용한 flanking region 클로닝을 위해서는 적당한 절편을 만드는 제한효소를 찾아야 하므로 먼저 C4 genomic DNA를 가지고 Southern blot을 수행하였다 (Fig. 4-6).

2) Promoter 부위를 포함하는 DNA 절편을 genomic DNA로부터 size에 의해 분리 C4 genomic DNA를 제한효소 PvuII로 절단하고 0.8%의 agarose gel에서 전기영동하여 2-3kb 정도의 DNA 절편을 gel로부터 분리하였다. 분리된 DNA 분자를 self-ligation 하였다.

3) PCR

이미 분석된 C4EGII의 내부 염기서열에 따라 두 개의 synthetic primer를 제작하였다 : EGII PCR-1U와 EGII PCR-1D. 이미 self-ligation 된 genomic DNA 절편을 주형으로 하여 PCR을 수행하였다 (Fig4-7).

4) PCR 산물의 클로닝

위에서 얻어진 PCR 산물을 gel에서 isolation 하여 pGEM-Teasy vector에 클로닝 하였고 얻어진 클론을 분석 중이다.

M N K P M S S L L L A A T L L A G G S I

C4ENDO	ATGAATAAGCCTATGAGTTCATTGCTGCTTGCAGCTACTTTACTGGCTGGCGGCTCTATT	60
EGII	ATGAACAAGTCCGTGGCTCCATTGCTGCTTGCAGCGTCCATACTATATGGCGGCCCGTC	60
	A Q Q T V W G Q C G G Q G W S G P T S C	
C4ENDO	GCCCAGCAAAGTGTGGGGGCAATGCGGAGGTCAAGGATGGAGCGGCCCGACTAGTTGC	120
EGII	GCACAGCAGACTGTCTGGGGCCAGTGTGGAGGTATTGGTTGGAGCGGACCTACGAATTGT	120
	V A G S A C S T L N P Y Y A Q C I P G A	
C4ENDO	GTTGCTGGATCTGCTTGTCTACTCTCAACCCCTACTACGCTCAATGCATTCCCTGGAGCC	180
EGII	GCTCCTGGCTCAGCTTGTTCGACCCTCAATCCTTATTATGCGCAATGTATTCCGGGAGCC	180
	T T M S T T T K P T S V S A S T T R A S	
C4ENDO	ACTACCATGTCTACCACAACCAAGCCGACCTCCGTTTCAGCATCAACGACCAGGGCGAGT	240
EGII	ACTACTATCACCCTTCGACCCGGCCACCATCCGGTCCAACCACCACCAGGGCTACC	240
	A T S S P A T S S G L T R F A G V N	
C4ENDO	GCAACA-----TCGTCACCCGCCACTAGCTCTGGCCTCACCAGATTGCTGGAGTTAAT	294
EGII	TCAACAAGCTCATCAACTCCACCCACGAGCTCTGG--GGTCC-GATTGCCGGCGTTAAC	297
	I A G F D F G C G T D G T C V T S K V Y	
C4ENDO	ATTGCCGGATTTCGATTTTGGCTGTGGGACTGATGGAACCTGCGTCACCTCGAAGGTATAC	354
EGII	ATCGCGGTTTTGACTTTGGCTGTACCACAGATGGCACTTTCGTTACCTCGAAGGTTTAT	357
	P P L K N Y A G T N N Y P D G V G Q M Q	
C4ENDO	CCGCCGCTGAAGAAGTATGCTGGCACCAACAACCTACCCTGATGGCGTTGGTCAAATGCAG	414
EGII	CCTCCGTTGAAGAAGTTCACCGGCTCAAACAACCTACCCCGATGGCATCGGCGAGATGCAG	417
	H F V N D D K L T I F R L P V G W Q Y L	
C4ENDO	CACTTTGTCAACGATGACAAATTAACCATTTTCCGCTCCCTGTGGGATGGCAGTACCTT	474
EGII	CACTTCGTCAACGAGGACGGGATGACTATTTTCCGCTTACCTGTCGGATGGCAGTACCTC	477
	V N N N L G G T L D S N N F G K Y D Q L	
C4ENDO	GTGAACAATAACTTGGGTGGAACCTCTGGATTCAAACAACCTTGGTAAATACGACCAGCTG	534
EGII	GTCAACAACAATTTGGGCGGCAATCTTGATTCCACGAGCATTTCGAAGTATGATCAGCTT	537
	V Q A C L S L G V Y C I V D I H N Y A R	
C4ENDO	G TTCAGGCTTG CCTCTCTCTGGGCGTATACTGCATTGTTGATATACAACTATGCACGC	594
EGII	G TTCAGGGGTGCCTGTCTCTCTGGGCGCATACTGCATCGTCGACATCCACAATTATGCTCGA	597

Figure 4-1. Compared nucleotide sequence of β -1,4-endoglucanase gene derived from *Trichoderma* sp. C4 (EG II)

(Figure 4-1. continued)

```
W N G G I I G Q G G P T N D Q F T S L W
C4ENDO TGG AATGGCGGGATTATTGGCCAAGGTGGGCCTACAAATGATCAGTTTACCAGTCTTTGG 654
EGII TGG AACGGTGGGATCATTGGTCAGGGCGGCCCTACTAATGCTCAATTCACGAGCCTTTGG 657
S Q L A S K Y A S Q S K V W F G I M N E
C4ENDO TCACAGTTGGCGGCAAAGTACGCTTCTCAGTCGAAGGTTTGGTTCGGAATCATGAACGAG 714
EGII TCGCAGTTGGCATCAAAGTACGCATCTCAGTCGAGGGTGTGGTTCGGCATCATGAATGAG 717
P H D V N I N T W A T T V Q A V V T A I
C4ENDO CCACATGATGTGAATATCAACACATGGGCTACTACTGTTCAAGCTGTTGTCACTGCTATC 774
EGII CCCCACGACGTGAACATCAACACCTGGGCTGCCACGGTCCAAGAGGTTGTAACCGCAATC 777
R N A G A T S Q F I S L P G N D W Q S A
C4ENDO CGTAATGCCGGCGCTACCTCACAGTTTATTTCTTGCAGGAAATGATTGGCAATCTGCT 834
EGII CGCAACGCTGGTGTACGTCGCAATTCATCTCTTTGCCTGGAAATGATTGGCAATCTGCT 837
G A F I S D G S A A A L S Q V K N P D G
C4ENDO GGAGCGTTTATTTCTGATGGTAGTGCAGCCGCTTATCTCAGGTTAAGAACCCGGATGGT 894
EGII GGGGCTTTTCATATCCGATGGCAGTGCAGCCGCCCTGTCTCAAGTCACGACCCCGGATGGG 897
S T T N L I F D L H K Y L D S D N S G T
C4ENDO TCTACAACCAATCTGATTTTTGATCTACATAAGTACCTGGATTCCGATAACTCTGGCACT 954
EGII TCAACAACGAATCTGATTTTTGACGTGCACAAATACTTGGACTCAGACAACCTCCGGTACT 957
H A D C V T N N V N D A F S P V A T W L
C4ENDO CACGCCGATTGTGTACAAACAACGTTAACGATGCCTTCTCACCTGTTGCCACTTGGCTC 1014
EGII CACGCCGAATGTACTACAAATAACATTGACGGCGCCTTTTCTCCGCTTGCCACTTGGCTC 1017
R Q N N R Q A I L T E N G G G N T Q S C
C4ENDO CGTCAAAACAACCGCCAGGCTATCCTGACTGAGAACGGCGGTGGTAACACTCAATCATGC 1074
EGII CGACAGAACAATCGCCAGGCTATCCTGACAGAAACCGGTGGTGGCAACGTTTCAGTCCTGC 1077
I Q Y L C Q Q F Q Y I N Q N S D V Y L G
C4ENDO ATTCAATATCTTTGCCAACAGTTCCAATACATAAAATCAAAACTCCGATGTCTACCTTGG 1134
EGII ATACAAGACATGTGCCAGCAAATCCAATATCTCAACCAGAACTCAGATGTCTATCTTGGC 1137
Y V G W G A G S F D S T Y I L T E T P T
C4ENDO TACGTGGGCTGGGGCGCAGGCTCATTTCGATAGCACTTATATCCTTACAGAGACCCCGACA 1194
EGII TATGTTGGTTGGGGTGCCGGATCATTGATAGCACGTATGTCCTGACGGAAACACCGACT 1197
G S G S S W T D T S L V S S C I S R K
C4ENDO GGTAGCGGAAGCTCCTGGACTGATACGTCTCTTGTAAAGCTCATGCATTTCCAGGAAA 1254
EGII AGCAGTGGTAACTCATGGACGGACACATCCTTGGTCAGCTCGTGTCTCGCAAGAAA 1257
```

1 2

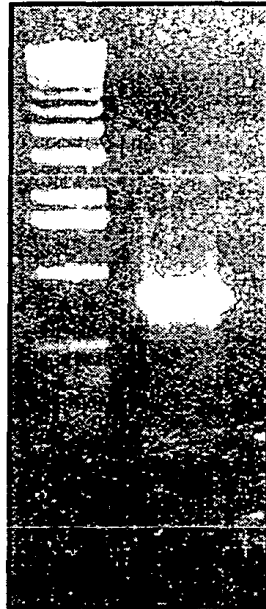


Figure 4-2. Agarose gel electrophoresis of PCR-cloned β -1,4-endoglucanase gene I from *Trichoderma* sp. C4

1 lane : Size maker ; 2 lane : PCR product (800bp)

T. reesei: 11 TACTTGC GTGTAATGCTCACAAGGTTACCGGAAGGCAAACCATTGTCTGTGTTGAATTGT 70
EG I : 964 TACTTGC GGGTGATGCTCACAAGGTTGCCCGAGGGCGAGCCGTTGTCCGTGTTGAACTGG 905

T. reesei: 71 GTAATGATGGTGAAGACCTTGGAGGTATCAA 101
EG I : 904 GTGATGATGGTGAAGGTCTTGGAGGTGTCAA 874

T. reesei: 143 TAGGGGTTGAAGCCGCAACCGCTAGCATCGCAAGCAGTGGCCGTGCAGGAGTGAGG 198
EG I : 762 TAGGGGTTGAAGCCGCAACCGGCAGAGTCGCAGGCCGTGGCCGTGCAAGAGTGAGG 707

Figure 4-3. Compared nucleotide sequence of patial clone of EGI gene

AAATCTCTTCTTGGCCCATAGTTCCAAAA 30

M A L S G P F P L A T A A L V A F I A Q
ATGGCTCTCTCTGGTCCCTTCCCGCTAGCTACGGCTGCCCTTGTTCATTATTGCCCAA 90

I V A G Q Q P G T S T P E V H P K L T T
ATTGTTGCCGGTCAGCAACCTGGAACCAGCACTCCCGAGGTCCATCCCAAGTTAACGACC 150

Y K C T K S G G C V A Q D T S V V L D W
TACAAGTGCACAAAGTCTGGAGGATGTGTGGCTCAGGACACCTCTGTCTCCTTGACTGG 210

N Y R W M H D K N F N S C T V N G G V N
AACTACCGCTGGATGCACGACAAGAACTTCAACTCGTGCCTGTCAATGGCGGAGTAAAC 270

S T L C P D E A T C G A N C I E G V D Y
AGCACTCTTTGCCCTGATGAAGCAACTTGTGGTGCCAACCTGCATCGAGGGCGTCGACTAC 330

A A S G V T V S G S S L T M N Q Y M P S
GCTGCCTCTGGTGTACGGTCTCTGGTAGCTCTCTCACCATGAACCAGTACATGCCCAGC 390

S S G G Y S S V S P R L Y L L G S D G D
AGTTCTGGCGGATATAGCAGCGTATCTCCACGACTCTATCTTTTGGGATCTGATGGAGAC 450

Y E L L Q L N G Q E L S F D V D L S T L
TATGAGCTGCTTCAGTTGAACGGCCAAGAGTTGAGCTTCGATGTGACCTCTCAACTCTG 510

P C G E N G A L T L S E M A A N G G A N
CCCTGTGGAGAGAACGGCGCCCTTTACCTCTCCGAAATGGCCGCAAATGGTGGTGCCAAC 570

Q Y N T A G A N Y G S G Y C D A Q C P V
CAGTACAACACAGCTGGCGCCAACCTATGGAAGCGGTTATTGCGATGCCCAGTGCCCCGTC 630

Q T W K N G T L N T N H S G Y C C N E M
CAGACCTGGAAGAATGGTACCCTCAACTAACCATTTCAGGCTACTGCTGCAACGAGATG 690

D I L E A N S R A N A F T P H S C T A T
GATATCCTTGAAGCCAACTCGAGAGCCAATGCATTCACTCCTCACTCCTGCACGGCCACT 750

A C D A S G C G F N P Y A N G F Q R Y W
GCTTGGATGCTAGCGGTTGCGGCTTCAACCCCTACGCAAACGGATTCCAACGCTACTGG 810

Fig4-4. Nucleotide sequence of Endoglucanase I gene derived from *Trichoderma sp. C-4*. Putative signal and propeptide cleavage sites are indicated by underlying residues.

(Figure 4-4. continued)

G P G F T L D T S K V F T I I T Q F N T
GGTCCC GGTT CACTTG ATACCTCCAAGGTCTT CACCATCATTACACAATTCAACACA 870

D N G L T S G N L V S I T R K Y R Q N G
GACAATGGTTTGCCTCCGGTAACCTTGTGAGCATTACACGCAAGTATAGACAGAATGGC 930

V D V P S A Q S G G D T I S S C S S A S
GTTGACGTCCCGAGTGCTCAATCTGGCGGTGACACTATTCATCTTGTTCGTCTGCTTCA 990

A Y G G L T T M G K A L A N G M V L V F
GCCTACGGTGGTCTCACAACCATGGGCAAGGCTCTGGCGAACGGCATGGTATTGGTATTC 1050

S I W N D N G G N M N W L D S G N A G P
AGCATCTGGAACGATAACGGCGGAAACATGAACTGGCTGGATAGCGGCAATGCCGGCCCC 1110

C S S T E G N P S N I V A N N P G T H V
TGCAGCAGCACGGAGGGTAACCCGTCCAACATTGTTGCCAACAACCCGGGCACTCATGTC 1170

I F S N I R W G D I G S T T G S T G G N
ATCTTCTCCAACATCCGATGGGGCGACATTGGTTCGACTACTGGCTCAACCGGGCGTAAC 1230

P P P S T S R T S T T P P P S T T L R T
CCTCCTCCCAGCACATCTAGAACCCTCCACCACGCCTCCTCCCAGCACGACCCTGAGAACT 1290

S T S S R T T T S T A A G C T Q T H W G
TCCACTTCAAGCAGGACGACTACCTCGACTGCTGCAGGCTGCACTCAGACCCATTGGGGC 1350

Q C G G N G Y T G C K I C T A G T T C Q
CAGTGTGGAGGTAACGGATATACCGGCTGCAAGATTGACACAGCAGGCACAACCTGCCAG 1410

Y S N D Y Y S Q C L STOP
TATAGCAACGATTACTACTCGCAATGCCTATAGACTCGACTTGGTCGTATAGAAGGCCGC 1470

CTTCAGTCGCCAGTGTACGCTCCGATGCAGTGAGCCTGTGCTAGCATAGTTATGTAAATA 1530

ATTTTGAGAGAATCTTTTCTCGAACATAAAATTAGACACTTGAATGACAAATAACAAAAG 1590

ACTTTGAACTACCTACAAG 1650

T. reesei 1 MAPSVTLPLTTAILA--IARLVAAQQPGTSTPEVHPKLT TYKCTKSGGCVAQDTSVVL DW
 T. sp. C-4 1 MALSGPFPLATAALVAFIAQIVAGQQPGTSTPEVHPKLT TYKCTKSGGCVAQDTSVVL DW

 T. reesei 60 NYRWMHDANYNSCTVNGGVNTTLCPEATCGKNCFIEGVDYAASGVTTSGSSLTMNQYMP
 T. sp. C-4 61 NYRWMHDKNFNSCTVNGGVNSTLCPDEATCGANC-IEGVDYAASGVTVSGSSLTMNQYMP

 T. reesei 117 SSSGGYSSVSPRLYLLDSDGEYVMLKLNQELSFVDVLSALPCGENGLYLSQMDENGGA
 T. sp. C-4 121 SSSGGYSSVSPRLYLLDSDGEYVMLKLNQELSFVDVLSALPCGENGLYLSQMDENGGA

 T. reesei 177 NQYNTAGANYGSGYCAQCPVQWRNGTLN TSHQGFCCNEMDILEGNSRANALTPHSCTA
 T. sp. C-4 181 NQYNTAGANYGSGYCAQCPVQWKNGTLN TNHSGYCCNEMDILEANSRANAFTPHSCTA

 T. reesei 237 TACDSAGCGFNPYGSGYKSYYPGDTVDTSKFTTIIITQFNTDNGSPSGNLVSITRKYQQN
 T. sp. C-4 241 TACDASGCGFNPYANGFQRWGPFTLDTSKVFTIITQFNTDNGLPSGNLVSITRKYRQN

 T. reesei 296 GVDIPSAQPGGDTISSCPSADAYGGLATMGKALSSGMVLVFSIWNDNSQYMNWLD SGNAG
 T. sp. C-4 301 GVDVPSAQSGGDTISSCSSADAYGGLTTMGKALANGMVLVFSIWNDNGGNMNWLD SGNAG

 T. reesei 356 PCSSTEGNPSNILANNPNT HVVFSNIRWGDIGSTTNSTAPPPPPASSTTF-----STTRR
 T. sp. C-4 361 PCSSTEGNPSNIVANNPGTHVIFSNIRWGDIGSTTGSTGGNPPPSTSRSTSTTPPPSTTLR

 T. reesei 414 SST-----TSSSPSCTQTHWGQCGGIGYSGCKTCTSGTTCQYSNDTTRNAFRALT
 T. sp. C-4 420 TSTSSRTTTTSTAAGCTQTHWGQCGNGYTG GKICTAGTTCQYSNDYYSQCLT

Figure 4-5. Compared amino acid sequences of endoglucanase I derived from *Trichoderma sp. C4* with *Trichoderma. reesei*

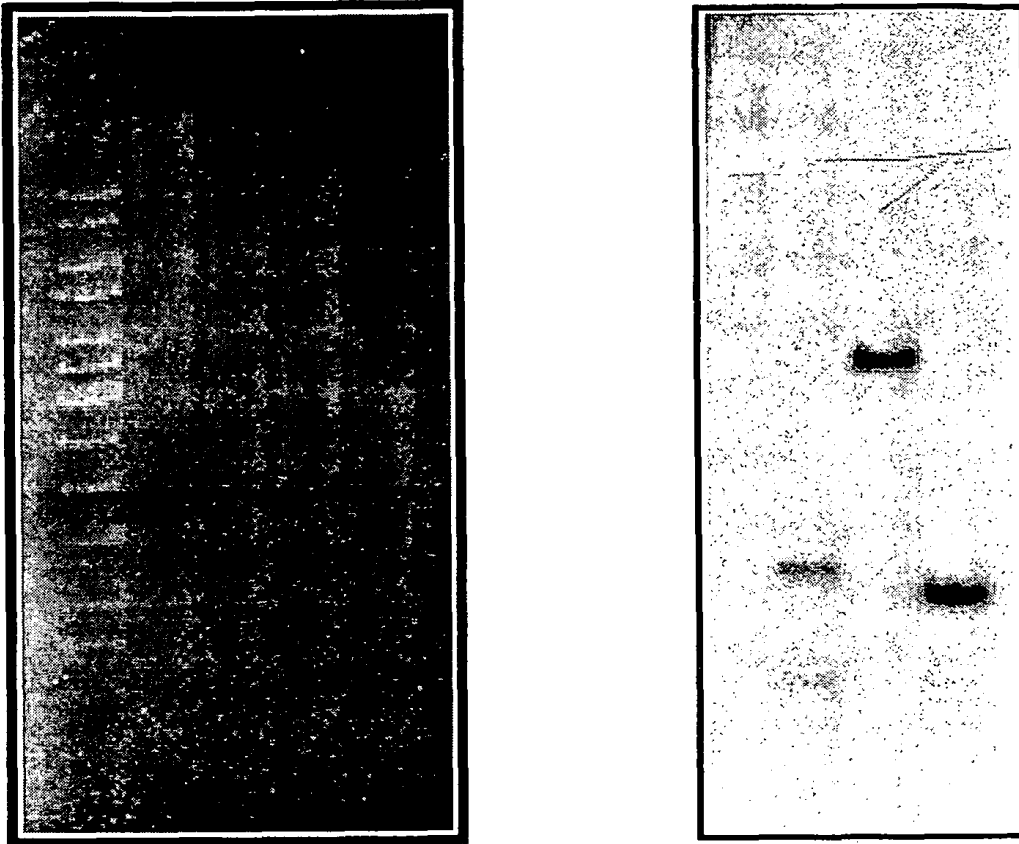


Figure 4-6. Southern Analysis of C4 genomic DNA Hybridized with endoglucanase II

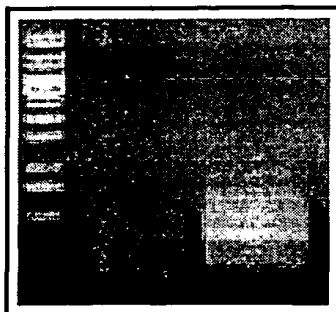


Figure 4-7. Gel Electrophoresis of Inverse PCR to clone promoter region of *Trichoderma sp.* C4 endoglucanase II

2. *Trichoderma sp.* C4의 β -glucosidase 유전자의 확보

가. *Trichoderma sp.* C4의 β -glucosidase 유전자 clone 탐색과 유전자 크기 확인
증폭된 *Trichoderma sp.* C4 균주의 cDNA library 5×10^5 pfu를 가지고 탐색을 시작하여 3차 탐색까지 수행된 결과 총 6 개의 클론이 얻어졌다. Helper phage를 이용한 in vivo excision을 수행하여 plasmid clone으로 전환한 후 각 클론으로부터 plasmid DNA를 추출하였다. EcoRI/XhoI, PvuII, HaeIII 등으로 제한효소 mapping을 수행한 결과 모두 같은 클론으로 밝혀졌다(Fig. 4-8).

나. β -glucosidase 유전자 염기서열 분석

위에서 얻어진 6 개의 클론 모두를 5' 방향으로부터 염기를 분석한 결과 모두 같은 유전자에서 만들어진 클론임을 알았지만 클로닝 과정중 full size cDNA 합성이 이루어지지 않아 각각 다르게 5'쪽이 소실된 클론들이 밝혀졌다. 이 β -glucosidase 유전자의 염기서열 분석과 *T. reesei*의 것과의 비교 data 는 Fig 4-9 와 같으며 약 80.5% 정도의 아미노산 상동성을 갖고 있다.

따라서 β -glucosidase의 전체염기서열을 찾아내기 위하여 확보된 6개의 clone중 가장 5'쪽의 소실이 적은 clone을 선정하여 양방향으로 전체 염기 분석을 마쳤다(Fig. 4-10).

β -glucosidase 유전자 5'쪽의 개시코돈 부위 복구에 의한 전체염기서열 분석 완성을 위하여 β -glucosidase 유전자 5'쪽의 개시코돈 부위 primer 제작하여 PCR product 가 얻어졌다.(그림 4-11)

β GLUC-ATG3 primer

5'- TCTAG ATG CTC GTG CCG CGG CAC GAG GCA-3'

M L V P R H E

다. 완전한 β -glucosidase 유전자 cloning/ 염기서열 재확인

1) PCR cloning vector(pGEM-Teasy, Promega)에 클로닝

세 번째 제작된 primer β GLUC-ATG3 primer에 의해서 얻어진 PCR product를 agarose gel electroporesis를 수행한 후 gel에서 isolation하여 pGEM-Teasy vector에 클로닝을 하였다. 클로닝을 확인하기 위하여 행하여진 restriction enzyme digestion에서 positive clone를 얻을 수 있었다.

2) 클로닝한 β -glucosidase 유전자의 염기분석을 통한 완전한 유전자임을 확인

새로 합성하여 부착한 개시코돈 부위의 정확성을 확인하게 위하여 염기 분석을 실시하여 본 결과 ATG를 포함하여 계획한 것과 일치하는 clone이 만들어 졌음을 확인할 수 있었다. 또한 PCR작용으로 인한 다른 부위의 돌연변이가 나타났을 가능성을 배제하기 위하여 전체 유전자 부위의 염기를 분석한 결과 다른 변이는 발견되지 않았다.

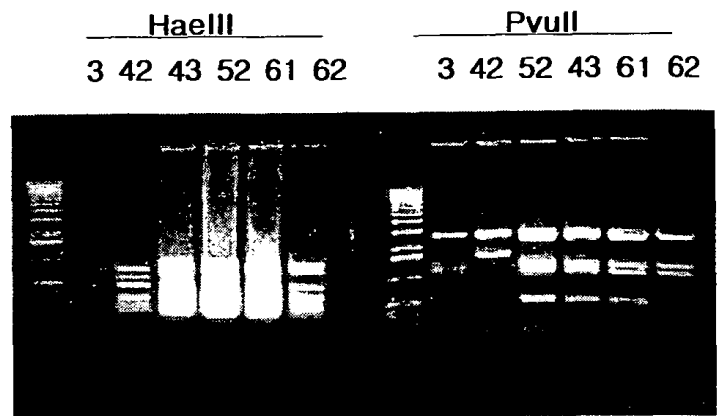


Figure 4-8. Restriction enzyme digestion of *Trichoderma* sp. C-4 β -glucosidase clone

T.sp.C-4	1	LVPRHEAALAIAAAPFVRADSK-----VPPAGTPWGVAYGKAQAPLAKLTLQDKV
T.reesei	1	MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVPPAGTPWGTAYDKAKAALAKLNLQDKV
T.sp.C-4	52	GIVSGVGWNQGPCVGNTSPVSKIGYPSLCLQDGPLCVRFSSGSTAFTPGVQAASTWDLNL
T.reesei	61	GIVSGVGWNGGPCVGNTSPASKISYPSLCLQDGPLGVRYSTGSTAFTPGVQAASTWDVNL
T.sp.C-4	112	IRERGGQFIGQEVDRDTGIHVTLGPVAGPLGKTPQGGRNWQGFSDPYLTGLAMAQTINGIQ
T.reesei	121	IRERGGQFIGEEVKASGIHVILGPVAGPLGKTPQGGRNWEGFGVDPYLTGIAMGQTINGIQ
T.sp.C-4	172	SVGQATAKHYLNEQERNRETMSNADDRTLHELYAWPFADAVQANVASVMCSYNKINT
T.reesei	181	SVGQATAKHYLNEQELNRETISSNPDDRTLHELYTWPFAVAVQANVASVMCSYNKVNT

Figure 4-9. Compared amino acid sequences of β -glucosidase from *Trichoderma* sp. C4 with *Trichoderma reesei*

L V P R H E A A L A I A A A P F V R A D
CTCGTGCCCGCGGCACGAGGCAGCGTTGGCCATTGCCGCTGCGCCCTTTGTGAGGGCAGAC 60

S K V V P P A G T P W G V A Y G K A Q A
AGCAAAGTCGTACCCCTGCAGGTACTCCTTGGGGCGTCGCATACGGCAAGGCACAGGCA 120

P L A K L T L Q D K V G I V S G V G W N
 CCACTGGCAAAACTCACTCTCCAAGACAAGGTCGGCATCGTGTCTGGAGTTGGCTGGAAC 180

Q G P C V G N T S P V S K I G Y P S L C
 CAGGGGCCCTGCGTTGGAAACACGTCTCCAGTCTCAAAGATTGGCTATCCTTCGTTATGT 240

L Q D G P L C V R F S S G S T A F T P G
 CTTCAAGATGGACCTCTCTGTGTTGCTTCTCATCTGGCAGCACGGCCTTTACACCAGGC 300

V Q A A S T W D L N L I R E R G Q F I G
 GTTCAGGCCGCTTCAACTTGGGATCTGAACCTAATCCGCGAACGTGGACAATTCATCGGA 360

Q E V R D T G I H V T L G P V A G P L G
 CAAGAAGTTAGAGATACGGGAATTCACGTCACTCTCGGTCCCGTAGCTGGACCTCTGGGA 420

K T P Q G G R N W Q G F S V D P Y L T G
 AAGACGCTCAGGGAGGTCGCAACTGGCAAGGCTTCAGTGTGATCCGTACCTCACGGGA 480

L A M A Q T I N G I Q S V G V Q A T A K
 TTAGCTATGGCTCAGACAATTAACGGCATTCACTGTGTTGGGAGTGCAAGCTACAGCCAAG 540

H Y I L N E Q E R N R E T M S S N A D D
 CACTACATTCTTAATGAACAAGAACGCAACCGAGAGACAATGTCGAGCAATGCCGATGAT 600

R T L H E L Y A W P F A D A V Q A N V A
 CGAACTCTTCACGAGCTTTATGCTTGGCCCTTTGCCGACGCTGTACAGGCAAATGTCGCC 660

Figure 4-10. Nucleotide sequence of β -glucosidase gene derived from *Trichoderma sp. C4*

(Figure 4-10. continued)

S V M C S Y N K I N T T W A C E D K N T
TCTGTCATGTGCTCTTACAACAAGATCAACACAACCTTGGGCGTGTGAAGATAAGAACACG 720

L Q T L L K D Q L G F P G Y V M T D W N
CTACAAACTCTGCTCAAAGATCAGCTGGGATTCCCGGGATATGTCATGACAGACTGGAAC 780

A Q H S T V Q A A T A G L D M S M P G T
GCTCAACACTCGACGGTGCAGGCCGCGACTGCTGGGCTCGACATGTCAATGCCCGGCACT 840

D F N G N N R L W G P A L T N A V N S N
GACTTTAACGGCAACAACAGGCTATGGGGCCAGCTCTCACTAACGCAGTCAACAGCAAC 900
Q V P S S R V D D M V T R I L A A W Y L
CAGGTGCCCTCGAGCAGAGTTGATGATATGGTGACGCGAATCTTAGCTGCATGGTATCTA 960

T G Q D A A G Y P S L S L S R N V Q G T
ACAGGCCAAGATGCGGCAGGCTATCCGTCGTTGAGCCTCAGCAGGAATGTTCAAGGAACT 1020

H K T N V R S I A R D G I V L L K N D G
CACAAAACCAACGTGAGATCAATTGCCAGAGACGGCATTGTTCTCCTCAAGAACGACGGC 1080

N I L P L K K P A S I A V I G S A A I I
AACATCCTGCCGCTGAAGAAGCCCAGCATTGCTGTCATCGGGTCTGCCGCTATCATT 1140

G A H A S N S G S C G D K G C D N G A L
GGTGCTCACGCCAGCAACTCAGGTTTCATGCGGTGATAAGGGGTGTGACAATGGCGCCTTG 1200

G M G W G S G A V N Y P Y F V A P Y D A
GGCATGGGCTGGGGATCCGGCGCCGTCAACTACCCATACTTTGTAGCACCCCTATGATGCC 1260

I N T R A T S Q G T R V T L S N T D N T
ATCAATACCAGAGCCACCTCGCAAGGCACCAGAGTTACCTTGAGTAACACGGACAACACT 1320

S S G A S A A S G K D V A I V F I T A D
TCTTCGGGTGCATCCGACGCAAGCGGAAAGGATGTCGCCATTGTCTTCATCACTGCCGAC 1380

(Figure 4-10. continued)

S G E G Y I T V E G N A G D R N D L N A
TCAGGAGAAGGGTACATCACCGTGGAGGGCAACGCTGGTGACCGCAACGACTTGAATGCC 1440

W H N G N A L V Q A V A G S N Q N V I V
TGGCACAACGGAAATGCTCTAGTTCAGGCAGTGGCAGGTTCCAACCAAATGTCATTGTT 1500
V V H S V G A I I L E Q I I A L P Q V K
GTCGTTCACTCCGTAGGCGCCATCATCCTCGAGCAAATCATTGCTTTGCCCCAGGTCAAG 1560

A I V W A G L P S Q E S G N A L V D V L
GCTATTGTCTGGGCAGGTCTCCCATCGCAGGAGAGTGGGAATGCTCTTGTGACGTGCTA 1620

Y G D V S P S G K L V Y T I A K S P N D
TATGGAGATGTCAGTCCCTCAGGCAAGCTCGTGATACCATTGCAAAGAGTCCAATGAC 1680

Y N T R I T S G D D N F S E G L F I D Y
TATAATACACGCATTACTTCCGGCGACGCAACTTCAGCGAGGGACTCTTTATCGACTAC 1740

K H F D D A G I T L R Z E F G F G L S Y
AAGCACTTTGACGACGCAGGCATTACGCTTCGTTAGGAGTTTGGCTTTGGACTGTCTTAC 1800

T K F N Y S R L S V L S T A K F G P A T
ACCAAGTTCAACTACTCCCGCCTCTCCGTCTTGTCCACTGCAAAGTTTGGTCCCAGACC 1860

G G R C P G A P R D L F Q N V A T V T V
GGGGCAGGTGTCCAGGAGCCCCAAGGACTTGTTCAGAATGTCGCAACCGTCACCGTG 1920

D I T N S G A V T G A E V A Q L Y L T Y
GATATCACAAATTCGGTGCTGTGACTGGAGCTGAGGTTGCTCAGCTGTATCTCACTTAC 1980

P F S A P R T P P K Q L R G F A K L S L
CCGTTTTAGCGCCCAAGAACCTCCTAAGCAGCTGCGTGGGTTTGCAAAGCTGAGCCTC 2040

T A G Q T S T A T F N I R R R D L S Y W
ACGGCAGGCCAGACGAGTACAGCGACGTTCAACATTGGAAGACGAGATCTGAGCTACTGG 2100

D T S S Q K W V V P S G S F G I S V G A
GATACGAGTTCGAGAAGTGGGTGGTGCCCTTCGGGATCGTTTGGTATCAGCGTGGGAGCA 2160

S R D I R L T G S L S V S **STOP**
AGCAGCAGGGATATCCGGCTGACGGGCAGTCTGTGCGTATCATGAGGGTAAAGATGGTCA 2220



Fig 4-11. Gel Electrophoresis of PCR products containing intact beta-glucosidase cDNA

3. *Trichoderma sp.* C4의 exoglucanase 유전자의 확보

가. *Trichoderma sp.* C4 균주에서 exoglucanase 유전자 clone 선별

PCR을 이용한 exo-glucanase 유전자 특이 probe를 만들어 염기를 확인한 후 이를 가지고 cDNA library를 screening하여 맞는 clone을 선별하였다. 1차 screening에서 2개의 clone을 찾아 2차, 3차 선별 작업을 통하여 exoglucanase 유전자 clone을 확보하였다.

나. Exo-glucanase 유전자 염기서열 분석

Screening으로 얻어진 exoglucanase 유전자를 양방향으로 전체 염기서열을 분석하였다. (Fig. 4-12). 분석된 염기로 추정된 아미노산 서열을 *T. reesei*와 비교한 결과 약 93%정도의 상동성을 보였다(Fig. 4-13).

GAGTCTTACACATCATCTTTGTGTACATCATCTCAAGCAACGAAAGGCTGAACACC 56
 M Y Q K L A A I T A F L A A A R A Q Q V
ATGTATCAGAAATTGGCCGCCATCACGGCCTTCTGGCTGCTGCTCGTGCTCAGCAGGTC 116
 C T Q Q A E T H P P L T W Q K C T A S G
 TGCACCCAACAGGCGGAGACTCACCCACCTCTGACATGGCAGAAATGCACAGCTTCCGGT 176
 C T A Q S G S V V L D A N W R W T H D T
 TGCACAGCTCAATCAGGTTCCGTGGTTCTTGATGCCAACTGGCGTTGGACTCACGATACC 236
 K S T T N C Y D G N T W S S T L C P D D
 AAGAGCACCACTGCTACGATGGCAACACCTGGAGCTCAACCTTGTGCCCCGACGAT 296
 A T C A K N C C L D G G N Y S G T Y G V
 GCGACTTGTGCCAAGAAGTGTGTTGGACGGAGGCAACTACTCGGGCACTTACGGAGTC 356
 T T S G D A L T I Q F V T Q S N V G A R
 ACCACCAGCGGCGACGCTCTCACCATTCAATTTGTTACTCAGTCGAATGTCGGCGCCCGT 416
 L Y L M A T D T T Y Q E F T L S G N E F
 CTTTACCTGATGGCAACTGATACCACTTACCAGGAGTTCACACTCTCTGGCAACGAGTTC 476
 S F D V D V S Q L P C G L N G A L Y F V
 TCCTTTGACGTTGATGTTTCCCAACTGCCTTGGCGTTTGAACGGAGCGCTGTACTTTGTT 536
 S M D A D G G Q S K Y P G N A A G A K Y
 TCCATGGATGCCGATGGTGGCCAGAGCAAGTACCCCGGCAATGCTGCCGGTGCCAAATAC 596
 G Q V T V T S Q C L R D L K L I N G Q A
 GGACAGGTTACTGTGACAAGCCAGTGCCTTCGTGACCTGAAGTTAATCAACGGTCAGGCC 656
 N V E G W E P S S N N A N T G V G G H G
 AACGTTGAGGGTTGGGAGCCTTCTTCCAACAACGCCAACACTGGTGTGGTGGCCACGGA 716
 S C C S E M D I W E A N S I S E A L T P
 AGCTGCTGCTCCGAGATGGATATCTGGGAGGCAAACCTCCATTTCTGAGGCTCTTACTCT 776
 H P C E T V G Q T M C D G D S C G G T Y
 CACCCTTGCGAGACTGTGCGCCAGACGATGTGCGACGGCGATTCTTGCGGTGGAACCTAC 836

Figure 4–12. Nucleotide sequence of Exoglucanase I gene derived from *Trichoderma sp. C4*

Putative signal and propeptide cleavage sites are indicated by underlying residues.

(Figure 4-12, continued)

S N R Y G G T C D P D G C D W N P Y R L
TCCAATCGATATGGCGAACCTGCGACCCTGATGGCTGCGACTGGAACCCATAACCGCCTG 896

G N T S F Y G P G S S F A L D T T K K L
GGCAACACCTCCTTCTACGGACCCGGTTCATCATTGCTCTTGACACCACCAAGAAGTTG 956

T V V T Q F A T D G S I S R Y Y V Q N G
ACCGTTGTGACCCAGTTCGCCACCGACGGTTCAATTAGCCGATACTATGTCCAGAATGGA 1016

V K F Q Q P S A T V G S Y T G N T I N T
GTCAAGTTCCAGCAGCCCAGCGCTACAGTCGGCAGCTACACTGGCAACACGATCAACACC 1076

A Y C A A E Q T A F G G T S F T D K G G
GCCTACTGTGCAGCTGAGCAGACAGCTTTTGGCGGCACCTCATTACAGACAAGGGCGGC 1136

L A Q I N K A F Q G G M V L V M S L W D
CTTGCCAGATCAACAAGGCATTCCAGGGCGGAATGGTCTTGGTCATGAGCTTGTGGGAT 1196

D Y A V N M L W L D S T Y P T N A T A S
GATTACGGGGTCAACATGCTTTGGTTGGATTCCACCTACCCAACAAACGCCACTGCTTCC 1256

T P G A K R G S C S T S S G V A A Q V E
ACCCCCGGCGCCAAGCGAGGAAGCTGCTCTACCAGCTCTGGTGTGCGGCCAAGTCGAA 1316

A Q S P N S K V I Y S N I R F G P I G S
GCTCAGTCTCCCAACTCCAAGGTTATCTACTCCAACATCCGCTTCGGACCCATTGGCAGC 1376

T G G N T G S N P P G T S T T R A P P S
ACTGGCGGCAACACTGGCAGCAACCCTCCCGGCACTTCGACCACTCGCGCGCCTCCGTCC 1436

S T G S S P T A T Q T H Y G Q C G G T G
AGCACTGGAAGCTCTCCACCGCCACCCAGACACACTACGCCAATGTGGTGGAACTGGC 1496

W T G P T R C A S G Y T C Q V L N P F Y
TGGACCGGACCTACCAGATGCGCTAGCGGCTACACTTGCCAGGTTCTGAACCCATTCTAC 1556

S Q C L Stop
TCACAGTGCCTGTAAGGTGCTTTGGTGGCGGCTTGAGATGTTAGGTTGTAGATGGATTGT 1616

T. reesei 1 MYQKLAATTAFLAAARAQQVCTQQAETHPPLTWQKCTASG-CTAQSGSVVLDANWRWTHD
 T. sp. C-4 1 MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSETHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSVVVIDANWRWTHA

T. reesei 59 TKSTTNCYDGNTWSSILCPDDATCAKNCCLDGGNYSPTYGVTTSGDALTIQFVTQS---N
 T. sp. C-4 61 TNSSTNCYDGNTWSSILCPDNETCAKNCCLDGAAYASTYGVTTSGNSLSIGFVTQSAQKN

T. reesei 119 VGARLYLMAITDTTYQEFTLSGNEFSFDVDVSQLPCGLNGALYFVSMADGGQSKYPGNAA
 T. sp. C-4 120 VGARLYLMAITDTTYQEFTLLGNEFSFDVDVSQLPCGLNGALYFVSMADGGVSKYPTNTA

T. reesei 179 GAKYGQVTVTSQCLRDCLKLINGQANVEGWEPSSNNANTGVGGHGSCCSEMDIWEANSISE
 T. sp. C-4 180 GAKYGTGYCDSQCPRDLKFLINGQANVEGWEPSSNNANTGIGGGHGSCCSEMDIWEANSISE

T. reesei 239 ALTPHPCETVGQTMCDGDCGGTYS-NRYGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSSFALD
 T. sp. C-4 240 ALTPHPCETVGQEIPEGDCGGTYSNRYGGTCDPDGCHWNPYRLGNTSFYGPSSSFALD

T. reesei 299 TTKKLTVVVTQFATDGSISRYYVQNGVKFQQPSATVGSYTGNTINTAYCAAEEQTAFFGGTSF
 T. sp. C-4 300 TTKKLTVVVTQFETSGAINRYVQNGVTFQQPNAELGSYSGNELNDDYCTAEEAEFGSSSF

T. reesei 359 TDKGGLAQINKAFQGGMVLVMSLWDDYAVNMLWLDSTYPTNATASTPGAKRGSCSTSSGV
 T. sp. C-4 360 YDKGGLTQFKKATSGGMVLVMSLWDDYANMLWLDSTYPTNETSSTPGAVRGSCSTSSGV

T. reesei 416 AAQVEAQSPNSKVIYSNIRFGPIGSTGGNTGSNPPG----TSTRAPPSSTGSSPTATQT
 T. sp. C-4 421 PAQVESQSPNAKVTFSNIKFGPIGSTGNPSGGNPPGGNRGTTTTTRTPATTTGSSPGPTQS

T. reesei 472 HYGQCGGTGWTGPTRCASGYTCQVLNPFYSQCLT
 T. sp. C-4 481 HYGQCGGIGWTGPTVCASGTTCQVLNPFYSQCLT

Fig 4-13. Compared amino acid sequences of exoglucanase I from *Trichoderma* sp. C4 with *Trichoderma reesei*

제 5 장 섬유소 분해 우수 효소의 분리, 정제 및 특성 규명

제1절 연구개발 방법

본 세부과제는 *Trichoderma sp.* C4에서 분리해낸 효소들의 정제를 통한 효소활성의 측정 및 상호 연관성 있는 작용 등을 탐색하여 최적의 미생물사료를 개발하는 것이다. 이를 위한 다음과 같은 실험을 추진하였다.

1. 섬유소 분해 우수 효소의 분리

Mandel 배지에 포자를 접종하고 28 °C에서 5일 동안 배양함. 배양액을 15 - 65 % 황산암모늄침전을 수행하였다. 50mM 초산완충용액 (pH 5.0)에 투석 후 Bio-Gel P-150 gelfiltration chromatography를 수행하였다.

섬유소 분해효소를 모아 ultrafiltration으로 농축하고 인산완충용액 (50 mM, pH 7.0)으로 교환한 후 DEAE-Sephrose ion exchange chromatography를 수행하였다. 현재 까지 이러한 과정을 행하여 4 종류의 섬유소 분해효소의 존재를 확인하였다. 이들 4 종류의 섬유소 분해효소를 각각 농축한 후 histidine 완충용액 (25 mM, pH 5.5)으로 교환한 하고, Mono-P colume (FPLC)에 걸어준 후 polybuffer 74 (1: 10 diluent, pH 4.0) 용액으로 용출하였다.

순수분리가 되지 않은 효소에 대해서는 Preparative electrophoresis (Bio-Rad, Model 491)를 행함. T = 6 %, C = 2.7 %인 gel에 시료를 걸어주고 12 W 의 일정전력으로 용출하였다. Flow rate는 1.0 ml/min으로 유지하여 fraction을 모아서, 분리된 효소의 순수도는 SDS PAGE 와 isoelectric focusing을 통하여 확인하였다.

2. 분리된 섬유소 분해 우수 효소의 특성 규명

분리된 효소에 대하여 아래의 항목에 대한 실험을 행하였다.

가. 반응최적온도: 30 °C에서 80 °C 사이의 각 온도에서 (pH 5.0 초산 완충용액) 효소용액을 CMC와 15분동안 반응시키고 환원당 양을 측정하여 활성을 측정하였다.

나. 열안정성: 30 °C에서 80 °C 사이의 각 온도에서 (pH 5.0 초산 완충용액) 효소용액을 방치하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 남아있는 활성을 측정하였다.

- 다. 최적 pH: pH 3.0에서 8.0까지의 완충용액에 효소용액을 섞고 활성을 측정하였다.
- 라. pH 안정성: pH 3.0에서 8.0까지 24 시간동안 방치한 후 (4 °C) 잔여 활성을 측정하였다.
- 마. 단백질 분해효소에 대한 저항성: 분리된 효소에 trypsin, pencreatin, elastase를 1 % (w/w)첨가하고 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 잔여활성을 측정하였다.
- 바. 중금속에 대한 저항성: Sc, Li, Mg, Co, Fe 등의 금속이온을 1 mM 처리하여 (50 mM 초산완충용액, pH 5.0, 24 시간) 잔여 활성을 측정하였다.
- 사. 내담즙성조사: 단위동물의 장내에서의 활동성을 조사하기위하여 oxgall 농도를 0.3-5.0 % 까지 방치하며 (37°C) 잔여 활성을 측정하였다
- 아. 소위액 내에서의 안정성: 소의 위액을 시료에 섞어 방치하며 (37 °C)일정 시간으로 시료를 채취하여 잔여 활성을 측정하였다.
- 자. 단위동물 위액에서의 안정성:단위 동물의 위액을 시료에 섞어 방치하며 (37 °C)일정 시간간격으로 시료를 채취하여 잔여 활성을 측정하였다.
- 차. 다른 효소와의 상승작용: 소 위액내의 cellulase와 높은 상승효과를 보은 효소를 찾을 필요가 있으므로 각각의 효소와 위액의 CMC에 대한 활성도를 측정하고 이들을 섞은 후의 활성도를 측정하여 상승효과를 분석하였다.
- 카. Km 및 Kcat 값: 분리된 각효소에 대하여 CMC, p-nitrophenyl-cellobioside(PNPC)를 기질로 사용하여 CMC의 경우 환원당 측정을 통하여 PNPC의 경우는 A420 을 측정하여 Km과 Kcat 값을 측정하였다.
- 타. specific acivity 검사: 순수분리된 효소의 단위 단백질양에 대한 효소활성도 (기질로 CMC 이용하고 환원당의 양 측정)를 측정하여 각 효소의 specific activity를 측정하였다.

3. 분리된 섬유소 분해 우수 효소의 synergism 측정

Trichoderma sp. C4 균주에서 발견된 4가지 종류의 endoglucanase를 각각 정제하여 다양한 조합에서 CMCase의 활성을 측정하였다. 그리고 *Trichoderma sp.* C4 균주에서 분리, 정제된 β -glucosidase, exoglucanase를 첨가시켜 CMCase의 활성을 측정하였다.

제2절 연구개발 결과 및 고찰

1. *Trichoderma sp.* C4의 Endoglucanase 의 분리, 정제 및 활성 측정

가. *Trichoderma sp.* C4의 Endoglucanase(F-1) 의 분리

1) Endoglucanase(F-1)의 분리

Mandels 배지에 *Trichoderma sp.* C4 포자를 접종하고 28 °C에서 6일 동안 배양하였다. 배양액을 15 - 70 % 황산암모늄 침전하였다. 80 mM 초산완충용액(pH 5.0) 으로 투석후 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography를 행하여, endoglucanase가 포함된 부위(F-I, F-II)를 얻었다 (Figure 5-1).

F-I 부위를 농축하고 인산완충용액(20 mM, pH 7.0)으로 교환한 후 DEAE-Sepharose ion exchange를 행하였다. 그 결과 3개 부위의 endoglucanase를 확인하여 각각 F-I-I, F-I-II, F-I-III라고 명명하였다.

F-I-I에는 exoglucanase 활성과 β -glucosidase 활성을 포함하였다. 이 부위를 먼저 Con A sepharose affinity chromatography (20 mM phosphate buffer, pH 7.0을 초기조건, 0.5 M methyl-mannoside를 용출조건)와 chromatofocusing을 통하여 분리하였으나, 이 방법은 회수율이 너무 낮은 문제점을 갖고 있었다. 따라서 이 부분의 분리방법을 수정하였다. 이 부위를 먼저, 10 mM 초산 완충용액으로 교환한 후 Tris-acetate (pH 8.4)를 초기완충용액, Polybuffer 96 (pH 7.0)을 용출완충용액으로 사용하는 Mono P (FPLC) chromatography를 행하여 분리하였다. (Figure 5-2).

여기에서 endoglucanase를 포함하는 부위를 F-I-I-II라 명명하였다. 여기에는 약간의 β -glucosidase 활성을 포함하였기 때문에 다시한번 Mono P 상에서 분리하였다. 분리된 효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 나타났다.

F-I-II부위는 Con A sepharose affinity chromatography (20 mM phosphate buffer, pH 7.0을 초기조건, 0.5 M methyl-mannoside를 용출조건)를 통하여 분리하였으나, 이 방법 역시 회수율이 너무 낮은 문제점을 갖고 있었다. 따라서 이 부분의 분리방법을 다음과 같이 수정하였다. 즉, Imidazole (pH 7.4)을 초기 완충용액, Polybuffer 74 (pH 5.0)를 용출완충용액으로 사용하는 Mono-P (FPLC) chromatography를 행하여 분리하였다 (Figure 5-3). 분리된 효소는 SDS-PAGE 상에서 단일 band로 나타났다(Figure 5-4).

2) Amino acid sequencing

F-I-III 를 분리하여 SDS-PAGE를 행하였다 (Fig. 5-5). 이를 PVDF-membrane에 transfer 하고, pyroglutamate aminopeptidase를 처리하여 deblocking한 후 amino acid sequencing을 행하였다. 아래와 같은 결과를 얻었다.

QPGTSTPEVHPKLTTYK

이는 *T.reesei* EGI과 100%의 homology를 보이는 결과였다.

또한 정제된 F-I-II(Fig. 5-6)를 ammonium bicarbonate 완충용액 (pH 8.0, 100 mM)으로 교환하고 endoproteinase Arg-C를 2%되도록 섞어 37℃, 8시간 반응시킨 후 SDS-PAGE(Fig. 5-7)를 행하였다. 이를 PVDF-membrane에 transfer하고 그림상에서 -- 표시된 band의 서열을 분석하였다. 결과는 아래와 같았다.

Phe-Ala-Gly-Ile-Asn-Ile-Ala-Gly-Phe-Asp-Phe

이는 *T. reesei*의 EGII와 90%의 homology를 보이는 결과였다.

또한 정제된 F-I-I을 pyroglutamate aminopeptidase로 deblocking하여 sequencing을 수행 하였다. 그 결과 QPGTSTPEVHPKLTTYK?TK?G의 sequence를 얻었다.

나. *Trichoderma sp.* C-4의 Endoglucanase(F-II)의 분리

1) F-II의 순수 분리

F-II는 Sephacryl S-200 gel filtration chromatography에 의하여 부분정제 되었고 (Fig.5-8), 이를 다시 Sephacryl S-100 gel filtration chromatography에 의하여 분리한 결과 (Fig.5-9), Fig. 5-10, 5-11에 제시한 바와 같이 SDS-PAGE와 isoelectric focusing 상에서 단일 band로 나타났다. 이 효소의 분자량은 26,000 Da, 등전점은 8.0으로 나타났다.

2) Amino acid composition

F-II에 처리할 적절한 proteinase를 선별하고 다른 균주의 저분자량 endoglucanase와 비교하기 위하여 amino acid 조성을 구하였다. (Table 5-1)

3) Amino acid sequencing

F-II는 trypsin (2% w/w)으로 처리하였을 때 2개의 band로 분해되었고 (Fig. 5-12), 이를 PVDF membrane으로 옮긴 후 각각 sequencing을 행하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

Ala-Asp-Val-Ala-Tyr-Asp-Leu-Phe-Thr-Thr-Ala-Asn-Asn-Asn
Ile-Val-Ser-Ala-Ile-Gly-Ser-Met-Asn-Thr-Thr-Ala

이 두 sequence는 모두 다른 단백질과 homology를 나타내지 않아 novel protein일 가능성이 높았다.

다. *Trichoderma* sp. C-4 endoglucanase F-I, F-II의 물리화학적 특성

1) F-I의 생화학적 특성

가) 열안정성

분리된 효소들은 모두 50°C에서는 12시간 동안 활성을 전혀 상실하지 않았다. 그러나 60°C에서 F-I-I-II의 반감기는 3분으로 나타났고, F-I-II는 15분, F-I-III는 60분으로 나타났다. F-I-I-II의 60°C에서의 반감기는 이 효소가 exoglucanase 및 β -glucosidase와 분리되기 전에 60분동안 30%의 활성만을 상실한 것에 비교하면 순수 분리된 후 훨씬 열안정이 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 F-I-III는 60°C에서 12시간 후에도 30%의 활성을 유지하였으며, 70°C에서도 60°C에서와 유사한 열안정성을 나타내었다. Figure 5-13에 F-I-III의 열안정성을 나타내었다.

나) 최적온도

Figure 5-14에 나타난 것처럼 F-I-I-II, F-I-III, F-II는 모두 50°C, F-I-II는 60°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

다) pH 안정성

모든 효소들은 pH 4.0-8.0까지의 범위에서 안정하였다.

라) 최적 pH

Figure 5-15에 제시한 바와 같이 pH 5.0에서 모두 가장 높은 활성을 보였다. pH 4.0에서는 대체로 높은 활성을 보였고, pH 6.0에서는 F-I-I-II, F-I-III는 60% 정도, F-I-II는 52%의 활성을 나타냈으며, F-II는 78%의 활성을 나타냈다. F-II는 pH 7.0과 8.0에서 각각 53.7 및 27.7%의 활성을 나타내어 가장 넓은 범위의 pH에서 활성을 나

타냈으며 F-I-III는 pH 7.0과 8.0에서 각각 47.1 및 24.0 %의 활성을 나타내었다.

마) 금속이온 및 환원제에 대한 안정성

Table 5-2에 제시한 바와 같이 F-I-I-II, F-I-II, F-I-III 세 효소 모두 안정하였다.

바) Ox-gall에 대한 안정성

Table 5-3에 제시한 바와 같이 Ox-gall에 대하여 F-I-I-II는 약 80 % 정도의 안정성을 나타내었고, F-II와 F-I-III는 90 % 정도의 안정성을 나타내었으며, F-I-II는 100 % 안정성을 나타내었다. 전반적으로 모든 효소가 Ox-gall에 대해서 안정한 것으로 나타났다.

사) Specific Activity

현재의 분리 상태에서 각 효소의 specific activity를 측정하였다. 그 결과 Table 5-4에 제시한 바와 같이 120-142.2U/mg으로 나타났는데(F-II는 순수도가 낮기 때문에 계산에서 제외하였음), 이는 조효소상태에서 28.1 U/mg 이었던 것에 비교하면 4.3-5.1배 증가한 것이었다.

아) 조효소에 의한 자연기질의 분해

균주를 CMC 및 Avicel을 탄소원으로 하는 Mandels 배지에서 6일 동안 배양한 후 배양액에 벚짳, 신문지, 배춧잎을 각각 1 %(w/v) 첨가하여 40 °C에서 24시간 흔들면서 반응시켰다. 그 결과 신문지와 배춧잎은 거의 원형을 알 수 없을 정도로 기질의 대부분이 분해됨을 확인할 수 있었고, 벚짳은 상당한 정도 분해됨을 확인하였다. 모든 경우에서 24시간 후 생성된 환원당의 양은 첨가한 기질중량의 30 % 정도였다.

2) F-II의 생화학적 특성

가) 열안정성

이 효소는 Fig. 5-16에서 제시한 바와 같이 40 - 50°C의 조건에서(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 80 %이상의 비교적 높은 활성을 나타내었다.

나) 최적온도

최적 온도는 50°C로 나타났다. 열안정성에 대한 실험에서 Fig. 5-17에 제시한 바와 같이 50°C까지는(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 12시간 동안 활성을 전혀 상실하지 않았다. 그러나 55°C, 60 °C 및 70 °C에서 1시간 후 각각 50, 60 %와 75 %의 활성을 상실하였다.

다) pH 안정성과 최적 pH

pH 변화에 따른 효소의 활성은 Fig. 5-18에서와 같이 pH 4 - 6에서 비교적 높은 활성을 나타내었고 최적 pH는 5.0으로 나타났다.

이 효소의 CMC에 대한 Km 값은 0.174 %로 나타났고 (Fig. 5-19), CMC에 대한 specific activity는 350 U/mg을 나타내었다. 이는 이 균주가 분비하는 다른 endoglucanase에 비하여 5배이상의 specific activity에 해당되었다.

또한, endoglucanase F-II의 단계별 비활성 (specific activity)을 측정하였다. 이를 위하여 균주를 배양하고 Endoglucanase 정제과정을 반복하였다. 단계별 비활성은 Table 5-5와 같다.

라) Endoglucanase F-II-II의 isoelectric focusing

endo-glucanase F-II-II의 isoelectric focusing결과 pI가 8로 밝혀졌다(Fig. 5-20).

마) Endoglucanase F-II-II의 활성에 관여하는 아미노산 잔기규명

효소를 50 mM Mes-Tris (pH 5.4)완충용액으로 교환하고 WRK(Woodward Reagent K, N-ethyl -5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate)를 동일한 완충용액에 녹여 변환시약을 만들었다. 효소용액에 WRK를 섞어 WRK 최종농도가 1-5 mM 되도록 하여 기질 (PNPG3; p-nitrophenylcellotriose)과 반응시킨 후, 유리된 PNP양을 HPLC로 측정하였다. HPLC column은 u-bondapak NH2를 사용하였으며 80 % acetonitile을 용매로 사용하였으며, 280 nm에서 검출하였다.

Fig. 5-21 에서 보는 바와 같이 F-II-II는 WRK에 의하여 불활성화 되어 활성부위에 carboxyl 잔기를 갖는 아미노산이 관여함을 알 수 있었다. 이는 다른 endoglucaanse와 같이 이 효소도 lysozyme과 유사한 작용기작을 갖음을 알 수 있게 하였다.

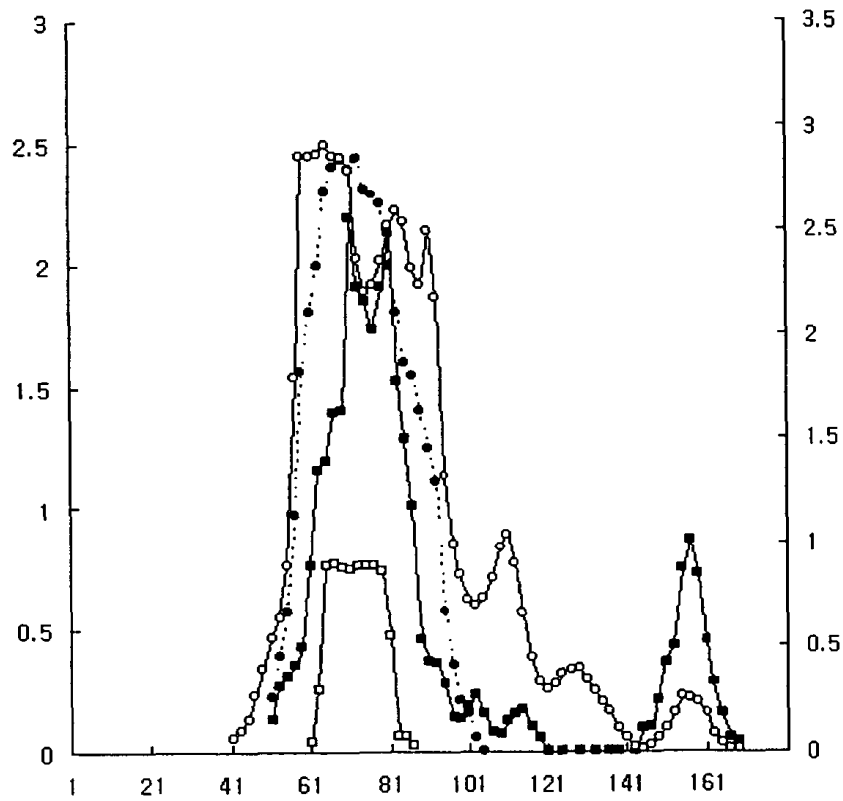


Figure 5-1. Gel filtration chromatography of crude enzyme from C-4 on Sephacryl S-200

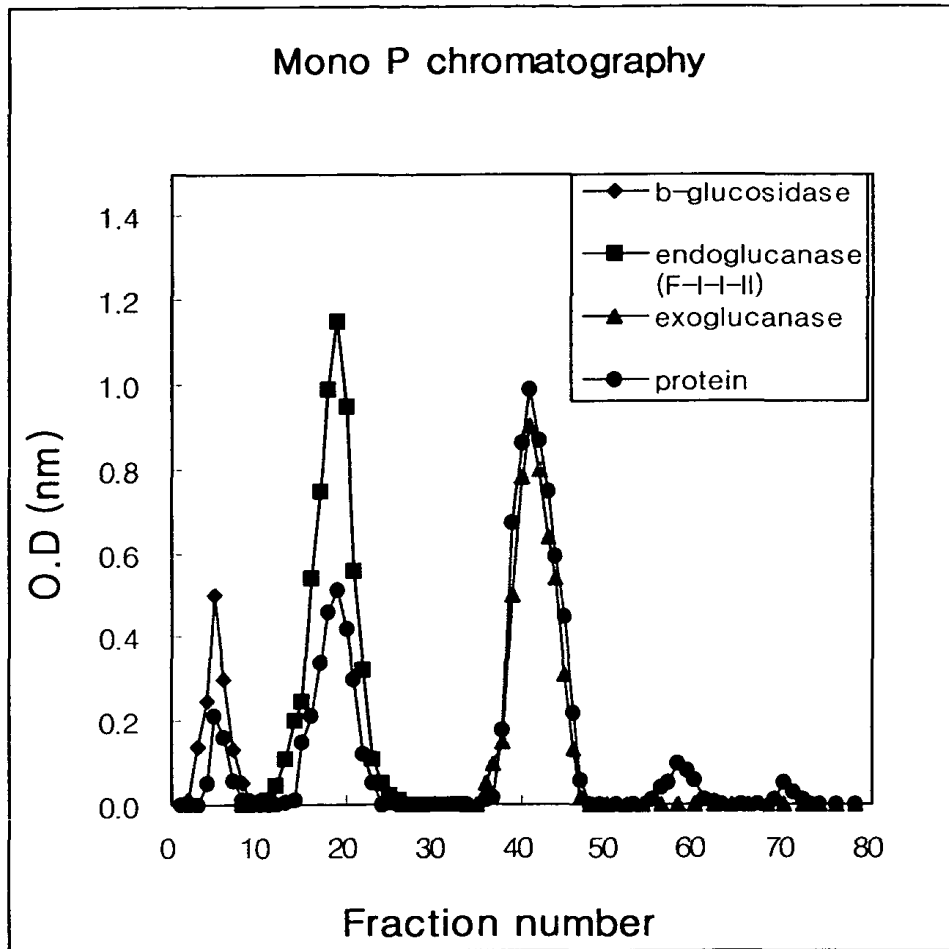


Figure 5-2. Chromatofocusing of F-I-I on Mono-P (FPLC) chromafocusing using PBE94 and polybuffer 96

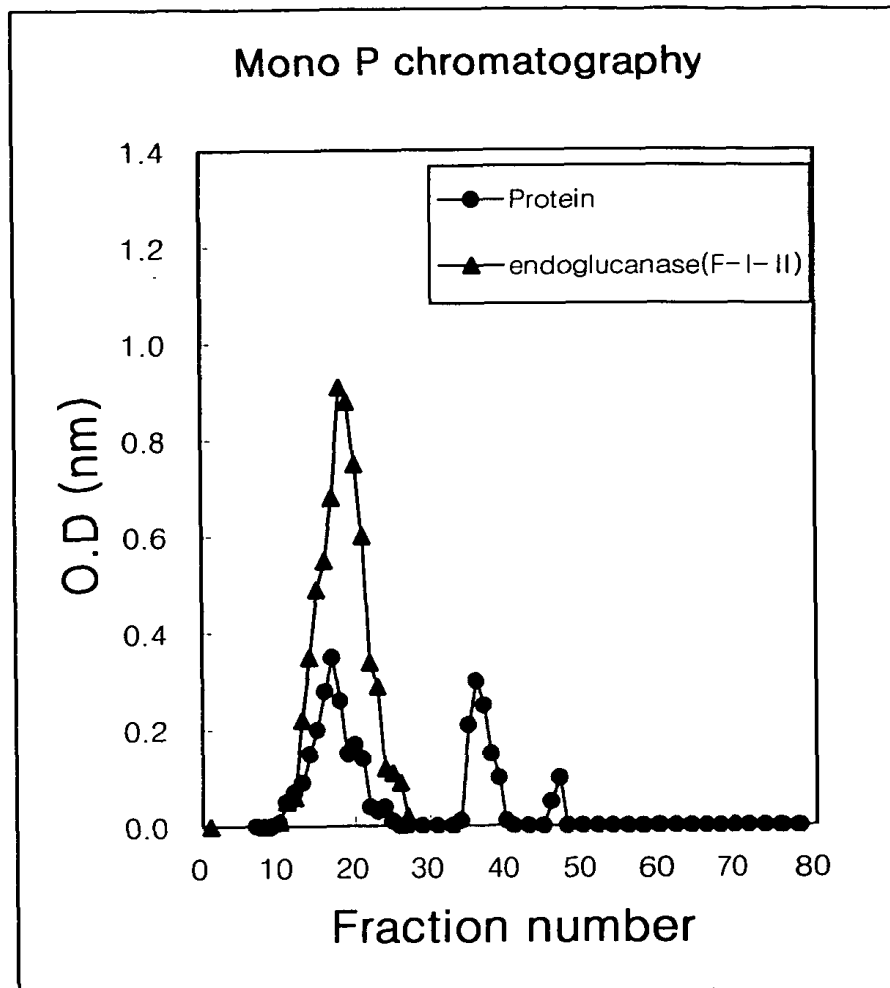


Figure 5-3. Chromatofocusing of F-I-II on Mono-P (FPLC) chromatofocusing using PBE94 and polybuffer 74

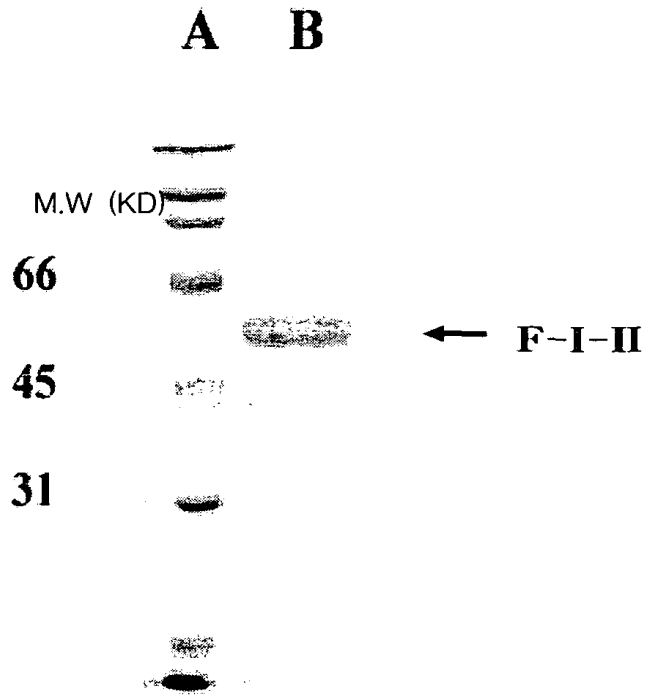


Figure 5-4. Photography for the electrophoretic analysis of purified F-I-II
: Coomassie staining of F-I-II after SDS-PAGE

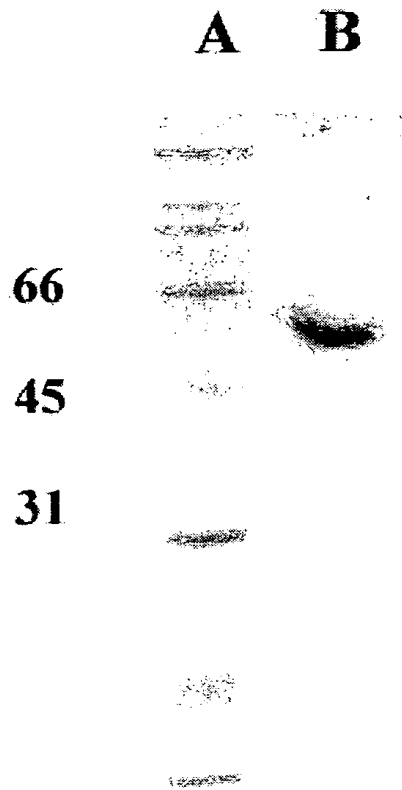


Figure 5-5. SDS-PAGE of F-I-III (T=10 %, C=2.7 %); lane A: Marker proteins
lane B: F-I-III

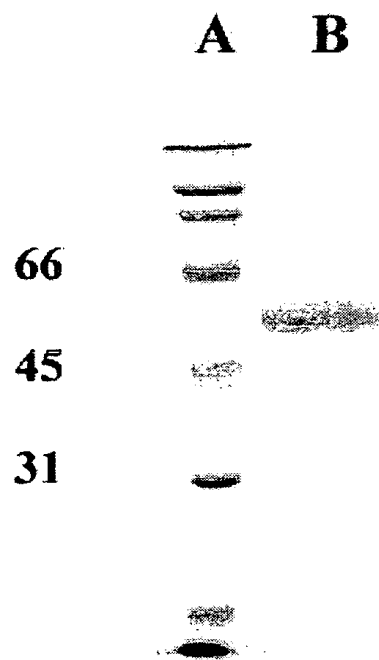


Figure 5-6. SDS-PAGE of F-I-II (T=10 %, C=2.7 %); lane A: Marker proteins
lane B: F-I-II

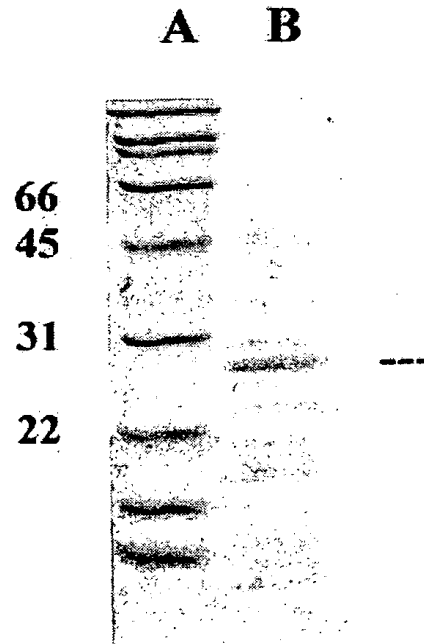


Figure 5-7. SDS-PAGE of F-I-II after reacted with 2 % (w/w) of endoprotease Arg-C for 8 hrs at 37 °C. (T=12.5 %, C=2.7 %);
lane A: Marker proteins, lane B: F-I-II fragments.

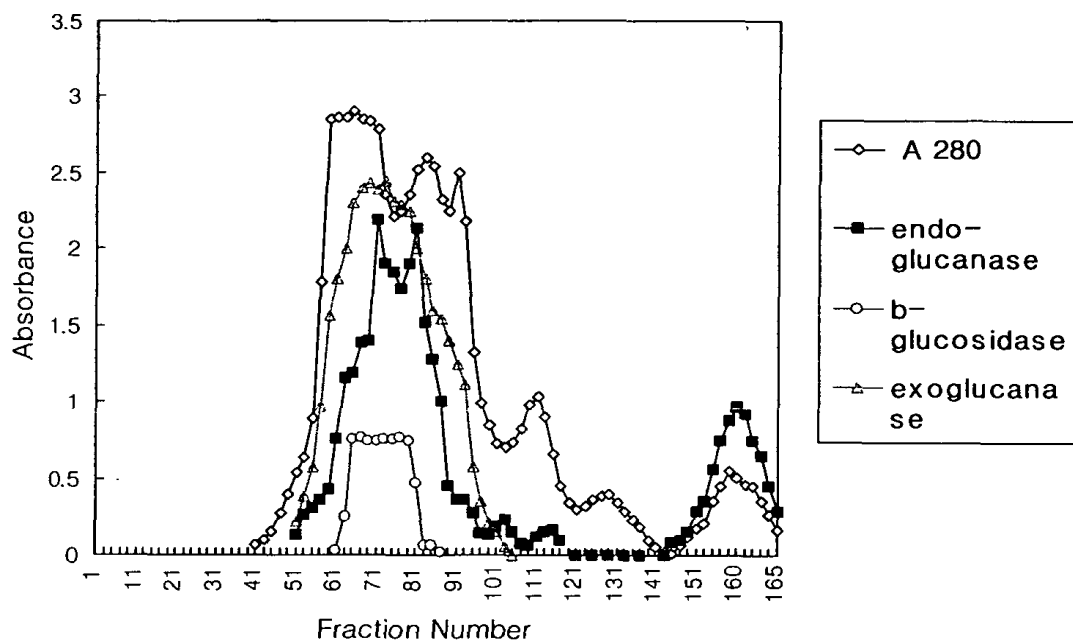


Figure 5-8. Gel Filtration Chromatography on Sephacryl S-200 of crude enzyme from *T. spp C-4*.

(flow rate: 4cm/hr, buffer: 50mM acetate buffer(pH 5.0), fraction volume: 4ml)

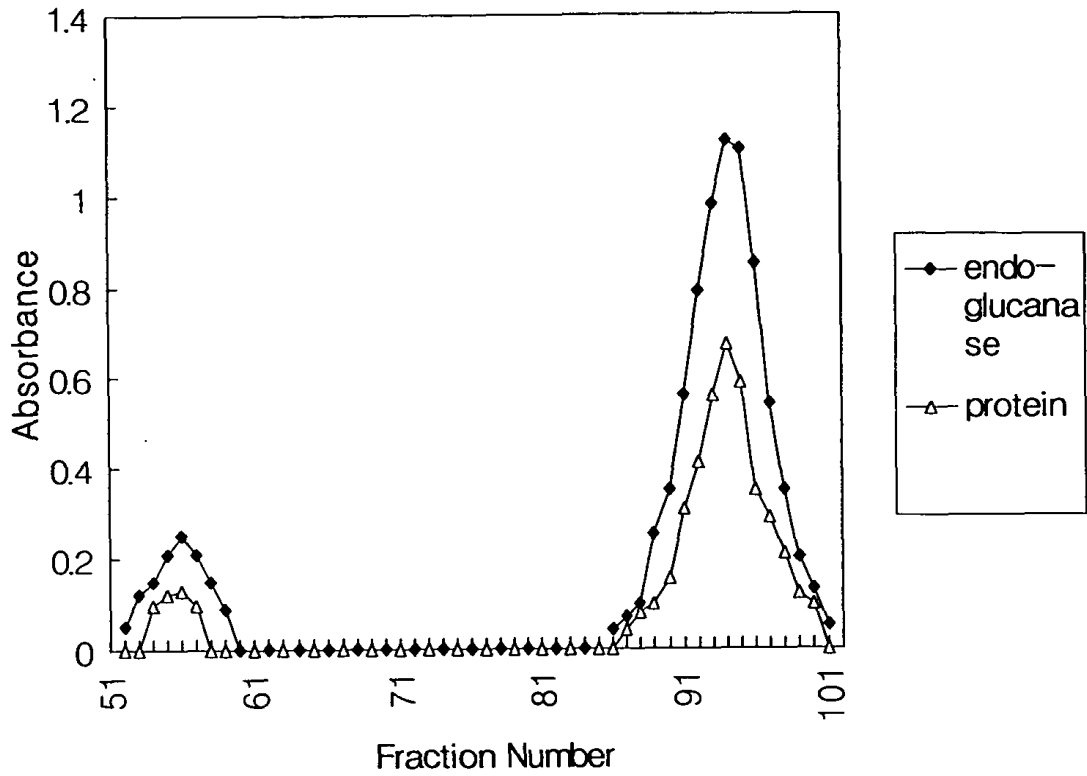


Figure 5-9. Gel filtration chromatography on Sephacryl S-100 to purify F-II-II (flow rate : 10cm/hr, buffer : 50mM, acetate buffer (pH 5.0), fration volume : 2ml)

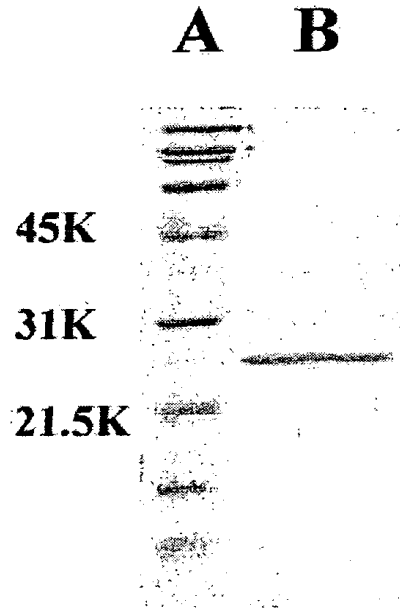


Figure 5-10. SDS-PAGE of F-II-II (I=15 %, C=2.7 %); lane A: Marker proteins
lane B: F-II-II

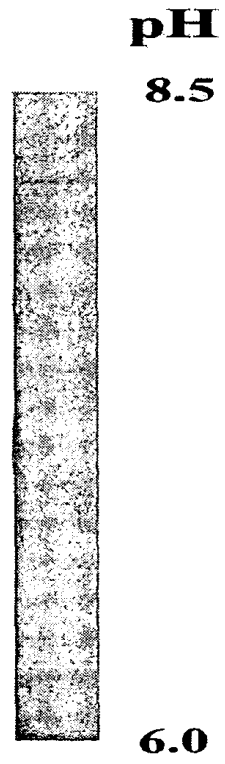


Figure 5-11. Isoelectric focusing of F-II-II (T=5 %, C=3 %, pH 6.0-8.5)

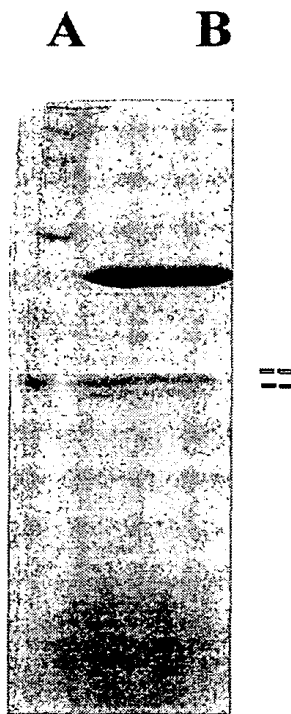


Figure 5-12. SDS-PAGE of F-II-II (T=15 %, C=2.7 %) after cleavage with trypsin;

lane A: Marker proteins, lane B: F-II-II

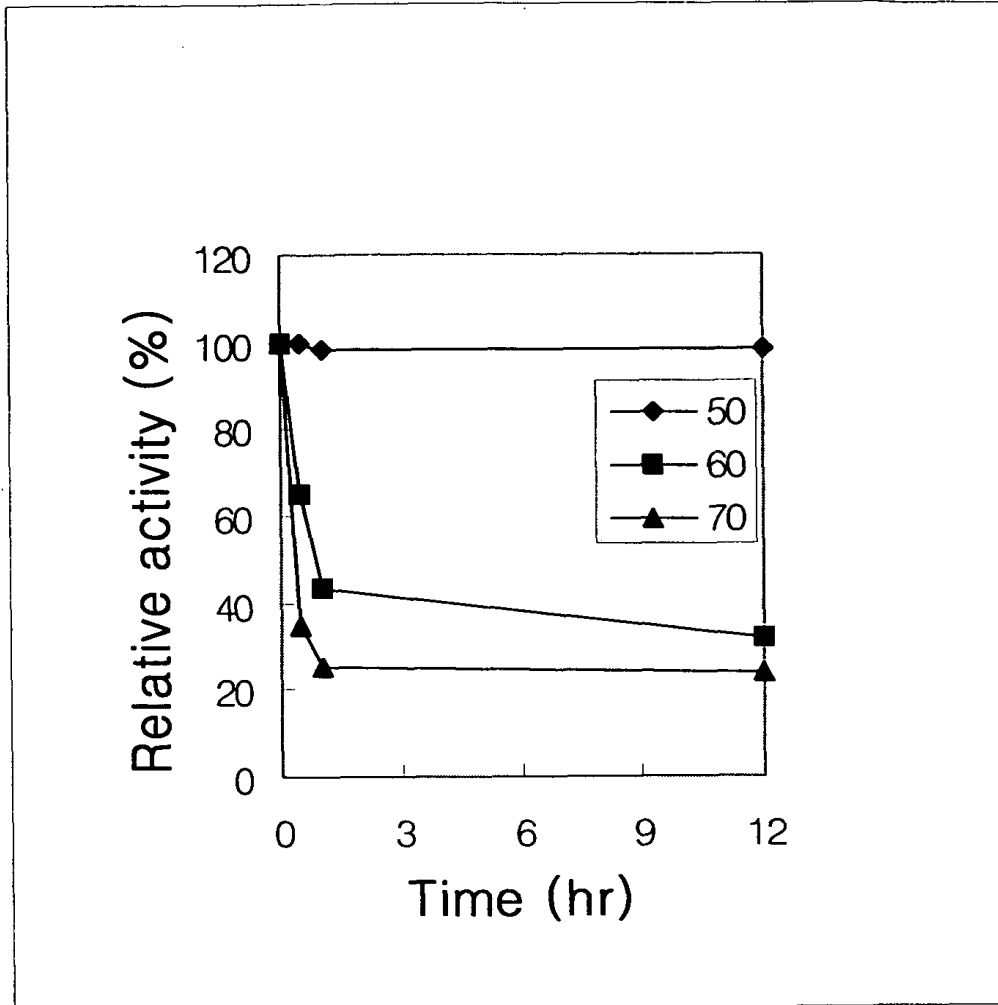


Figure 5-13. Thermal stability of F-I-III (50, 60, 70°C만 표시하였음)

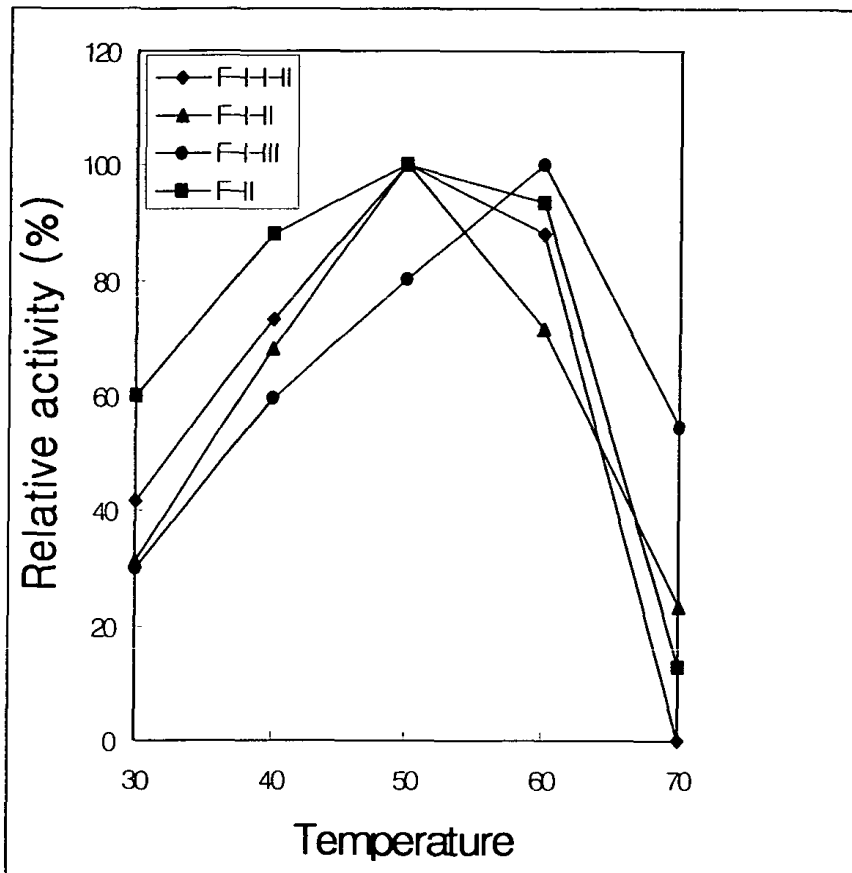


Figure 5-14. Optimal temperature of endoglucanases

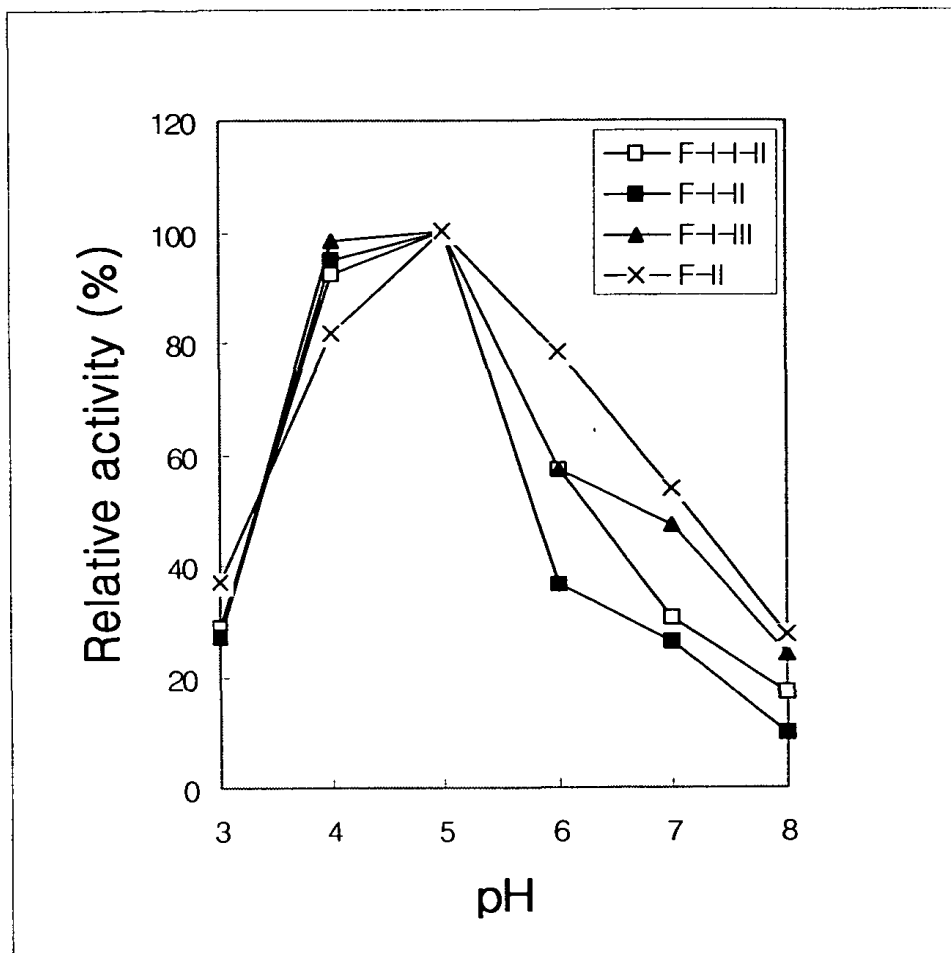


Figure 5-15. Optimal pH of endoglucanases

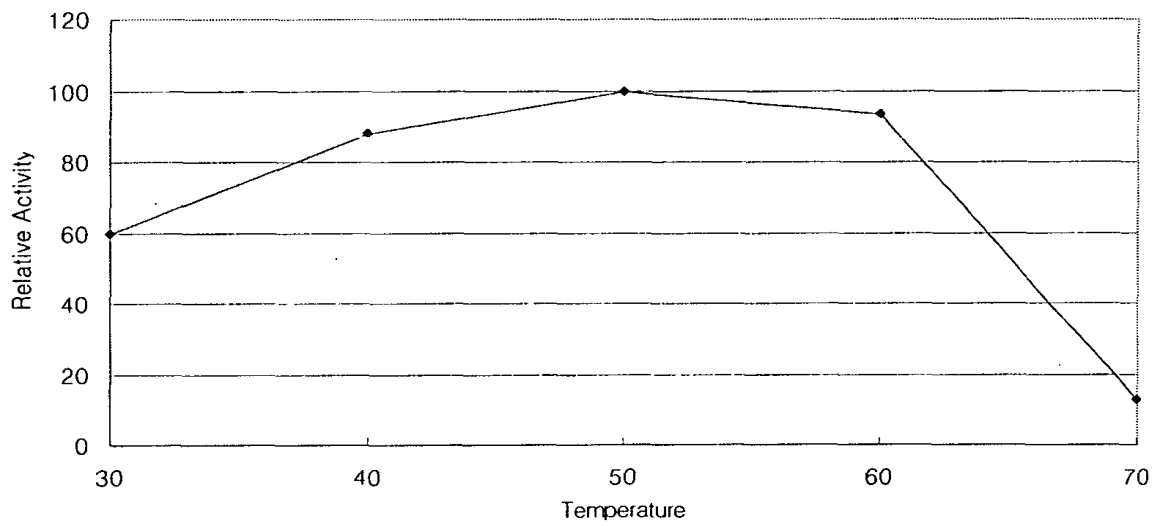


Figure 5-16. Optimum temperature of F-II-II

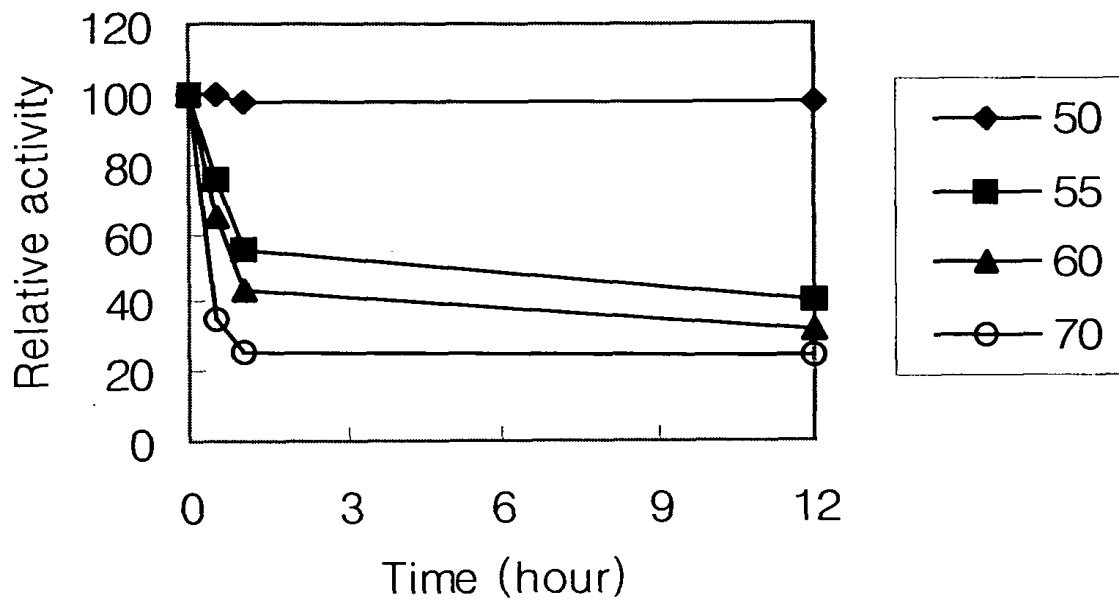


Figure 5-17. Thermal stability of F-II-II

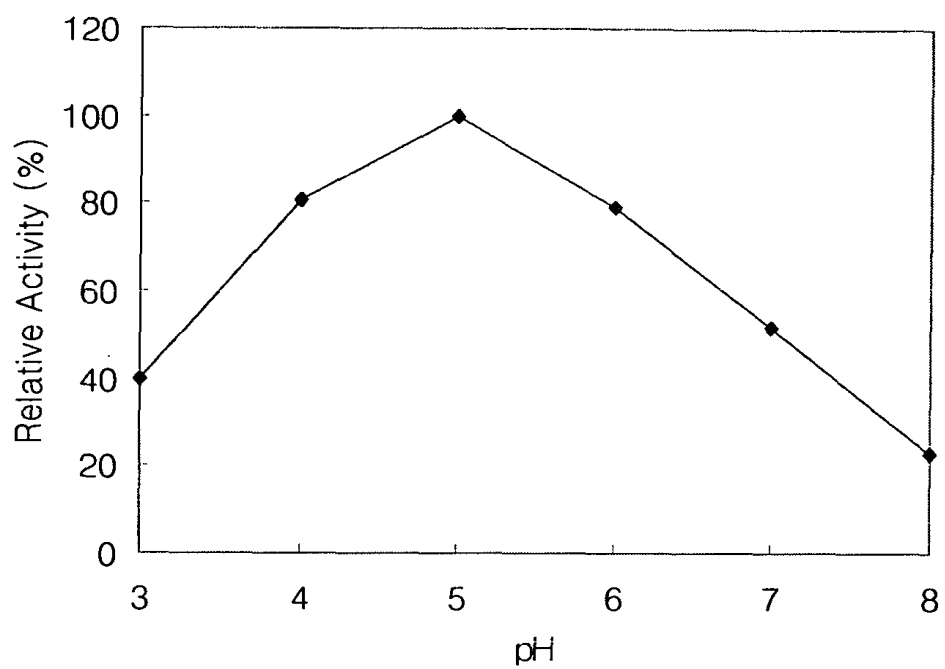


Figure 5-18. Optimum pH of F-II-II

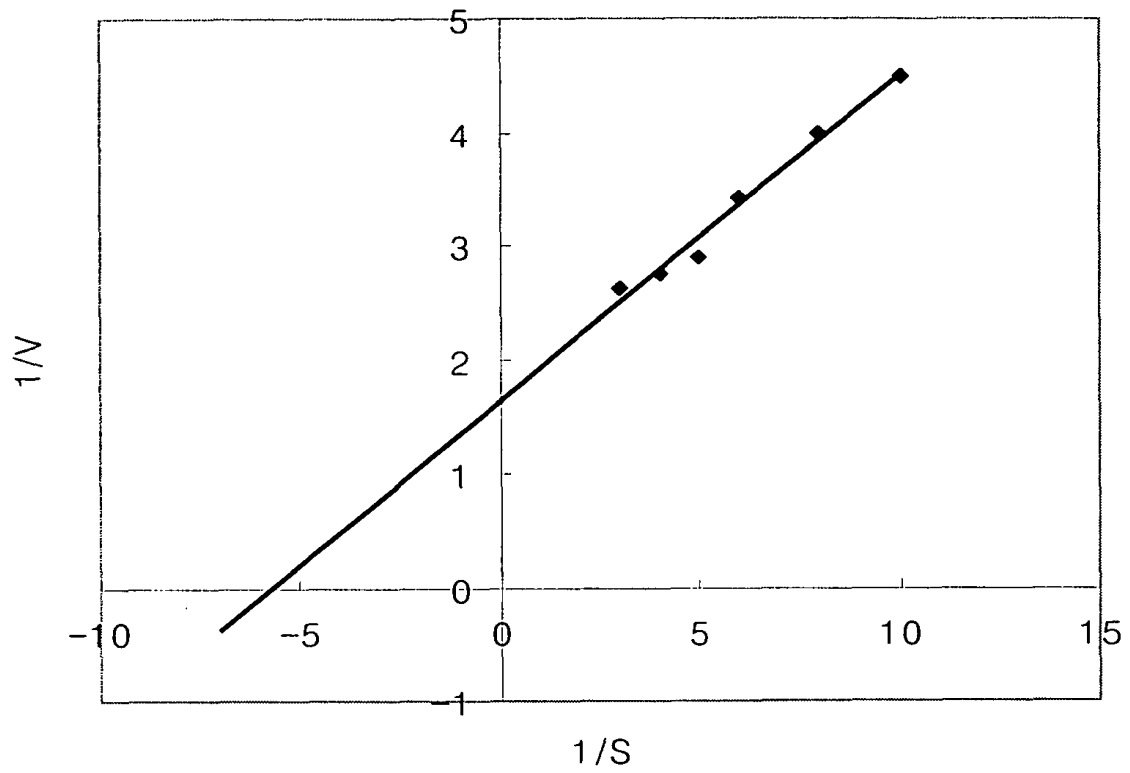


Figure 5-19. Lineweaver-Burk plot of F-II-II

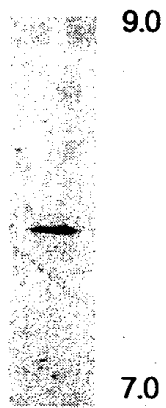


Fig 5-20. Isoelectric focusing of F-II-II (T=5 %, C=3 %, pH 7.0-9.0)
The gel was stained with silver staining after IEF. pI was estimated to be 8.0

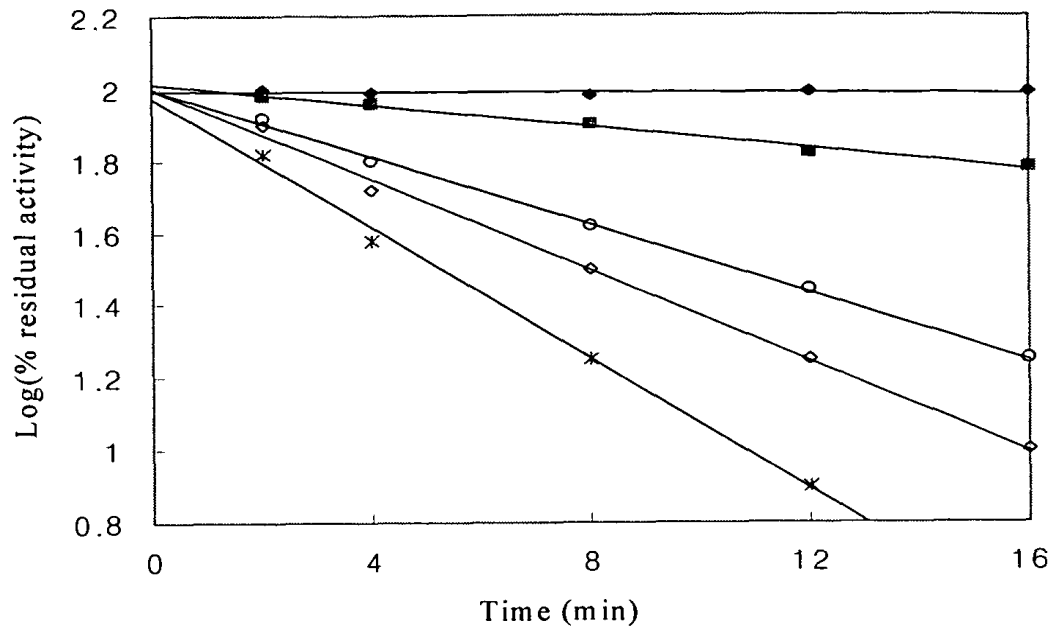


Figure 5-21. Inactivation of F-II-II by WRK; 0, 1, 2, 3, 5, 5 mM WRK

Table 5-1. Amino acid composition of F-II-II

Amino acid	Residue
Asx*	17
Glx*	28
Ser	33
Gly	66
His	7
Arg	8
Thr	8
Ala	10
Pro	6
Tyr	6
Val	7
Met	1
Ile	9
Leu	15
Phe	6
Lys	9
TOTAL	236

* Asx, Glx mean the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid respectively.

Table 5-2. Effect of metals and reducing agents on cellulase activities.

	F-I-I-II	F-I-II	F-I-III	F-II
MgCl ₂	106.6	98.2	93.1	98.9
CoCl ₂	104.3	106.4	116.3	103.4
FeCl ₂	112.3	97.3	96.2	99.2
CaCl ₂	114.5	103.2	109.8	107.3
CsCl	110.2	102.4	106.8	97.4
LiCl	102.2	99.2	107.8	103.2
Cystein				
EDTA	107.8	108.3	110.5	104.6
β-Mercaptoeth anol	109.1	105.9	107.1	105.3
DTT	114.9	112.8	120.3	116.3
L-Ascorbic acid	117.6	116.5	121.2	120.3
	130.0	127.9	137.7	127.8

Table 5-3. Effect of Ox-gall on cellulase activities.(After 2hr treatment)

	0.3%	1.0%	2.0%	5.0%
F-I-I-II	73.3	80.8	78.0	75.9
F-I-II	112	110	116	100
F-I-III	92.0	92.2	92.6	90.1
F-II	89.6	90.0	88.7	84.0

Table 5-4. Specific Activities of Endoglucanases.

	Specific Activity (U/mg)
F-I-I-II	130.1
F-I-II	135.8
F-I-III	152.2

Table 5-5. Specific activity of *Trichoderma* sp. C4 Endoglucanase

	total activity	total protein (mg)	specific activity	purification fold	yield (%)
crude extract	6090	291	20.9	1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	3321	100.9	32.9	1.57	36.7
Sephacryl S-200	195	0.375	520	24.9	0.13
Sephacryl S-100	94.3	0.122	776.1	37.1	0.042

2. *Trichoderma sp.* C4의 β -glucosidase 분리, 정제 및 활성 측정

가. *Trichoderma sp.* C4의 β -glucosidase 정제

Trichoderma sp. C4 균주를 potato dextrose agar에 접종하여 28°C에서 3-4일후에 균이 자라면 0.05% Tween 80를 사용하여 soluble fraction으로 회수하여 Mandel's media에 넣어 28°C에서 6일간 배양후 extracellular media를 사용했다. 배양액에 75% ammonium sulfate를 첨가하여 10,000×g, 40분간 원심분리하여 생성된 침전물을 50 mM sodium acetate, pH 5.0 (buffer A)에 대하여 4시간마다 dialysis membrane을 갈아주며 투석하여 ammonium sulfate를 제거했다. Sephacryl S-200이 충전된 column (3.5×100 cm)에서 buffer A를 사용하여 분리했다. bed volume이 0.16-0.42에 해당하는 분획을 모아 PM 10 membrane을 이용하여 Amicon ultrafiltration apparatus에서 농축하였다. DEAE-Sephadex A-50 column (2.4×20 cm)에 시료를 얹어주고 5 bed volume의 10 mM KPO₄, pH 7.0로 column을 씻어주었다. β -glucosidase활성이 있는 분획은 column에 부착하지 않고 떨어지므로 이 분획을 모아 PM 10 membrane을 이용하여 Amicon ultrafiltration apparatus에서 농축하여 buffer exchange를 시켜준후 momo P (H/R, 5/5)에서 시작 buffer를 25 mM ethanolamine, pH 9.4, elution buffer를 polybuffer, pH 7.0로 하여 분리시 β -glucosidase활성이 있는 분획은 pH 8.7에서 얻어졌다. 순수분리된 β -glucosidase는 Table 5-6에서 6% 회수율에 24.7배로 정제되었다. (Fig. 5-22)

나. *Trichoderma sp.* C4의 β -glucosidase의 특성 연구

1) 분자량

정제된 β -glucosidase는 Sephadex G-150 gel filtration column (1.8× 88cm)에서 native molecule의 분자량은 76 KDa (Fig. 5-23)로 추정되고 SDS-PAGE에서 측정시 75 KDa로 monomer로 존재하고 있는 것으로 보인다.

2) 열에 의한 효소의 안정도

Fig. 5-24.A에서 보여주듯이 각 온도에서 15분씩 배양시 50°C까지는 100%의 활성을 보유하나 60°C에서 36%, 70°C에서 14%의 활성만이 남아 열처리시 급격히 활성이 감소됨을 보이고 있다. Fig. 5-24.B에서는 온도에 의한 반응속도의 상대적 변화를 측정했는데 35-45°C에서 반응최대이고 100°C에서도 84%의 활성을 보유하고 있었다. 효소에 열처리시 보다 반응 혼합물에 열처리시 훨씬 활성의 안정성을 보여주는데 기질과

의 결합이 열처리에 의한 변성을 보호해 주는 것으로 보인다.

3) Ox gall 존재시의 효소의 반응속도

사료로 투여시 함께 존재하는 담즙산에 의한 영향을 알아보기 위해 Ox Gall의 농도 별로 β -glucosidase 활성에 미치는 영향을 측정시 Fig. 5-25에서와 같이 1% 첨가시는 92% 활성이 보유하고 5% 첨가시에도 84% 활성보유로 Ox gall존재시도 상당히 안정했다.

4) protease에 의한 영향

Fig. 5-26에서와 같이 trypsin, pepsin, chymotrypsin모두에 기질과 효소를 20:1의 비율로 첨가하여 37°C, 60분간 배양시 활성에 거의 영향을 받지 않아 소화효소에 대해 안정성이 상당히 높은 것으로 보인다.

5) pH에 대한 안정도

각 pH에서 60분 방치후 활성을 측정시 (Fig. 5-27.A) pH 5.0에서 가장 활성이 높았고 산성쪽보다 알칼리성쪽에서 급격히 활성이 저하되었다. 각 pH가 반응속도에 미치는 영향을 측정시 (Fig. 5-27.B) pH 5.0에서 가장 활성이 높아 β -glucosidase는 lysozyme과 유사한 작용기작을 가지고 있는 것으로 추정된다.

6) metal ion, site-specific inhibitor에 의한 영향

Table 5-7에서 보여주는 것과 같이 조사된 시약중 1% SDS를 제외하고는 심각한 활성의 저하를 보인 것이 없어 상당히 활성이 안정한 것으로 보이고 금속 ion중 Mn^{2+} , Zn^{2+} 은 첨가시 상당량의 활성의 증가를 보였다.

7) 기질 특이성과 반응속도상수

Table 5-8에서 정상기질로 사용하는 *p*-nitrophenyl β -glucopyranoside (PNPG)외 유사 화합물과 반응을 측정시 기질특이성은 *p*-nitrophenyl β -cellobioside > PNPG > *p*-nitrophenyl β -cellotrioside > *p*-nitrophenyl β -cellotetraside > *o*-nitrophenyl β -glucopyranoside (ONPG) > *p*-nitrophenyl β -gentiobiose > *p*-nitrophenyl β -fucopyranoside (PNP_{fuc}) > *p*-nitrophenyl β -galactopyranoside (PNPGal) > *p*-nitrophenyl α -glucopyranoside (PNP α G) > *p*-nitrophenyl β -xylopyranoside의 순이고 *p*-nitrophenyl β -L-arabinopyranoside, *p*-nitrophenyl N-acetyl β -D-glucosamide, *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide, *p*-nitrophenyl β -D-maltoside는 기질로 전혀 작용하지 못했다. PNPG의 K_m 과 V_m 는 각각 0.2 mM과 $2.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 산출되었다. (Fig. 5-28). β -form monosaccharide 중의 β -glucosidase 친화력을 보면 glucose, galactose, fucose, xylose이고 cellooligosaccharide는 친화력은 subunit의 수가 증가함에 따라 감소

되고 반응속도는 증가하였다. glucose와 gluconolactone은 PNPG를 기질로 사용하는 효소반응에서 K_i 값이 1.4 mM과 2.1 μ M로 경쟁적 억제자로 작용했다. (Fig. 5-29). galactose, mannose, xylose는 K_i 값이 120 mM, 41 mM, 163 mM로 생리적인 농도에서 β -glucosidase에 대해 거의 억제현상을 보이지 않았다.

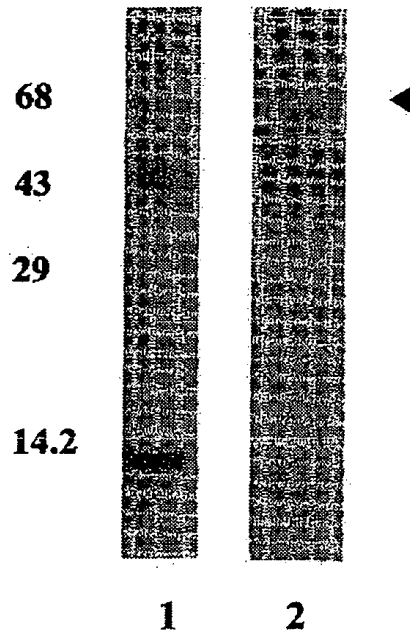


Fig. 5-22 Estimation of M. W. of β -glucosidase by SDS-PAGE.

The M.W. standards of bovine serum albumin (68,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (29,000), and lysozyme (14,200) in lane 1. The active fraction after mono P column chromatography was put on lane 2. The M.W. of β -glucosidase was calculated to be 75,000

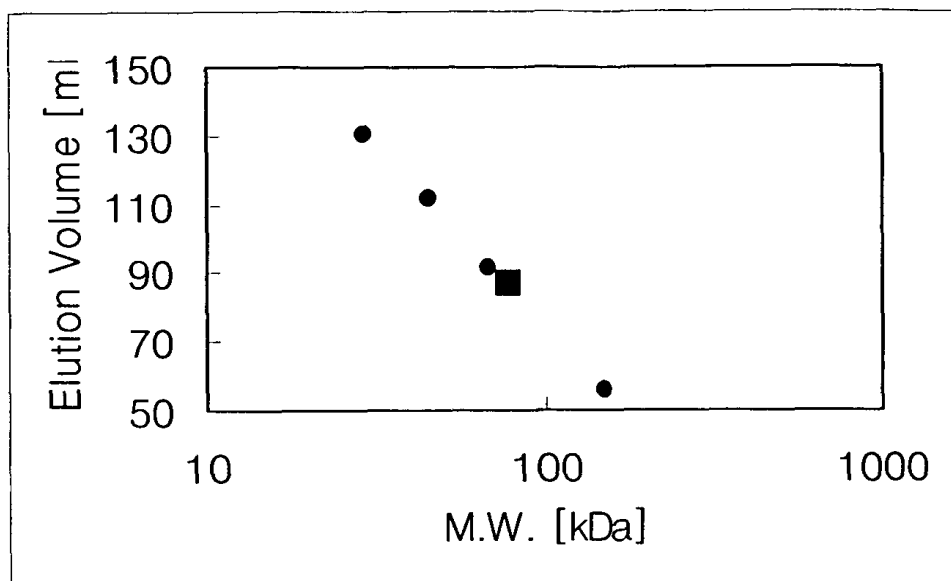


Fig. 5-23 Estimation of M. W. of β -glucosidase by Sephadex G-150 column chromatography.

The active fraction after mono P column chromatography was applied. The M. W. standards consisted of alcohol dehydrogenase (150 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), ovalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa). The M. W. of β -glucosidase was calculated to be 76 kDa.

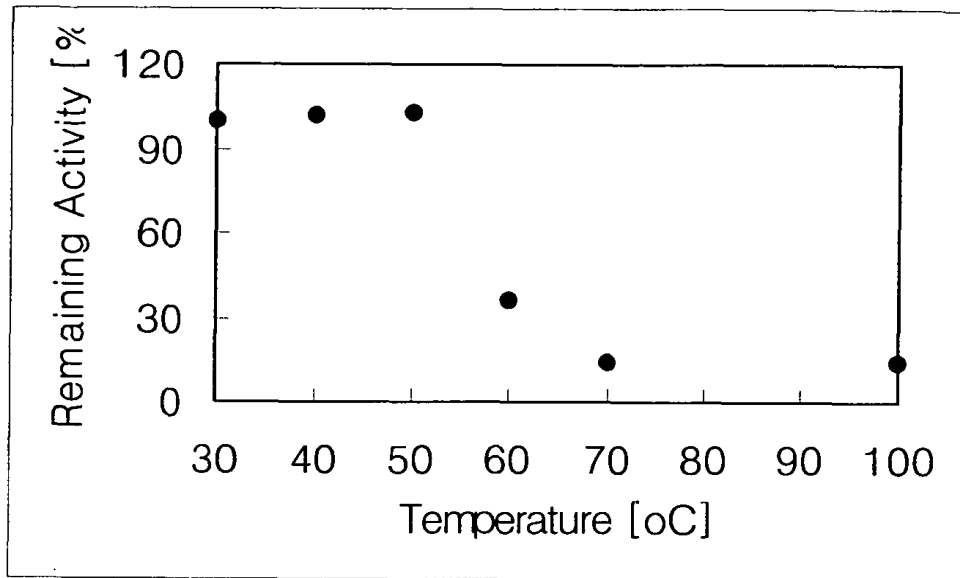


Fig. 5-24.A Thermal stability of β -glucosidase.

Each was incubated for 15 min at indicated temperature and was assayed for the remaining activity. The 4°C sample was assumed to have retained 100% activity.

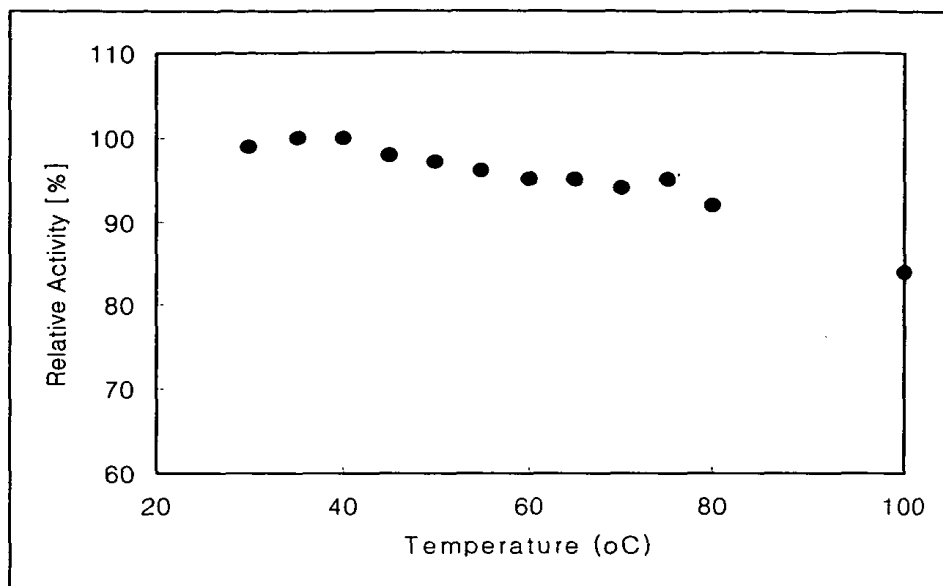


Fig. 5-24.B Effects of temperature on β -glucosidase activity.

Each reaction mixture was incubated for 15 min at indicated temperature and was assayed for the remaining activity. The 40°C sample was assumed to have retained 100% activity.

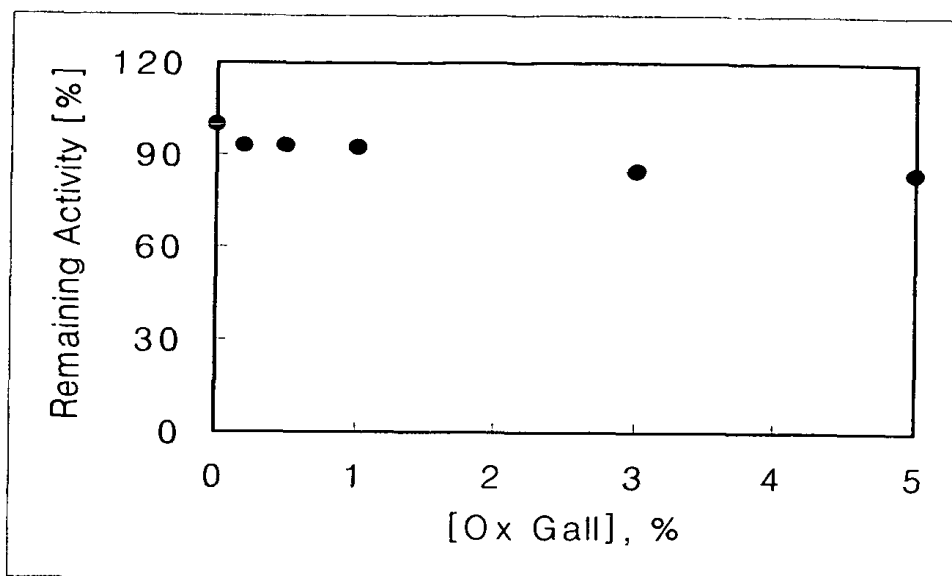


Fig. 3-25 Effect of Ox Gall on β -glucosidase

Each was incubated for 60 min with indicated concentration of Ox Gall and was assayed for the remaining activity. The sample without Ox Gall was assumed to have retained 100% activity.

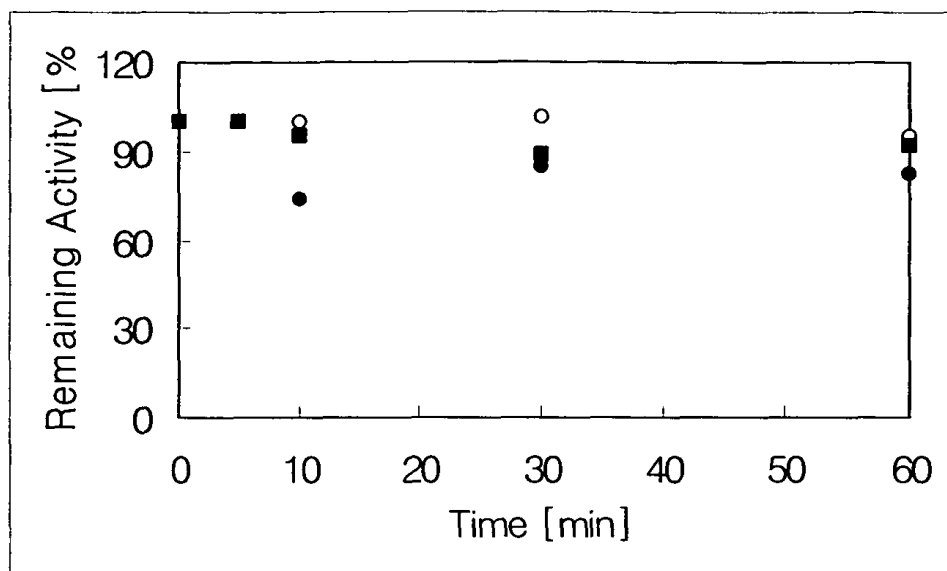
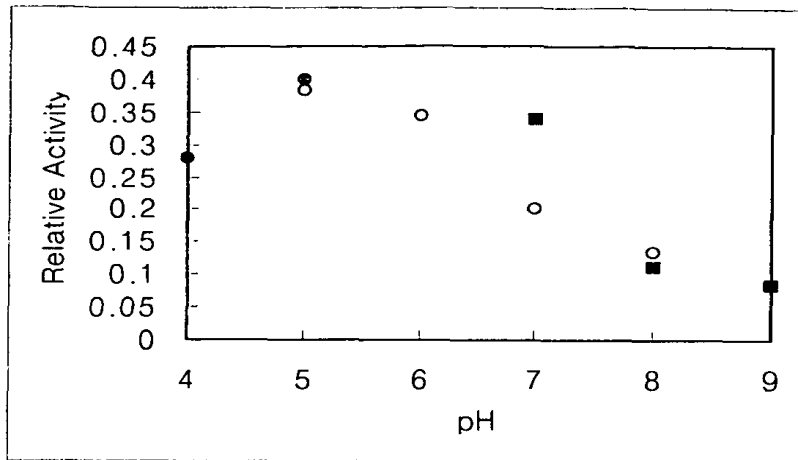


Fig. 5-26 Effects of proteases on β -glucosidase

Each was incubated for indicated time periods with trypsin (●), pepsin (○), and chymotrypsin (■) and was assayed for the remaining activity. The ratio of β -glucosidase to protease was 20:1. The sample without protease was assumed to have retained 100% activity.

A.



B.

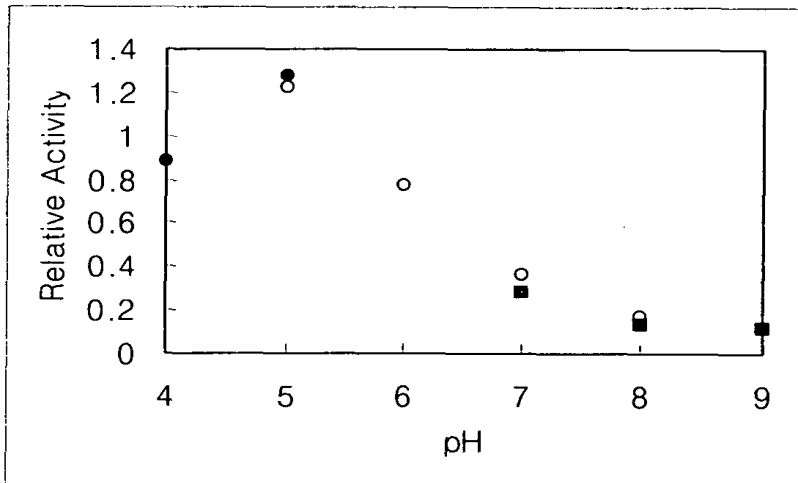


Fig. 5-27 Effects of pH on β -glucosidase

A. For different pHs, each aliquot of enzyme was incubated at 100 mM of sodium acetate (pH 4.0-5.0), potassium phosphate (pH 5.0-8.0), and Tris-HCl (pH 7.0-9.0) for 60 min and assayed for the remaining activity. Absorbance at 420 nm was determined for relative activity.

B. For different pHs, each aliquot of enzyme was incubated with 100 mM of sodium acetate (pH 4.0-5.0), potassium phosphate (pH 5.0-8.0), and Tris-HCl (pH 7.0-9.0) under the standard assay conditions and assayed for the remaining activity. Absorbance at 420 nm was determined for relative activity.

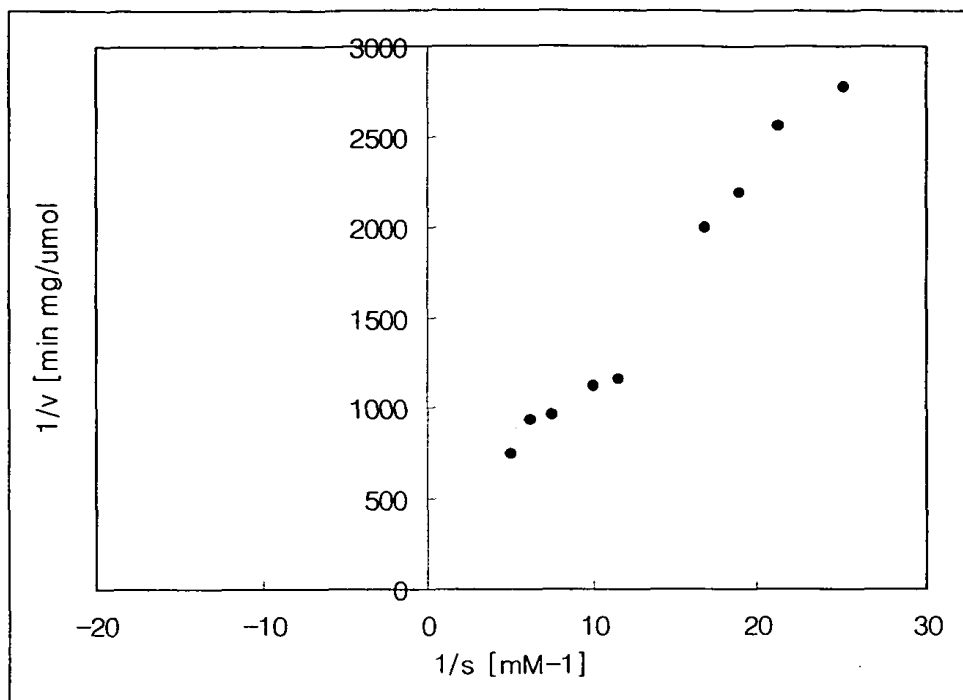
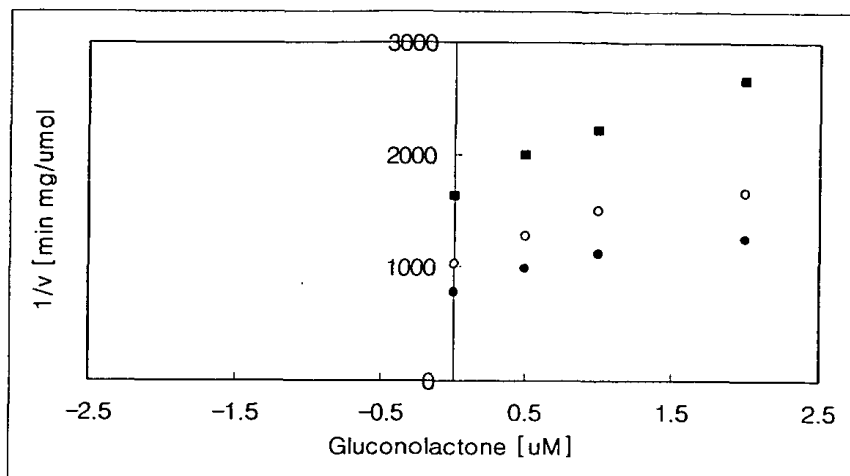


Fig. 5-28. Double reciprocal plot for K_m determination with PNPG as a substrate.

Initial velocities were measured as described in Methods and Materials. The concentration range of PNPG was 0.040-0.2 mM. The K_m and V_m value of PNPG was 0.2 mM and $2.8 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, respectively.

A.



B.

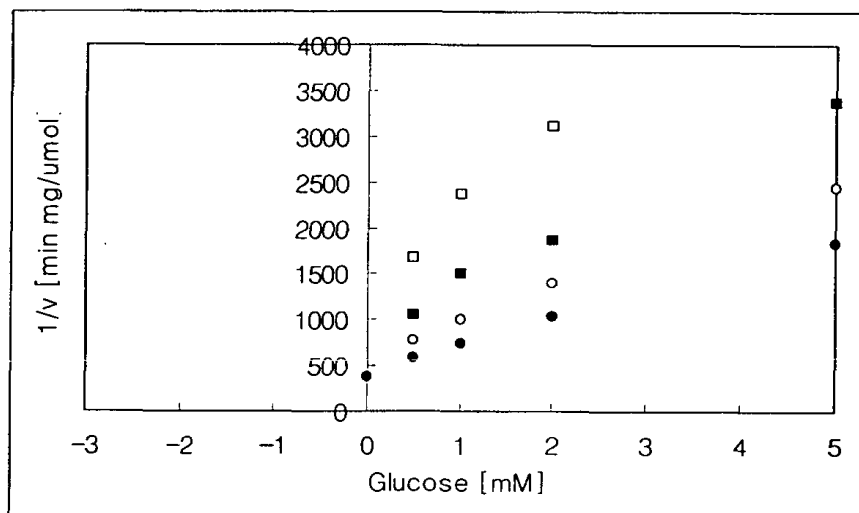


Fig. 5-29 Dixon Plot of gluconolactone (A) and glucose (B) as an inhibitor on PNPG hydrolysis by β -glucosidase.

The reaction mixture was prepared as described in Materials and Methods with indicated amount of each inhibitor. The concentration of PNPG was: (A) ●, 0.133 mM; ○, 0.087 mM; ■, 0.047 mM (B) ●, 0.2 mM; ○, 0.133 mM; ■, 0.087 mM; □, 0.047 mM. The K_i was estimated to be $2.1 \times 10^{-6}M$ and $1.4 \times 10^{-3}M$ for gluconolactone and glucose, respectively.

Table 5-6. Purification of β -glucosidase of *Trichoderma sp. C4*

Purification	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific Activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
C-4 cell homogenate	71.3	1301	18.2	100	1
Dialysis	43.5	1020	23.4	78	1.3
Sephacryl S-300	40.0	1013	25.3	78	1.4
DEAE-Sephadex A-50	7.2	510	70.8	39	3.9
Mono P	0.18	81	450.0	6	24.7

Table 5-7. Effects of metal ions and inhibitors on β -glucosidase

Compound	Concentration	Remaining Activity (%)
Control		100
Ca ²⁺	1 mM	105
Mg ²⁺	1 mM	105
Co ²⁺	1 mM	110
Mn ²⁺	1 mM	172
Zn ²⁺	1 mM	113
Cu ²⁺	1 mM	97
DTT	1 mM	101
2-mercaptoetnaol	1 mM	97
SDS	1 %	50
Urea	2 M	102
EDTA	1 mM	98

Table 5-8. Substrate Specificities of β -glucosidase

Compound	Km (mM)	Vm (μ mol/min/mg)	Vm/Km
<i>p</i> -nitrophenyl β -glucopyranoside	0.20	2.8×10^{-3}	1.4×10^{-2}
<i>o</i> -nitrophenyl β -glucopyranoside	0.80	2.1×10^{-4}	2.6×10^{-3}
<i>p</i> -nitrophenyl β -cellotetraside	0.65	4.1×10^{-3}	6.3×10^{-3}
<i>p</i> -nitrophenyl β -celotrioside	0.51	4.6×10^{-3}	9.1×10^{-3}
<i>p</i> -nitrophenyl β -cellobioside	0.42	1.1×10^{-2}	2.6×10^{-2}
<i>p</i> -nitrophenyl β -gentiobiose	0.12	1.7×10^{-4}	1.4×10^{-3}
<i>p</i> -nitrophenyl α -glucopyranoside	0.40	3.6×10^{-5}	9.0×10^{-5}
<i>p</i> -nitrophenyl β -galactopyranoside	0.22	2.7×10^{-5}	1.2×10^{-4}
<i>p</i> -nitrophenyl β -fucopyranoside	0.33	8.9×10^{-5}	2.7×10^{-4}
<i>p</i> -nitrophenyl β -xylopyranoside	4.0	2.3×10^{-5}	2.5×10^{-6}

3. *Trichoderma sp.* C4의 exoglucanases의 분리 및 정제

가. Amino acid sequencing

당초 연구 계획에는 없었으나, 연구의 효율적 수행으로 exoglucanase (CBH2)의 아미노산 염기서열을 추가로 결정하였다. 정제된 CBH2를 pyroglutamate amino-peptidase로 deblocking하여 sequencing을 행하였다. 그 결과 CTQQAETHPPLTWQK의 sequence를 얻었다. 이는 *T. reesei*의 CBHI과 93%의 homology를 보였다.

나. exoglucanase의 분리 및 정제

Trichoderma sp. C4 균주를 potato dextrose agar에 접종하여 28°C에서 3-4일후에 균이 자라면 0.05% Tween 80를 사용하여 soluble fraction으로 회수하여 Mandel's media에 넣어 28°C에서 6일간 배양후 extracellular media를 사용했다. 배양액에 75% ammonium sulfate를 첨가하여 10,000×g, 40분간 원심분리하여 생성된 침전물을 50 mM sodium acetate, pH 5.0 (buffer A)에 대하여 4시간마다 dialysis membrane을 갈아주며 투석하여 ammonium sulfate를 제거했다. Sephacryl S-200이 충전된 column (3.5 × 100 cm)에서 buffer A를 사용하여 분리했다. 활성이 있는 분획을 모아 PM 10 membrane을 이용하여 Amicon ultrafiltration apparatus에서 농축하였다. exoglucanase 1과 2를 분리하기 위해 DEAE-Sephadex A-50 column (2.4 × 20 cm)에 시료를 얹어주고 5 bed volume의 10 mM KPO₄, pH 7.0로 column을 씻었다. exoglucanase1은 column에 부착하지 않고 떨어지므로 이 분획을 모아 PM 10 membrane을 이용하여 Amicon ultrafiltration apparatus에서 농축하여 buffer exchange를 시켜준후 momo P (H/R, 5/5)에서 시작 buffer를 25 mM ethanolamine, pH 9.4, elution buffer를 polybuffer, pH 7.0로 하여 분리시 exoglucanase1활성이 있는 분획은 pH 7.6에서 얻어졌다. exoglucanase2는 DEAE- Sephadex A-50 column을 0-1.0 M NaCl gradient로 용출시 column에서 떨어져 활성이 있는 분획을 PM 10 membrane을 이용하여 Amicon ultrafiltration apparatus에서 농축하여 buffer exchange를 시켜 준비하였다.

4. *Trichoderma sp.* C4의 각종 cellulase들 사이의 synergism 측정

가. 다양한 조합의 endoglucanase들 사이의 활성

Trichoderma sp. C4 균주에서 발견된 4가지 종류의 endoglucanase를 각각 정제하여 다양한 조합에서 CMCase의 활성을 측정결과 endoglucanase 1 + 2 의 조합이 가장 높은 활성을 보였다 (Fig. 5-30). endoglucanase 4의 경우는 in vitro system에서 cellulolytic activity에 큰 영향을 미치지 않았고 endoglucanase 2는 전체활성에 가장 많은 영향을 주었다..

현재 C-4 균주의 glucanase중 유전자의 서열을 알고 있는 것이 endoglucanase 2, 3, 4 이므로 높은 cellulolytic activity를 위해 endoglucanase 1 대신에 다른 set을 대체할 수있는지를 보기 위해 다시 2가지 조합을 비교하였다. endoglucanase 2 +3은 endoglucanase 1 + 2 보다는 낮지만 90% 정도의 활성을 가지므로 대체시에 현저한 차이를 보이지 않을 것으로 보인다 (Fig. 5-31). 이 결과를 확인 하기 위해 2가지 조합의 endoglucanase에 excess amount의 β -glucosidase를 첨가시에도 Fig. 5-31와 유사한 결과를 보였다 (Fig. 5-32).

가장 활성이 높은 조합인 endoglucanase 1 + 2 에 exoglucanase 1, 2, β -glucosidase를 첨가시 3가지 종류의 exoglucanase가 전부 다 들어갔을 때 가장 활성이 높았다 (Fig. 5-33). 이 결과를 확인하기 위해 endoglucanase 1 +2 +3 의 조합에 exoglucanase 1, 2, β -glucosidase를 첨가시 Fig. 5-33와 유사하게 3가지 종류의 exoglucanase가 전부 다 들어갔을 때 가장 활성이 높았다 (Fig. 5-34).

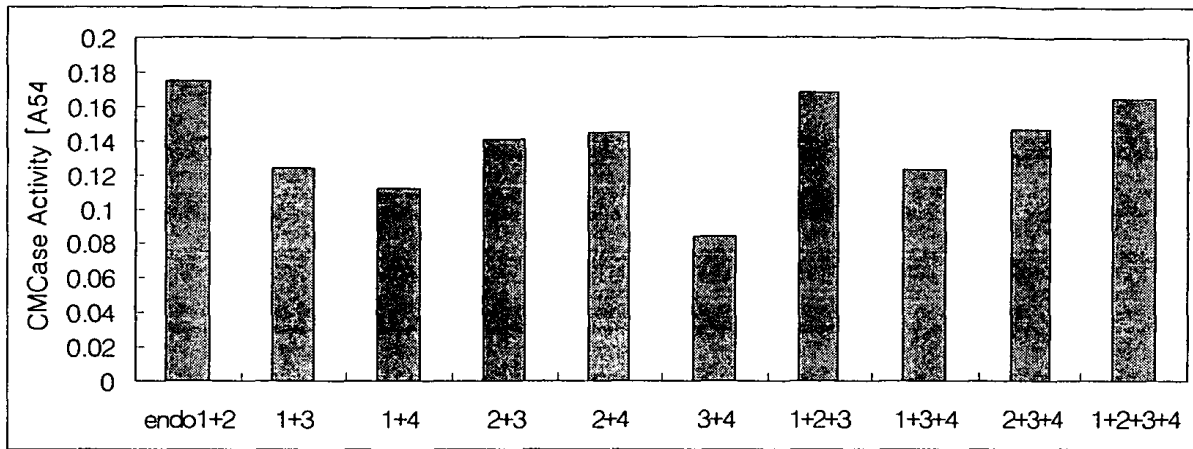


Figure 5-30. CMCase activity of different combination of endoglucanases (average of 2set)

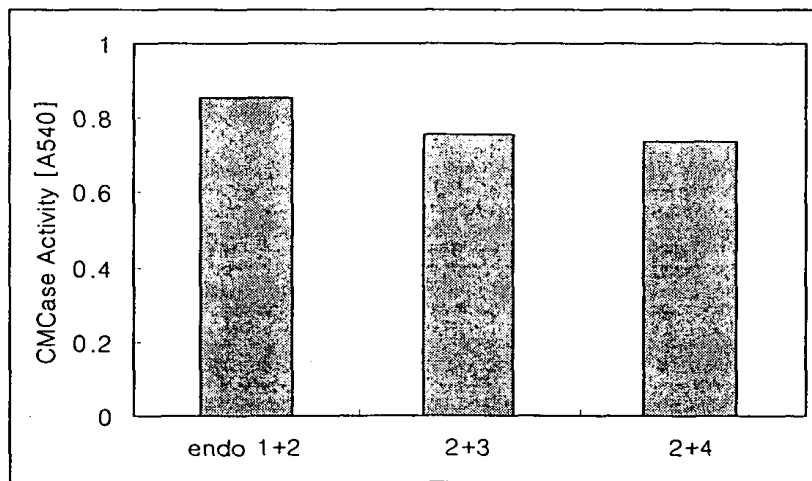


Fig. 5-31 CMCase activity of different combination of endoglucanase (average of 4set)

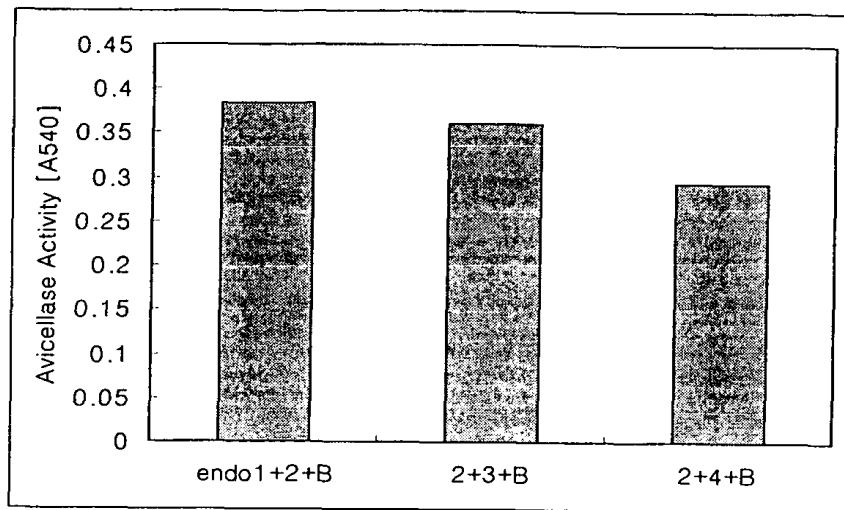


Fig. 5-32. Avicellase activity of different combination of endoglucanase with excess amount of β -glucosidase (average of 2 set)

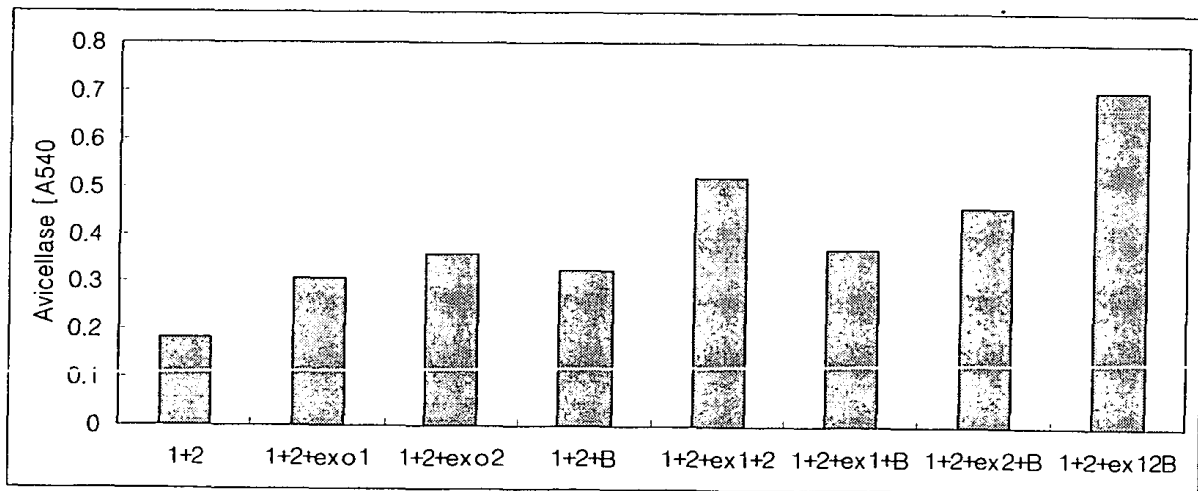


Fig. 5-33. Avicellase activity of different combination of exoglucanase 1, 2, and β -glucosidase with endoglucanase 1+2 (average of 2 set)

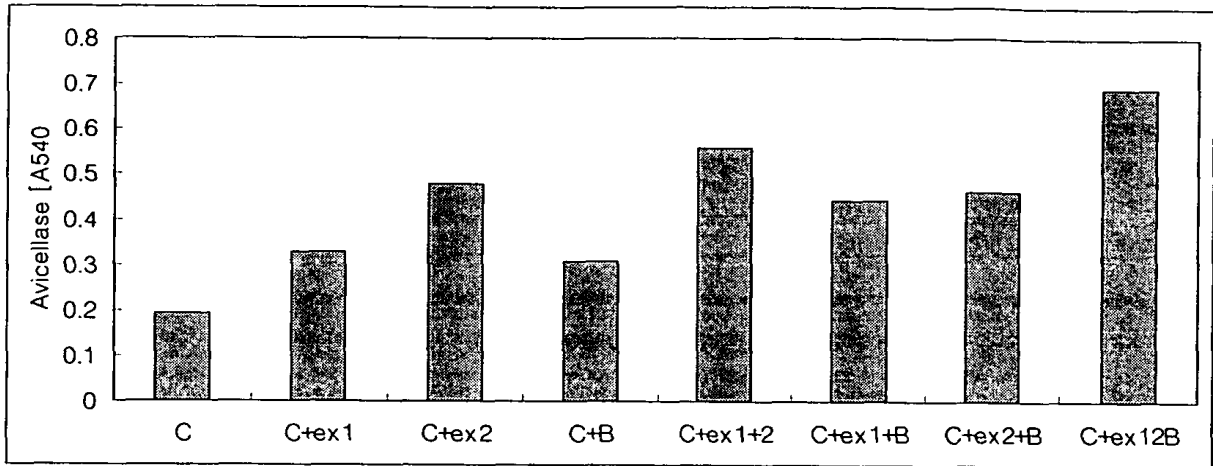


Fig. 5-34. Avicellase activity of different combination of exoglucanase 1, 2, and β -glucosidase with endoglucanase 1+2+3 (C) (average of 2 set)

제 6 장 참고문헌

- Ballance, D.J., F.P. Buxton and G. Turner. (1983). Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289.
- Ballance, D.J., and G. Turner. (1985). Development of a high frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 36:321-327.
- Beach, D. and P. Nurse. (1981). High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 290:140-143.
- Burroughs, W., P. Gerlaugh, B. H. Edgington, and R. M. Bethke. (1949). The influence of corn starch upon roughage digestion in cattle. *J. Animal Sci.* 8:271-278.
- Carter, H. E. and Phillips, G. E. (1944). The nutritive value of yeast proteins. *Fed. Proc.* 3:123-128.
- Chauvaux, S., Beguin, P., and Aubert, J-P. (1992). Site-directed mutagenesis of essential carboxylic residues in *Clostridium thermocellum* endoglucanase CelD. *J.Biol. Chem.* 267:4472-4478.
- Chung, D. K., J. B. Russell, and D. B. Wilson. (1994). An unusual event in the synthesis of a *Bacteroides ruminicola* B14 endoglucanase. *J. Bacteriol.* Submitted.
- Cullen, D., S.A. Leong., L.J. Wilson and D.J. Henkel. (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph. *Gene*, 57:21-29.
- Dalboge, H. and Heldt-Hansen, H.P. (1994) A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes. *Mol.Gen Genet.* 243:253-260
- De Oliveira Azevedo, M. and Radford, A. (1990). Sequence of cbh-1 of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Nucl. Acid Res.* 18:668.
- Fincham, J.R.S. (1989). Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.*, 53:148-155.
- Gonzalez, R., Ramon, D., and Petrez-Gonzalez, J.A. (1992) Cloning, sequence analysis and yeast expression of the egl1 gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38:370-375.
- Grosjean, H. and Fiers, W. (1982). Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene* 18:199-209.

- Hahm, Y.T. and C.A. Batt. (1988). Genetic transformation of an *argB* mutant of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1610-1612.
- Halliwell, G. and M. P. Bryant. (1963). The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from the rumen of cattle. *J. Gen. Microbiol.* 32:441-448.
- Hamamoto, T., Foong, F., Shoseyov, O., and Doi, R.H. (1992). Analysis of functional domains of endoglucanases from *Clostridium cellulovorans* by gene cloning, nucleotide sequencing and chimeric protein construction. *Mol.Gen.Genet.* 231:472-479.
- Harkki, A., J. Uusitalo, M. Bailey, M. Penttila, and J. K. C. Knowles. (1989). A novel fungal expression system: secretion of active calf chymosin from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 7:596-603.
- Henrissat, B. (1993). Hidden domains and active site residues in β -glucanase-encoding gene sequences? *Gene* 125: 199-204.
- Hinnen, A., J.B. Hicks and G.R. Fink. (1978). Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:1929-1935.
- Hungate, R. E. (1950). The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1-49.
- Hynes, M.J. (1979). Fine-structure mapping of the acetamidase structural gene and its controlling region in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 91:381-387.
- Jauris, S., Riicknagel, K.P., Schwarz, W.H., Kratzsch, P., Bronnenmeier, K., and Staudenbrauer, W.L. (1990). Sequence analysis of the *Clostridium stercorarium celZ* gene encoding a thermoactive cellulase (Avicelase I) : Identification of catalytic and cellulose-binding domains. *Mol. Gen. Genet.* 223:258-267.
- Johnson, D. E. and Remillard, R. L. (1983). Nutrient digestibility of brewers single cell protein. *J. Anim. Sci.* 56:735-739.
- Kane, E. A., W. C. Jacobson, and P. M. Damewood. Jr. (1959). Effect of corn starch on digestibility of alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 42:849-855.
- Karunanandaa, K., Fales, S.L., Varga, G.A., and Royse, D.J. (1992). Chemical composition and biodegradability of crop residues colonized by white-rot fungi. *J.Sci.Food Agric.* 60:105-112.
- Koch, A., Weigel, C.T.O., and Schulz, G. (1993). Cloning, sequencing, and heterologous expression of a cellulase-encoding cDNA (*cbh1*) from *Penicillium janthinellum*. *Gene* 124:57-65.
- Martin, S. A. and D. J. Nisbet. (1992). Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736-1744.

- Mattern, I.E., S. Unkels, J.R. Kinghorn, P.H. Pouwels and C.A.M.J.J. van den Hondel. (1987). Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger* pyrG gene. *Mol. Gen. Genet.* 210:460-468.
- McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 42: 99-105
- Mishra, N.C. and E.L. Tatum. (1973). Non-mendelian inheritance of DNA-induced inositol independence in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. USA*, 70:3875-3882.
- Mitsuishi, Y., Nitisinprasert, S., Saloheimo, M., Beise, I., Reinikainen, T., Claeysens, M., Keranen, S., Knowles, J.K.C., and Teeri, T.T. (1990). Site-directed mutagenesis of the putative catalytic residues of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I and endoglucanase I. *FEBS* 275:135-138.
- Mould, F. L., E. R. Orskov, and S. O. Mann. (1983). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
- Newbold, C. J., R. Brock, and R. J. Wallace. (1991). Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation on the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci.* 116:159-162.
- Newbold, C. J., R. Brock, and R. J. Wallace. (1992). The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the growth of fungi and ciliate protozoa in the rumen. *Lett. Appl. Microbiol.* 15:109-112.
- Orskov, E. R. and C. Fraser. (1975). The effect of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestion, and voluntary intake of dried grass in sheep. *Br. J. Nutr.* 34:493-500.
- Penttila, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R., and Knowles, J. (1986) Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* 45:253-263.
- Russell, J. B. and D. B. Dombrowski. (1980). Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:604-610.
- Russell, J. B. and D. B. Wilson. (1988). Potential opportunities and problems for genetically altered rumen microorganisms. *J. Nutrition.* 118:271-279.
- Russell, J. B., D. K. Chung, and D. B. Wilson. (1992). Gene construction as a means of creating an acid-resistant cellulolytic ruminal bacterium. *Proc. Minnesota Nutri. Conf.* 53:25-36.

- SAS Institute. 1986. SAS user's guide ; Statistics. SAS Institute, Inc., Cary, N. C. Akin, D.E., Sethuraman, A., Morrison III, W.H., Martin, S.A., and Eriksson, K-E. L. (1993). Microbial delignification with white rot fungi improves forage digestibility. *Appl. Envir.Micro.* 59:4274-4282.
- Saloheimo, M., and M.-L. Niku-Paavola. (1991). Heterologous production of a ligninolytic enzyme: expression of the *Phlebia radiata* laccase gene in *Trichoderma reesei*. *Bio/Technology* 9:987-990
- Satoh, E., Niimura, Y., Uchimura, T., Kozaki, M., and Komagata, K. (1993). Molecular cloning and expression of two α -amylase genes from *Streptococcus bovis* 148 in *Escherichia coli*. *Appl.Envin. Micro.* 59:3669-3673.
- Sims, P., James, C., and Broda, P.(1988). The identification, molecular cloning and characterization of a gene from *Phanerochaete chrysosporium* that shows strong homology to the exo-cellobiohydrolase I gene from *Trichoderma reesei*. *Gene* 74:411-422.
- Slyter, L. L. (1976). Influence of acidosis on rumen function. *J. Animal Sci.* 43:910-929.
- Struhl, K., D.T. Stinchcomb, S. Scherer and R.W. Davis. (1979). High-frequency transformation of yeast: Autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:1035-1042.
- Varel, V. H., Kreikemeier, K. K., Jung, H.-J., and Harfield, R. D. (1993). *in vitro* stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3171-3176.
- Wiedmeier, R. D., M. J. Arambel and J. L. Walters. (1987). Effects of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063-2068.
- Williams, P. E. V., and C. J. Newbold. (1990). Rumen probiosis: the effects of novel microorganisms on the rumen fermentation and ruminant productivity, p.211 In W. Haresign and D. J. A. Cole (ed.). *Recent advances in animal nutrition*. Butterworths, London.
- Yelton, M.M., J.E. Hamer and W.E. Timberlake. (1984). Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-1477.