

## *Trichoderma koningii*에서 분비되는 $\beta$ -D-glucosidase의 반응산물에 대한 핵자기공명분석

이헌주·정춘수·강사옥·하영철  
서울대학교 자연과학대학 미생물학과

### **<sup>1</sup>H-NMR Spectroscopic Evidence on the Glycosidic Linkages of the Transglycosylated Products of Low-Molecular-Weight $\beta$ -D-Glucosidase from *Trichoderma koningii***

Lee, Heon-Ju, Choon-Soo Jeong, Sa-Ouk Kang, and Yung-Chil Hah  
Department of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**ABSTRACT:** The mode of transglycosylation reaction observed during the action of low-molecular-weight  $\beta$ -D-glucosidase ( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1. 21) purified from *Trichoderma koningii* ATCC 26113 was investigated using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. The enzyme was purified by the series of procedures including ammonium sulfate precipitation, and fractionations by column chromatographies on Bio-Gel P-150, DEAE-Sephadex A-50, and SP-Sephadex C-50. The final purification was performed by the band elution after preparative polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme showed its molecular size of 78,000 through the analysis of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and its isoelectric point of 5.80 through the analysis of analytical isoelectric focusing. The H-1 proton resonances were analyzed. After the reaction of the enzyme with cellobiose, the reaction products were separated by high performance liquid chromatography using refractive index detector. H-1 resonances of the products were consisted with those of gentiobiose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,6)-D-glucopyranose], and cellotriose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl]-(1,4)-D-glucopyranose) with minor resonances of sophorose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,2)-D-glucopyranose], respectively.

**KEY WORDS** □ *Trichoderma koningii*,  $\beta$ -D-glucosidase, <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, transglycosylation

$\beta$ -D-Glucosidase (cellobiase,  $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)는 cellulase 복합체의 구성원중 하나이다. 본 효소는 반응과정중 transglycosylation의 현상을 나타내는 것으로 최근 보고되고 있다: Kozlovskaya 등(1981)은 *Geotrichum candidum*에 의해 생성되는 효소가 transferase의 활성을 가지고 있었다고 보고한 바 있다. Gusakov 등(1984)은 *Aspergillus foetidus*에서 cellobiase에 의해 촉매되는 transglycosylation에 관한 수학적인 도식을 설정한 바 있고, 이때 생성되는 transglycosylation 산물은 gentiobiose, isocellotriose 등과 같이  $\beta$ -1,4-linkage와

$\beta$ -1,6-linkage로 이루어진 것이라는 가설을 제시한 바 있다.

한편, *Trichoderma koningii*에서 분리한 효소의 경우, Wood와 McCrae(1982)는 thin layer chromatography를 사용하여 cellotriose 및 cello-tetraose와 유사한 물질을 검출하여 transferase 활성이 있음을 보고한 바 있다. *T. koningii*에서 분리된 cellulase 복합체의 구성원중 저분자 1,4- $\beta$ -D-glucan glucohydrolase의 경우에 있어서는 이와 같은 transglycosylation이 관찰되었고, 고압액체크로마토그래피와 핵자기 공명스펙트럼을 통해 그 산물의 결합형태가  $\beta$ -1,4-glycosidic

linkage라는 사실이 증명된 바 있으나(Maeng 등, 1987),  $\beta$ -D-glucosidase의 경우는 광범위한 연구 보고에도 불구하고, 작용양상 및 transglycosylation 산물의 정확한 본성이 충분히 규명되지 못한 상태이다. 따라서 본 논문에서는 *T. koningii*에서 저분자  $\beta$ -glucosidase를 순수분리하여 일반적인 특징을 조사하고, 고압액체크로마토그래피와 핵자기 공명스펙트럼분석을 통하여 transglycosylation 산물이 가지고 있는 glycosidic linkage(s)의 본성을 규명하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 시약

균주는 *Trichoderma koningii* ATCC 26113를 채택하여, Hong 등(1986)에 의해 제시된 방법으로 보관하고 배양하였다. 사용된 시약은 모두 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 사용하였다.

### 효소활성도의 측정과 분리

효소의 활성도와 조효소의 제조, Bio-Gel P-150 gel filtration chromatography 등은 Hong 등(1986)이 제시한 방법을 따라 시행하였으며, Bio-Gel P-150상에서 분리된 F-II 부분을 Diaflo membrane PM-10(Amicon)으로 15ml 정도로 농축한 후 0.02M 인산완충용액(pH 6.9)으로 10배 희석하여 다시 농축하였다. 이상의 과정으로 준비된 효소용액을 DEAE-Sephadex A-50(Pharmacia Fine Chemical) chromatography column(2.2×90 cm)에서 0.02M 인산완충용액으로 충분히 세척한 후 사용하였고 동일한 완충용액으로 용출하였다. 이 과정에서 F-II-I 부분을 수확하여 다시 Diaflo membrane PM-10을 통해 0.01M 초산완충용액(pH 5.0)으로 교환하여 농축하였다. 이 효소용액을 0.01M 초산완충용액(pH 5.0)으로 세척한 SP-Sephadex C-50 column상에서 동일한 완충용액으로 용출하였다. 이 과정에서 분리된 F-II-I-I 부분 20ml를 5ml로 농축하여 Davis(1964)의 방법을 변형하여 slab gel(폭, 123 mm×길이, 144 mm×두께, 3 mm)에서 전기영동을 하였고, 효소활성 염색을 Kwon(1988)의 방법을 따라 수행하였고, 이렇게하여 얻어진 band를 잘라 10ml의 0.05M 초산완충용액(pH 5.0)이 들

어있는 homogenizer에 넣어 잘게 간 후 원심분리기 및 membrane filter를 사용하여 효소를 용출하였다. 효소용액에 남아 있던 esculin과  $FeCl_3$ 는 0.05M 초산완충용액(pH 5.0)으로 희석하고 ultrafiltration 과정을 거쳐 제거하였다.

### 전기영동

Davis(1964)의 방법을 변형하여 행하였으며, acrylamide 농도는 8%(w/v)이었고 cross linkage는 2.7%를 사용하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli(1980)의 방법으로 하였고 acrylamide의 농도는 10%, cross linkage의 농도는 2.7%를 사용하였다. 효소활성 염색은 Kwon(1988)이 제시한 방법을 사용하였고, 당단백질의 염색은 0.2% periodic acid 수용액과 0.5% basic fuchsin을 혼합한 Schiff's reagent를 사용하여 상온에서 5% 초산용액을 18시간 동안 2시간 간격으로 갈아주면서 탄색시켰다.

### Analytical isoelectric focusing

Isoelectric focusing은 6.25% Pharmalyte(Pharmacia Fine Chemical, pH 4.0~6.5)를 사용하였고 acrylamide의 농도는 5%, cross linkage의 농도는 3%를 사용하였다. Focusing은 1M  $H_3PO_4$ 와 1M NaOH 수용액을 각각 양극과 음극으로 하였고 4°C에서 16시간 동안 500V를 계속 유지시켰다. Focusing이 끝난 후 2cm의 gel strip을 1cm 간격으로 잘라 각각을 2ml의 증류수로 용출하여 pH 기울기를 구하였다.

### 반응산물 분석

$\beta$ -Glucosidase에 의한 cellobiose의 분해 및 반응산물 분석은 HPLC(Model 6000 A, Waters Associates Co.)로 1시간 간격으로 하였고, Lichrosorb-NH<sub>2</sub>(Merck) column을 사용하였다. 용출속도는 1.5 ml·min<sup>-1</sup>이었다. 용매는 물과 acetonitrile을 20:80의 비율로 사용하였다. 반응 혼합물은 0.5 ml의 0.01M 초산완충용액(pH 4.5)에 4×10<sup>-4</sup> mM의 효소와 100 mM cellobiose로 구성하였으며 40°C에서 반응시켰다.

<sup>1</sup>H-NMR spectroscopy를 위해 5 ml의 반응 혼합물을 40°C에서 25시간 정도 반응시킨 후 speed vac concentrator(Savant)를 사용하여 0.5 ml로 농축하였다. 농축된 반응혼합물을 HPLC에서 20

$\mu$ l씩 25회 주사하여 분획하였고, 분획된 각각의 transglycosylation 산물에 함유된 acetonitrile을 rotary vacuum evaporator를 통하여 제거한 후, speed vac concentrator로 농축하여 HPLC에서 한번 더 정제하였다. 정제된 각각의 분획을 rotary vacuum evaporator 및 speed vac concentrator로 용매 및 수분을 제거하였다. 이와 같이 제조된 시료를 진공상태에서  $P_2O_5$ 와 함께 2일간 수분을 제거한 다음, 0.5 ml  $D_2O$  (99.8 atom % of deuterium, Sigma)에 용해시켰다. 이 과정을 한번 더 반복하여 최종적으로 산물의 농도가 10 mM 되게 하였다. 시료의 측정은 5 mm insert를 갖는 Bruker FT-NMR spectrometer를 20°C에서 200.1 MHz로 작동시켜 반응산물의  $^1H$ -NMR spectra를 얻었다.

**결과 및 고찰**

**효소의 정제 및 특성**

Hong 등(1986)이 기술한 것처럼 *T. koningii*에서 분비되는  $\beta$ -D-glucosidase는 Bio-gel P-150 chromatography에 의해 고분자량을 가진 것 (F-I)과 저분자량을 가진 것 (F-II)으로 쉽게 분리될 수 있다. DEAE-Sephadex A-50 chromatography를 적용하였을 때, 0.02 M 인산완충용액에서 F-I 부분이 부착되고, F-II 부분은 용출되기 때문에 F-I로부터 F-II 부분을 F-II-I으로 더욱 쉽게 분리할 수 있었다(Fig. 1). 이 F-II-I 부분을 수확하여 다시 SP-Sephadex C-50 chromatography에 적용한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 F-II-I-I 부분을 얻을 수 있었으며 단백질의 peak와 효소활성도의 peak가 일치하는 것으로 보아 순도를 어느정도 인정할 수 있었다. 그 순도를 확인하고 동시에 고순도의 효소를 얻기 위해 preparative polyacrylamide gel electrophoresis를 시행한 결과, Fig. 3A에서 보는 바와 같이 단일 band의 효소를 얻었으며 이 부분을 잘라 수확한 단백질의 양은 0.6 mg이었고 specific activity는 약 230 배 정도 증가하였다. 이 효소의 순도를 측정하기 위해 analytical isoelectric focusing을 수행한 결과, Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼, isoelectric point가 5.80인 단일 band를 볼 수 있었다. 이렇

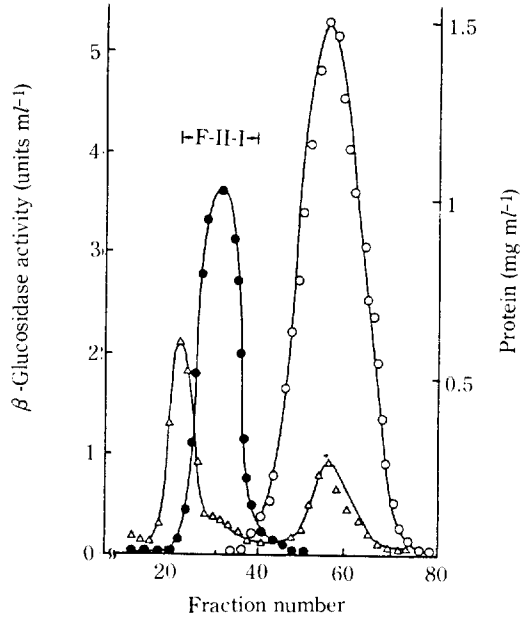


Fig. 1. Ion exchange chromatograph on DEAE-Sephadex A-50 of fraction F-II, described in Hong et al. (1986); column dimension, 2.5 x 50 cm; elution buffer, 0.02 M phosphate buffer (pH 6.9); each fraction volume, 4 ml;  $\Delta$ , protein concentration;  $\bullet$ ,  $\beta$ -D-glucosidase activity;  $\circ$ , CMC-ase activity.

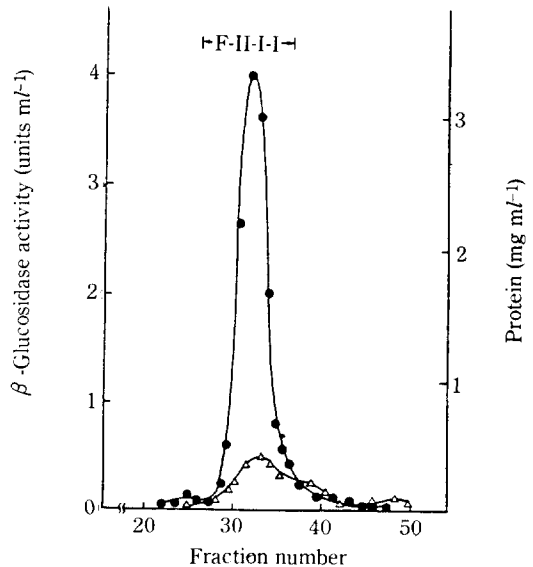


Fig. 2. Ion exchange chromatograph on SP-Sephadex C-50 of fraction F-II-I, described in Fig. 1; column dimension, 2.5 x 50 cm; elution buffer, 0.01 M acetate buffer (pH 5.0); each fraction volume, 4 ml;  $\Delta$ , protein concentration;  $\bullet$ ,  $\beta$ -D-glucosidase activity.

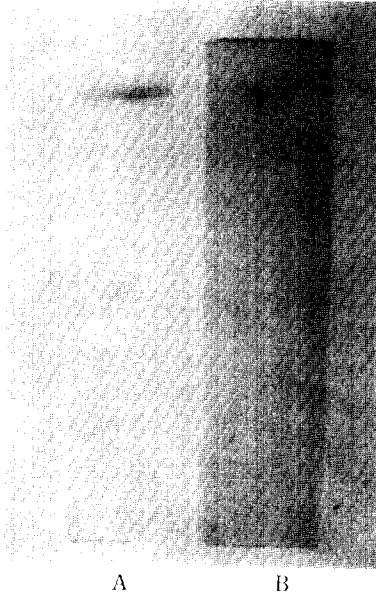


Fig. 3. Nondenaturing polyacrylamide gel electrophoretogram of  $\beta$ -D-glucosidase; 8% (W/V) of acrylamide was used.

A, protein stained by Coomassie Brilliant Blue R-250, B, protein stained by periodic acid and basic fuchsin.

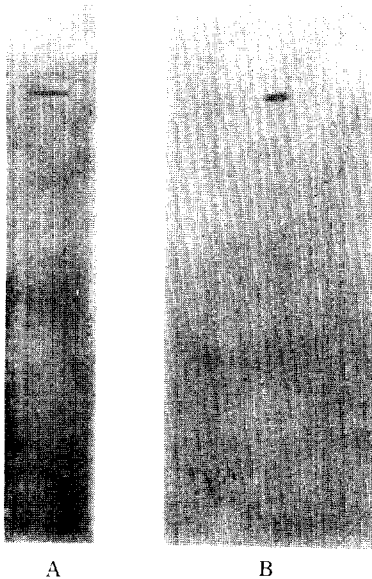


Fig. 4. Electrophoretogram of  $\beta$ -D-glucosidase by analytical isoelectric focusing using Pharmalyte (pH 4.0-6.5); 5% (W/V) of acrylamide was used.

A, protein stained by Coomassie Brilliant Blue R-250, B, active staining by esculin- $\text{FeCl}_3$ .

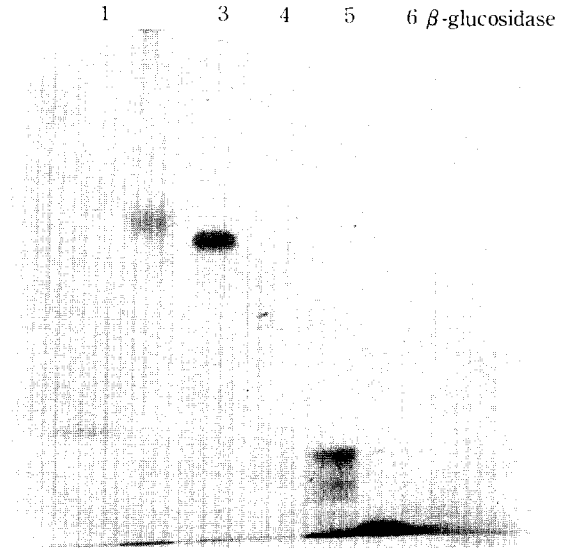


Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretogram of  $\beta$ -D-glucosidase; 10% (W/V) of acrylamide was used.

Molecular weight markers; 1, marker protein mixture of  $\beta$ -galactosidase (M.W. 116,000), phosphorylase (M.W. 97,400), and carbonic anhydrase (M.W. 29,000); 2, bovine serum albumin, dimer (M.W. 132,000); 3, bovine serum albumin, monomer (M.W. 66,000); 4, ovalbumin (M.W. 45,000); 5, trypsinogen (M.W. 24,000); 6,  $\alpha$ -lactoglobulin (M.W. 18,400).

게 얻어진 효소시료를 모든 실험에 사용하였다.

이 효소를 표준단백질과 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis에 적용시켜 본 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 단일 band를 제시하여 그 순도를 또한 입증하여 주었다. 이 결과를 분자량에 대해 mobility로 semi-logarithmic plot 해 본 결과, Fig. 6에서 보는 바와 같이 분자량이 78,000 정도인 것으로 추정되었다. Hong 등(1986)과 Maeng 등(1986)의 논문에서 지시하고 있듯이 본 효소가 변성되지 않은 형태로 있을 때, 그 분자량은 60,000에서 100,000 사이인 것으로 추정되기 때문에 본 효소는 분자량이 78,000인 단일 polypeptide로 이루어진 단백질로 생각된다. 한편, 이 값은 Wood와 McCrae (1982)가 gel permeation chromatography를 사용해 보고한 분자량 39,800과 대조를 이루고 있다.

본 효소 단백질 100  $\mu\text{g}$ 을 전기영동 후 periodic

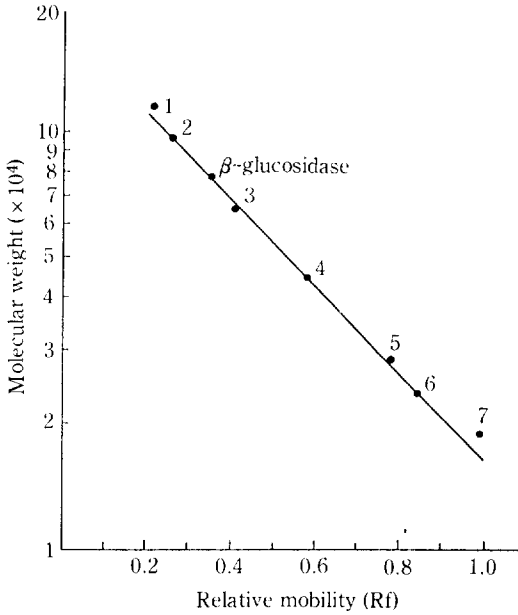


Fig. 6. Semilogarithmic plot of molecular weight versus relative electrophoretic mobility analyzed from electrophoretogram of Fig. 5.

Molecular weight markers; 1,  $\beta$ -galactosidase (M.W. 116,000); 2, phosphorylase (M.W. 97,400); 3, bovine serum albumin monomer (M.W. 66,000); 4, ovalbumin (M.W. 45,000); 5, carbonic anhydrase (M.W. 29,000); 6, trypsinogen (M.W. 24,000); 7,  $\beta$ -lactoglobulin (M.W. 18,400).

acid-fuchsin 염색법으로 염색해 본 결과, Fig. 3B에서 보는 바와 같이 당단백질이 나타내는 band를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Wood와 McCrae(1982)가 phenol sulfuric method를 사용하여 이 효소에 내재하는 당의 비율이 2%(w/w)라고 보고한 사실과 일치한다.

**Transglycosylation의 분석**

정제된  $\beta$ -D-glucosidase에 의한 cellobiose 분해산물을 HPLC를 이용하여 refractive index detector로 분석한 결과, Gusakov 등(1984)이 *Aspergillus foetidus*에서 분리한  $\beta$ -D-glucosidase의 경우와 유사한 양상이 관찰되었다. Fig. 7과 8에서 보는 바와 같이 반응시간이 30분 정도 지나서부터 trimer( $G_3^*$ )로 추정되는 peak가 측정되어 5시간 정도에 최대치를 보였으며, 15시간 정도 이후에는 dimer( $G_2^*$ )라고 추정되는 peak가 생성되었으며, 30시간이 지나면서  $G_3^*$ 의 peak가 사라지

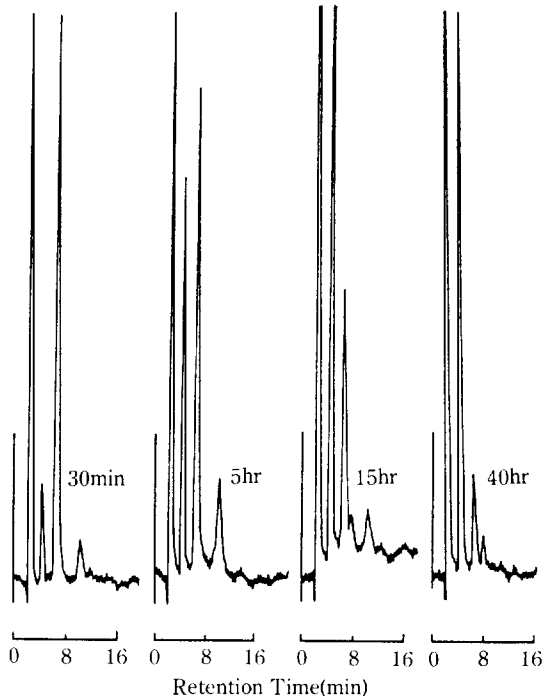


Fig. 7. High performance liquid chromatograms of reaction products after treatment of cellobiose with  $\beta$ -D-glucosidase for 0.5, 5, 15, and 40 hour, respectively.

Lichrosorb  $NH_2$  column and acetonitrile-water (80:20) as mobile phase were used. The flow rate was 1.5 ml/min. Enzyme concentration was  $4 \times 10^{-4}$  mM and enzymatic reaction was performed in 0.001 M acetate buffer (pH 4.5).

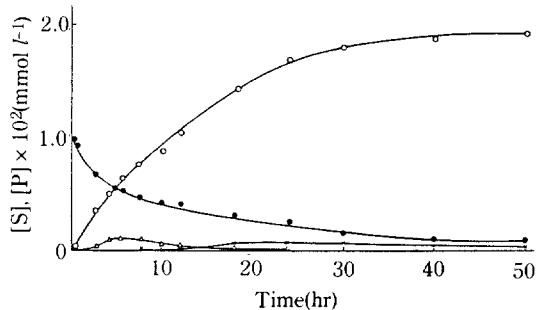


Fig. 8. Concentration changes of reaction products presented in Fig. 7: ●, cellobiose; ○, D-glucose; ×,  $G_2^*$ ; △,  $G_3^*$ .

는 것을 볼 수 있었다.

이상의 결과를 토대로 각 peak의 본성을 확인하기 위해 20시간째의 반응혼합물을 농축하여 Fig. 9와 같이 고압액체 크로마토그래피로 분리하고 각

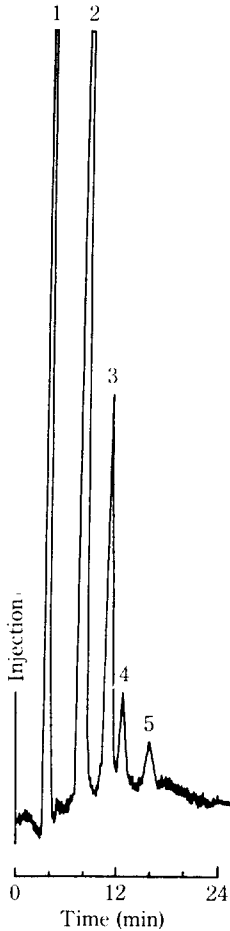


Fig. 9. High performance liquid chromatogram of reaction products.

20 hour-reaction mixture was concentrated with speed vac concentrator and fractionated through Lichrosorb NH<sub>2</sub> column. These fractions were applied to NMR spectroscopy. Initial reaction mixture consisted of 100 mM cellobiose and  $4 \times 10^{-4}$  mM enzyme in 0.001 M acetate buffer and reaction was performed at 40°C: 1, water; 2, D-glucose; 3, cellobiose; 4, G<sub>2</sub><sup>\*</sup>; and 5, G<sub>3</sub><sup>\*</sup>.

부분들의 <sup>1</sup>H-NMR spectra를 얻었다. Fig. 9의 peak 1과 2는 Maeng 등(1987)이 보고한 바와 같이 각각 물과 glucose이며, peak 3은 기질로 사용한 cellobiose이었다. Peak 3(G<sub>2</sub><sup>\*</sup>)와 4(G<sub>3</sub><sup>\*</sup>)의 <sup>1</sup>H-NMR spectra는 Fig. 10과 11에 제시되어 있다. G<sub>2</sub><sup>\*</sup>의 H-1<sub>α</sub><sup>1</sup>와 H-1<sub>β</sub><sup>1</sup>의 chemical shift는 각각 5.20 ppm과 4.63 ppm이었고, H-1<sub>β</sub><sup>2</sup>의 chemical shifts는 4.49 ppm과 4.47 ppm이었다.

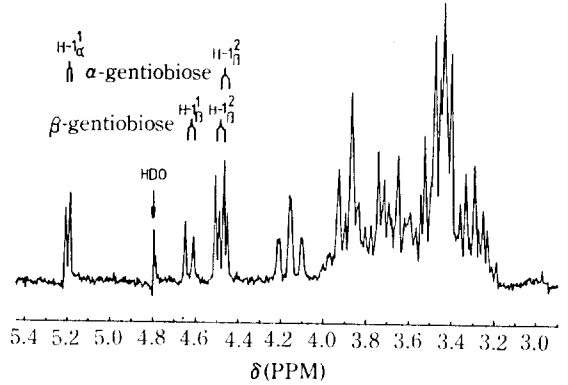


Fig. 10. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of G<sub>2</sub><sup>\*</sup> of Fig. 9.

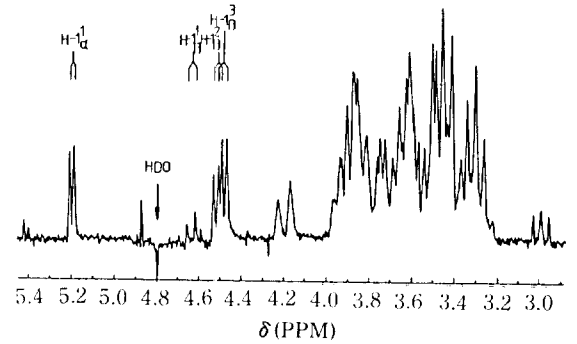


Fig. 11. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of G<sub>3</sub><sup>\*</sup> of Fig. 9.

Coupling constants의 경우는  $J(1_{\alpha}^1, 2^1)$ 과  $J(1_{\beta}^1, 2^1)$ 가 각각 3.7 Hz와 7.7 Hz이었으며,  $J(1_{\beta}^2, 2^2)$ 는 7.8 Hz와 7.9 Hz를 나타내었고, 그 외의 skeletal proton들의 resonances를 감안할 때 Bruyn 등(1975)과 Maeng 등(1987)이 보고한  $\alpha$ -gentiobiose와  $\beta$ -gentiobiose의 혼합물로 동정할 수 있었다. G<sub>3</sub><sup>\*</sup>의 대부분은 H-1<sub>α</sub><sup>1</sup>와 H-1<sub>β</sub><sup>1</sup>의 chemical shift는 5.20 ppm과 4.64 ppm이었고, H-1<sub>β</sub><sup>2</sup>는 4.51 ppm, H-1<sub>β</sub><sup>3</sup>는 4.49 ppm을 나타내었다. Coupling constants는  $J(1_{\alpha}^1, 2^1)$ ,  $J(1_{\beta}^1, 2^1)$ ,  $J(1_{\beta}^2, 2^2)$ ,  $J(1_{\beta}^3, 2^3)$ 가 각각 3.7 Hz, 7.9 Hz, 7.8 Hz, 7.8 Hz를 나타내었고, skeletal proton들의 resonances를 감안해 볼 때, Maeng 등(1987)이 보고한 바와 같이 cellotriose의  $\alpha$ -anomer와  $\beta$ -anomer의 혼합물로 추정되었다. 따라서,  $\beta$ -D-glucosidase가  $\beta$ -1,4-glycosidic linkage를 갖고 있는 cellobiose에 반응하였을 때 생성되는 transglycosylation 산물의 결합형태는

dimer의 경우는  $\beta$ -1,6-linkage를 가진 gentiobiose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,6)-D-glucopyranose]라고 생각되며, trimer의 경우는  $\beta$ -1,4-linkage를 가진 celotriose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,4)-D-glucopyranose]로 동정된다. 한편,  $G_3^*$ 의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum상에서 5.42ppm, 4.60ppm, 4.70ppm에서 작은 doublet들이 관찰되는 것으로 보아 sophorose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,2)-D-glucopyranose]의 존재를 생각할 수 있다. 이러한 사실은 Gusakov 등(1984)이 *A. foetidus*에서 분리되는  $\beta$ -D-glucosidase의 transglycosylation 산물중 dimer가 gentiobiose라고 추정된 사실과 일치하나, trimer가 isocelotriose라고 추정하였으나, 본 실험에서

는 그 존재를 찾아볼 수 없었다.

본 실험의 결과, *T. koningii*의  $\beta$ -D-glucosidase에 의해 촉매되는 transglycosylation 과정은 중간산물인 glycosyl-enzyme intermediate가 형성되고 이 중간산물에 결합되어 있는 D-glucose 잔기가 수용체로 작용하는 D-glucose 및 cellobiose 등에 전달되어 일어난다고 추정된다. 이때 생성되는 산물은 이상의 결과로 볼 때, 여러가지의 glycosidic linkages를 가질 수 있다고 생각되며, 이같은 결론은 Maeng 등(1987)이 *T. koningii*의 저분자 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohydrolase에서 오직  $\beta$ -1,4-linkage만이 관여한다고 보고한 사실과 비교해 볼 때, transglycosylation 반응에 있어 두 효소간에는 큰 차이를 보이고 있다.

## 적 요

*Trichoderma koningii* ATCC 26113에서 분리 정제한 저분자  $\beta$ -D-glucosidase( $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21)의 반응중에 나타나는 transglycosylation 양상을  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy를 이용하여 분석하였다. 본 효소는 암모늄 침전과 Bio-Gel P-150, DEAE-Sephadex A-50, SP-Sephadex C-50 등에 의한 원주크로마토그래피를 통해 분리되었고, 최종적으로 preparative polyacrylamide gel 전기영동에 의해 정제되었다. 본 효소의 분자량은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동의 결과, 78,000으로 계산되었고, isoelectric point는 analytical isoelectric focusing의 결과, 5.80으로 계산되었다. 본 효소를 cellobiose와 반응시킨 후, 반응산물을 고압액체 크로마토그래피로 분리한 후  $^1\text{H-NMR}$ -spectra를 얻어 H-1 proton resonance들을 분석하였을 때, 반응산물중에서 gentiobiose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,6)-D-glucopyranose]와 celotriose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,4)- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,4)-D-glucopyranose]가 다량으로 존재하는 사실이 확인되었고, 소량의 sophorose [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1,2)-D-glucopyranose]의 존재도 확인할 수 있었다.

## 사 사

본 논문은 서울대학교 대우학술연구비 (1988-1989)에 의해 수행되었다.

## REFERENCES

1. Bruyn, A.D., M. Anteunis, and G. Verhegge, 1975.  $^1\text{H-NMR}$  study of the di-glucopyranoses in  $\text{D}_2\text{O}$ . *Bull. Soc. Chim. Belg.* **84**, 721-734.
2. Davis, B.J., 1964. Disk electrophoresis: II. Method and application to human serum albumin proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427.
3. Gusakov, A.V., A.P. Sinitsyn, G.H. Goldsteins, and A.A. Kylosov, 1984. Kinetic and mathematical model of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by cellobiase. *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 275-282.
4. Hong, S.-W., Y.-C. Hah, P.-J. Maeng, and C.-S. Jeong, 1986. Purification and mode of action of low molecular weight  $\beta$ -1,4-glucan glucanohydrolase from *Trichoderma koningii*. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 227-235.
5. Kozlovskaya, L.N., N.A. Rodionova, and A.M. Bezborodov, 1981. Properties of  $\beta$ -glucosidase from the fungus *Geotrichum candidum* 3c. *Appl. Biochem. Microbiol.* **16**, 394-401.
6. Kwon, K.-S., 1988. Studies on the biosynthesis of  $\beta$ -glucosidase in *Aspergillus nidulans*.

Ph.D.-thesis, Seoul National University.

7. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
8. Maeng, P.-J., S.-O. Kang, C.-S. Jeong, S.-W. Hong, Y.-C. Hah, Y.-H. Rhee, and J.-H. Kim, 1987. <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic evidence on the glycosidic linkages of the transglycosylated products of low-molecular-weight 1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohydrolase from *Trichoderma koningii*. *Kor. Jour. Microbiol.* **25**, 304-308.
9. Wood, T.M. and S.I. McCrae, 1982. Purification and some properties of the extracellular  $\beta$ -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 2973-2982.

**(Received Feb. 8, 1989)**