

## Trichoderma koningii에서 분리한 $\beta$ -glucosidase의 작용양상

정춘수\* · 최지영 · 이현주<sup>1</sup> · 맹필재<sup>2</sup> · 한인섭 · 강사육<sup>1</sup> · 하영철<sup>1</sup>

울산대학교 생명과학부, <sup>1</sup>서울대학교 미생물학과, <sup>2</sup>충남대학교 미생물학과

*Trichoderma koningii* ATCC 26113에서 분리되는 효소인  $\beta$ -glucosidase를 cellobiose, sophorose, laminaribiose 및 gentiobiose 등의 기질과 반응시킨 후 효소의 transglycosylation 반응 산물을 분석하였다. 각각의 기질로부터 생성된 이당체(dimer)들을 HPLC로 분리하고 <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy를 통하여 분석하였다. Cellobiose를 기질로 사용하여 효소와 반응시켰을 때 그 산물에는 laminaribiose, sophorose 및 gentiobiose가 포함되어있음을 확인할 수 있었다. Laminaribiose, sophorose 및 gentiobiose를 기질로 사용하였을 경우에 효소는 transglycosylation 반응을 통하여 새로운  $\beta$ -glycosidic 결합을 갖는 이당체들을 생성하였다. 효소반응에 의하여 누적되는 이당체의 양은 생성속도보다는 분해속도에 의하여 결정되는 것으로 나타났다.

**Key words**  $\beta$ -glucosidase, *Trichoderma koningii*, transglycosylation

$\beta$ -glucosidase는 cellobiose와 celooligosaccharide에 작용하여 포도당을 생성하는 효소로서 많은 미생물에서 분리되어 연구되었다(1,6,9,17,19). 이 효소의 섬유소 분해에서의 기능은 cellulase들이 생성하는 cellobiose를 제거하여 산물에 의한 효소 저해를 제거하는 것으로 이해되고 있다(21,25). 일부의 수용성 다당류, cellobiose, acetyl cellobiose, thiocellobiose, gentiobiose, thiogentiobiose 및 sophorose 등은 많은 곰팡이의 cellulase 유도 물질로 알려져 있다(7,11,14,15,16,18,20,21). 이 중에서 두 분자의 포도당의  $\beta$ -1,2-결합으로 이루어진 sophorose는 *Trichoderma* 속에서 가장 강력한 유도물질로 보고되었다(14,16,20). 그러나 cellulose로부터 sophorose가 생성되는 방법에 대하여서는 정확히 알려지지 않았다. Vaheri등(22)은 cellulase와 cellulose를 반응시켜 sophorose가 생성됨을 보여주었으나, cellulase 복합체중 어느 성분이 이를 생성하는지는 보여주지 못했다. Gusakov등(5)은 *Aspergillus foetidus*에서 분리한  $\beta$ -glucosidase가 cellobiose로부터  $\beta$ -1,6 결합을 갖는 다당류를 분리 보고하였고, Watanabe 등(23)은  $\beta$ -1,6 결합을 갖는 삼당체(trimer)인 4-O- $\beta$ -gentiobiosylglucoside를  $\beta$ -glucosidase 산물로 보고하였다. 이외에도  $\beta$ -glucosidase의 transglycosylation에 대하여 많은 보고들이 있었으나, 그 산물이 정확히 분석되지는 않았다(1,8, 17,19,21,24).

본 논문에서는 *Trichoderma koningii*에서 분리된  $\beta$ -glucosidase와 4종류의  $\beta$ -linked 이당체(cellobiose, sophorose, laminaribiose, gentiobiose)를 반응시키고, 그 산물 중 이당체(dimer)를 HPLC와 <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy를 사용하여 분석함으로써 이 효소의 transglycosylation 반응을 정확히 이해하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약

Cellobiose, sophorose, laminaribiose, gentiobiose, p-nitrophenyl-D-glucoside(PNPG), 및 D<sub>2</sub>O는 Sigma Chem. Co.(St. Louis, USA)에서, acetonitrile은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였다.

#### 효소 활성 측정

효소반응은 500  $\mu$ l의 2 mM PNPG와 480  $\mu$ l의 50 mM 초산 완충용액(pH 5.0) 및 20  $\mu$ l의 효소용액을 섞은 후 30분 동안 40°C에서 반응시키고, 2 ml의 1 M sodium carbonate를 넣어 반응을 멈추었다. 10 ml의 증류수를 첨가한 후 A<sub>420</sub>에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성단위는 표준반응조건에서 1  $\mu$ mole PNP min<sup>-1</sup>를 생성하는 효소량으로 정하였다.

#### 효소의 분리

효소의 분리는 이미 보고한 바와 같이 gel-filtration, DEAE-Sephadex A-50, 전기영동에 의하여 이루어졌다(13). 먼저 *T. koningii* ATCC 26113 18 L를 배양한 후 Bio-Gel P-150, gel filtration(50 mM 초산 완충용액, pH 5.0, 2.5×100 cm)에 의하여 분리하였다. 저분자량  $\beta$ -glucosidase 부위를 농축한 후(PM 10 membrane; Amicon), 인산완충용액(pH 7.0, 20 mM)으로 교환하고 이를 DEAE-Sephadex A-50 column(2.5×50 cm)에 적하한 후 동일한 완충용액으로 용출하였다. 이를 농축한 후 분취 전기영동에 의하여 분리하였다. 분취 전기영동용 gel은 T=10%, C=2.7%인 평판 gel을 사용하였다. 전개 후  $\beta$ -glucosidase band는 esculine과 ferric chloride를 이용한 활성염색에 의하여 확인하였고(12), 효소는 gel을 분해하여 용출하였다. Esculine과 ferric chloride는 초산완충용액(50 mM, pH 5.0)에 투석하여 제

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

거하였다.

### HPLC에 의한 분석

Cellobiose, sophorose, laminaribiose 및 gentiobiose를 초산 완충용액(10 mM, pH 5.0), 40°C에서 효소와 반응시켰다. 적절한 시간 간격으로 시료를 채취하여 Gum과 Brown의 방법(4)에 따라 분석하였다.  $\text{NH}_2$ -column(Waters Associates)을 사용하였으며, acetonitrile 80%를 용매로 하여  $1.5 \text{ ml min}^{-1}$  속도로 용출하였고, RI 검출기(Waters R 401)를 이용하여 검출하였다.

### $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy

$^1\text{H-NMR}$  spectroscopy를 위하여 각각의 기질을 5 ml의 최종 부피로(100 mM 기질, 0.59 U 효소, 10 mM 초산완충용액, 40°C) 5-20 시간(cellobiose 20 hr, sophorose 5 hr, laminaribiose 5 hr, gentiobiose 16 hr) 반응시킨 후, 반응산물을 HPLC로 분리하였다. 분리된 시료는 rotary vacuum evaporator와 speed vac concentrator를 이용하여 농축한 후 다시 HPLC로 분리하였다. 분리된 시료를 speed vac concentrator를 이용하여 다시 농축한 후,  $\text{P}_2\text{O}_5$ 가 포함된 desiccator에서 2일 동안 진공 건조하였다. 이를  $\text{D}_2\text{O}$ (99.9 atom % deuterium)에 녹이고 건조하는 과정을 2회 실시하여 당의 proton을 deuterium으로 교환한 후 0.5 ml  $\text{D}_2\text{O}$ 에 녹였다. NMR 분석은 서울대학교 기초과학지원연구소에 의뢰하여 Bruker AMX 500(5 mm tube, 303 K)으로 분석하였다. 4 종류의 표준당의 chemical shift( $\delta$ )와 relative coupling constant ( $J_{1,2}$ ) 값은 다음과 같았다: cellobiose [ $\alpha$ -anomer;  $\text{C}_\alpha\text{-H-1}_\alpha^1$ , 5.23 ppm ( $J_{1,2}$ , 3.8 Hz);  $\text{C}_\alpha\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.52 ( $J_{1,2}$ , 7.9),  $\beta$ -anomer;  $\text{C}_\beta\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.67 ( $J_{1,2}$ , 8.0);  $\text{C}_\beta\text{-H-1}_\beta^2$ , 4.52 ( $J_{1,2}$ , 7.9)], sophorose [ $\alpha$ -anomer;  $\text{S}_\alpha\text{-H-1}_\alpha^1$ , 5.45 ( $J_{1,2}$ , 3.7);  $\text{S}_\alpha\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.64 ( $J_{1,2}$ , 8.0),  $\beta$ -anomer;  $\text{S}_\beta\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.80; ( $J_{1,2}$ , 8.0);  $\text{S}_\beta\text{-H-1}_\beta^2$ , 4.73 ( $J_{1,2}$ , 8.0)], laminaribiose [ $\alpha$ -anomer;  $\text{L}_\alpha\text{-H-1}_\alpha^1$ , 5.25 ( $J_{1,2}$ , 3.8);  $\text{L}_\alpha\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.72 ( $J_{1,2}$ , 8.0),  $\beta$ -anomer;  $\text{L}_\beta\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.74 ( $J_{1,2}$ , 8.0);  $\text{L}_\beta\text{-H-1}_\beta^2$ , 4.68 ( $J_{1,2}$ , 8.0)], gentiobiose [ $\alpha$ -anomer;  $\text{G}_\beta\text{-H-1}_\alpha^1$ , 5.24 ( $J_{1,2}$ , 3.8);  $\text{G}_\alpha\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.50,  $\beta$ -anomer;  $\text{G}_\beta\text{-H-1}_\beta^1$ , 4.67 ( $J_{1,2}$ , 8.0);  $\text{G}_\beta\text{-H-1}_\beta^2$ , 4.52 ( $J_{1,2}$ , 8.0)] (see Fig. 5). 이 값들은 Bryn등(4)이 보고한 것과 거의 일치하였다.

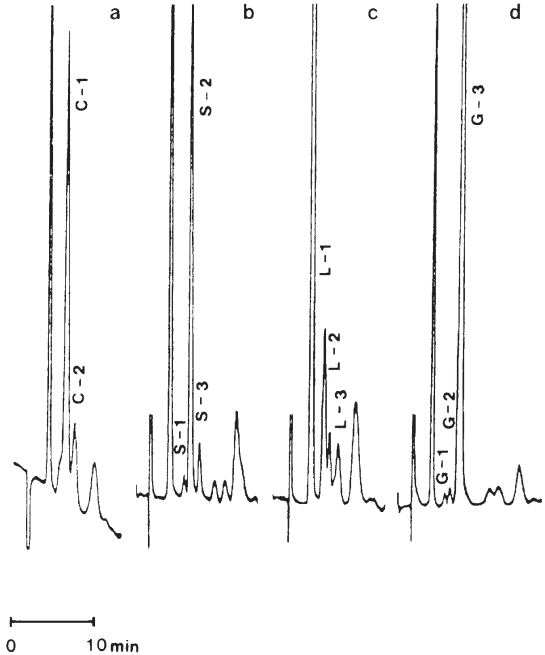
### 결과 및 고찰

#### 효소의 분리

18 l 배양액으로부터 40.8 units의 효소를 분리하였으며, SDS-PAGE 및 analytical isoelectric focusing gel에서 순수도를 확인하였다. 이 결과는 이미 보고한 바와 같다(13).

#### 이당체(dimer) 산물의 transglycosylation 분석

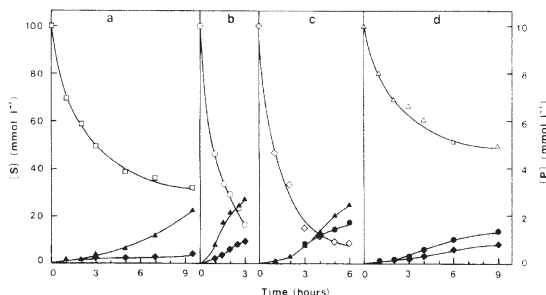
Cellobiose, sophorose, laminaribiose 및 gentiobiose를 기질로 사용하여  $\beta$ -glucosidase와 반응시킨 결과 가수분해산물과 transglycosylation 산물을 모두 검출할 수 있었다. Cellobiose 반응의 경우(Fig. 1a) 가수분해 산물인 포도당 외에 gentiobiose로



**Fig. 1.** HPLC analysis of reaction products formed by  $\beta$ -glucosidase from different substrates. Substrates and reaction time: (a) cellobiose; 7.0 hrs, (b) sophorose; 1.5 hrs, (c) laminaribiose; 5.0 hrs, (d) gentiobiose; 3.0 hrs. Reaction mixture: substrate (100 mM)+enzyme (0.59 units  $\text{ml}^{-1}$ ).

추정되는 peak(C-2로 표시)가 시간이 지남에 따라 증가하였다. Cellobiose 위치(C-1으로 표시) 앞에도 작은 peak가 나타났는데, 이는 laminaribiose로 추정되었지만 양이 너무 적어 분리하지 않았다. 분석에 사용한 HPLC 조건에서는 sophorose와 cellobiose가 겹치기 때문에 sophorose의 생성여부는 확인하지 못하였다. Fig. 1b에는 sophorose(S-2)를 기질로 사용하였을 경우 생성되는 산물을 나타내었는데, 적어도 2 종류의 새로운 이당체가 생성되었다(S-1, S-3). Laminaribiose(L-1)와 gentiobiose(G-3)의 경우에도 각각 2 종류의 새로운 이당체가 HPLC 상에서 분리되었고 이를 각각 L-2, L-3 및 G-1, G-2로 표시하였다(Fig. 1c와 1d). 모든 경우에서 1 종류 이상의 삼당체(trimer)가 검출되었는데, 이에 대한 분석은 행하지 않았다.

Fig. 2a, 2b 및 2c에 나타난 것처럼 gentiobiose라고 추정되는 peak(C-2, S-3 및 L-3)는 지속적으로 증가하였다. 다른 이당체들은 비교적 소량이 생성되었으며, 일정한 시간이 지난 후에는 그 양이 더 이상 증가하지 않았다. 포도당(100 mM)을 transglycosylation 반응의 수용체로 첨가한 경우에는 이당체들의 생성이 증가하였다. sophorose에 포도당을 첨가하여 반응시킨 결과 각각 laminaribiose와 gentiobiose로 추정되는 이당체, S-1과 S-3들이 반응 1 시간 후에는 유사한 양이 생성되었으나, 3시간 후에는 S-3의 생성량이 S-1에 비하여 현저히 많아졌다(Fig. 3a와 3b). Gentiobiose를 포도당이 포함된 상태에서 반응시킨 결과 반



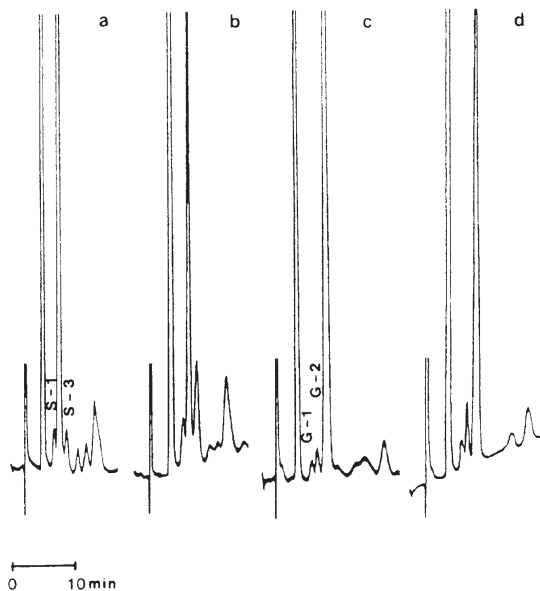
**Fig. 2.** Change of the concentration of reaction products formed by the action of  $\beta$ -glucosidase. Substrates: (a) cellobiose, (b) sophorose, (c) laminaribiose, (d) gentiobiose. Observed values: Substrates:  $\square$ ; cellobiose,  $\circ$ ; sophorose,  $\diamond$ ; laminaribiose,  $\triangle$ ; gentiobiose. Products:  $\bullet$ ; cellobiose and sophorose,  $\blacklozenge$ ; laminaribiose,  $\blacktriangle$ ; gentiobiose

용 초기에는 G-2가 G-1의 2배 정도 생성되었고, 반응이 지속됨에 따라 G-2의 양이 더욱 많이 누적되었다(Fig. 3c와 3d). G-2는 sophorose와 cellobiose의 혼합물로, G-1은 laminaribiose로 추정되었다. Wood와 McCrae(24)의 보고에 따르면 이 효소에 의한 laminaribiose와 sophorose의 분해속도가 cellobiose보다 빠르고, gentiobiose의 분해 속도가 가장 느리다. 본 실험의 결과는 이러한 분해속도의 차이와 관련된 것으로 사료된다. Fig. 2의 transglycosylation 산물인 이당체의 양은 그 생성속도에는 큰 차이가 없으나, 분해속도의 차이에 의하여 누적되는 양이 차이는 것으로 판단되었다.

### $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy에 의한 2당류 분석

Fig. 1에 나타난 바와 같이 laminaribiose, cellobiose, sophorose 및 gentiobiose를 기질로 사용하였을 경우 transglycosylation에 의하여 적어도 두 종류의 새로운 이당체가 생성되었는데, 이들은 retention time에 의하여 추정 가능하였지만 정확한 구조를 알기는 곤란하였다. 특히 cellobiose와 sophorose는 HPLC에 의하여 분리되지 않았기 때문에 확인할 수 없었다. 따라서 cellobiose 반응산물에서 C-1과 C-2, sophorose 산물에서 S-1, S-2 및 S-3, laminaribiose 산물에서 L-2 및 L-3, gentiobiose 산물에서 G-1 및 G-2들을  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy를 통하여 분석하였다.

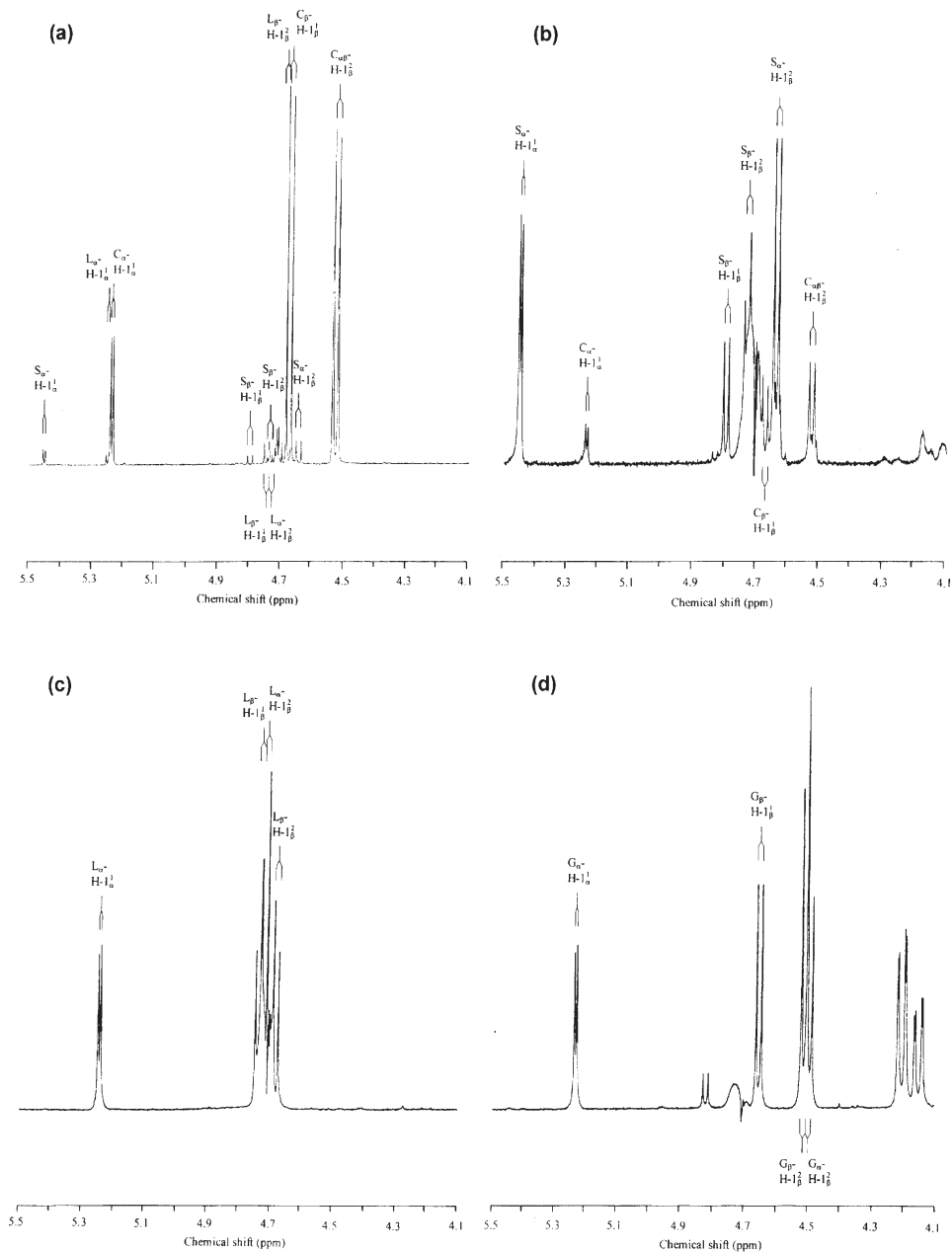
Fig. 4에 제시한 transglycosylation 반응산물의  $^1\text{H-NMR}$  spectra에 나타난 proton resonance signal(H-1 protons)들의 chemical shifts 값과 coupling constants 값을 표준당의 값과 비교하였다. Cellobiose에서 분리한 C-1(Fig. 4a)의 H-1 protons에서는 세개의 doublets가 각각 5.23( $J_{1,2}$  3.8 Hz), 4.67 및 4.52 ppm ( $J_{1,2}$  8.0 Hz)에 나타났다. 이는 각각  $C_{\alpha}\text{-H-1}_{\alpha}^1$ ,  $C_{\beta}\text{-H-1}_{\beta}^1$ , 및  $C_{\alpha\beta}\text{-H-1}_{\beta}^2$ 에 해당하였다. 한편 같은 그림에서 5.45, 4.64, 4.80 및 4.73 ppm에서 작은 doublet signal들이 나타났는데, 이는 각각  $S_{\alpha}\text{-H-1}_{\alpha}^1$ ,  $S_{\alpha}\text{-H-1}_{\beta}^2$ ,  $S_{\beta}\text{-H-1}_{\alpha}^1$  및  $S_{\beta}\text{-H-1}_{\beta}^2$ 와 일치하였으며, 5.25, 4.72, 4.74, 및 4.68 ppm에 나타난 doublet signal들은  $L_{\alpha}\text{-H-1}_{\alpha}^1$ ,  $L_{\alpha}\text{-H-1}_{\beta}^2$ ,  $L_{\beta}\text{-H-1}_{\alpha}^1$  및  $L_{\beta}\text{-H-1}_{\beta}^2$ 와 일치하였다. 이러한 결과로부터 C-1은 cellobiose에 미량의 sophorose와



**Fig. 3.** HPLC analysis of reaction products formed by  $\beta$ -glucosidase from sophorose and gentiobiose in the presence of glucose added as an acceptor. Substrates and reaction time: (a) sophorose; 1.0 hr, (b) sophorose; 5.0 hrs, (c) gentiobiose; 4.5 hrs, (d) gentiobiose; 24 hrs. Reaction mixture: substrate (100 mM)+glucose (100 mM)+enzyme (0.59 units  $\text{ml}^{-1}$ )

laminaribiose가 혼합된 것임을 알 수 있었다. 기질인 cellobiose만을 NMR로 분석하였을 때에는 cellobiose 이외의 당에 대한 signal들이 전혀 검출되지 않았기 때문에 이들 산물은 효소의 transglycosylation 반응에 의하여 생성된 것임을 확인할 수 있었다. Cellobiose 반응 산물 중 C-2에서는 4개의 doublet들이 5.24, 4.50, 4.67 및 4.52 ppm에서 나타나 gentiobiose임을 알 수 있었다. (이 결과는 Fig. 4d의 S-3의 spectrum과 일치하기 때문에 제시하지 않았다.). Laminaribiose에서 분리한 L-2는 cellobiose와 sophorose의 혼합물임을 확인하였고(Fig. 4b), sophorose와 gentiobiose에서 분리한 S-2 및 G-2는 L-2의 spectrum과 대단히 유사하였다. G-1(Fig. 4c)과 S-1은 laminaribiose로 동정되었고, S-3(Fig. 4d), L-3 및 C-2는 gentiobiose로 나타났다.

Cellobiose, acetyl cellobiose, thiocellobiose, gentiobiose, thio-gentiobiose, 및 sophorose는 다양한 곰팡이에서 cellulase 유도물질로 보고되었다(7,11,14,15,16,18,20,21). 이 중에서 포도당의  $\beta$ -1,2-결합 이당체인 sophorose는 *Trichoderma* 속에서 가장 강력한 유도물질로 알려져 있다(14,16,20). *T. reesei*의 extracellular  $\beta$ -glucosidase 돌연변이 균주는 cellulase를 생성하지 못하였고, sophorose를 첨가하면 cellulase 유도능이 회복됨이 보고되었다(3). 따라서  $\beta$ -glucosidase는 cellulose로부터 sophorose를 생성할 것이라는 가설이 가능하였다. 또한  $\beta$ -결합 이당체에 대한 permease는 sophorose에 대하여서도 작용함이 보고되었다(10). Gusakov등(5)은 *A. foetidus*에서 분리한  $\beta$ -glucosidase와 cello-



**Fig. 4.**  $^1\text{H}$ -NMR spectra of the glucose dimers formed by the action of  $\beta$ -glucosidase. Samples: (a) C-1 from cellobiose, (b) L-2 from laminaribiose, (c) G-1 from gentiobiose, (d) S-3 from sophorose

biose를 반응시킨 후 얻은 transglycosylation 산물을 HPLC로 분석하여 gentiobiose와 isocellotriose를 분리하였다. 이러한 결과로부터  $\beta$ -glucosidase에 의한 transglycosylation산물은  $\beta$ -1,6-glycosidic 결합을 갖는다고 보고하였다. 본 실험의 결과에 따르면  $\beta$ -1,6 결합 뿐 아니라  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,2 및  $\beta$ -1,3-glycosidic 결합이 transglycosylation에 의하여 생성됨이 확인되었다. Vaheřin

(22)은 *T. reesei*에서 분리한 cellulase와 cellulose를 반응시킨 후 분해 산물을 GC-MASS로 분석하여 sophorose, laminaribiose 및 gentiobiose가 생성됨을 보고한 바 있다. 그러나 이들은 cellulase 복합체를 사용함으로써 cellulase 성분들 중 어느 효소가 이들 산물을 생성하는지는 밝히지 못하였다. 다른 많은 연구를 통하여  $\beta$ -glucosidase의 transglycosylation 활성이 보고되었다.

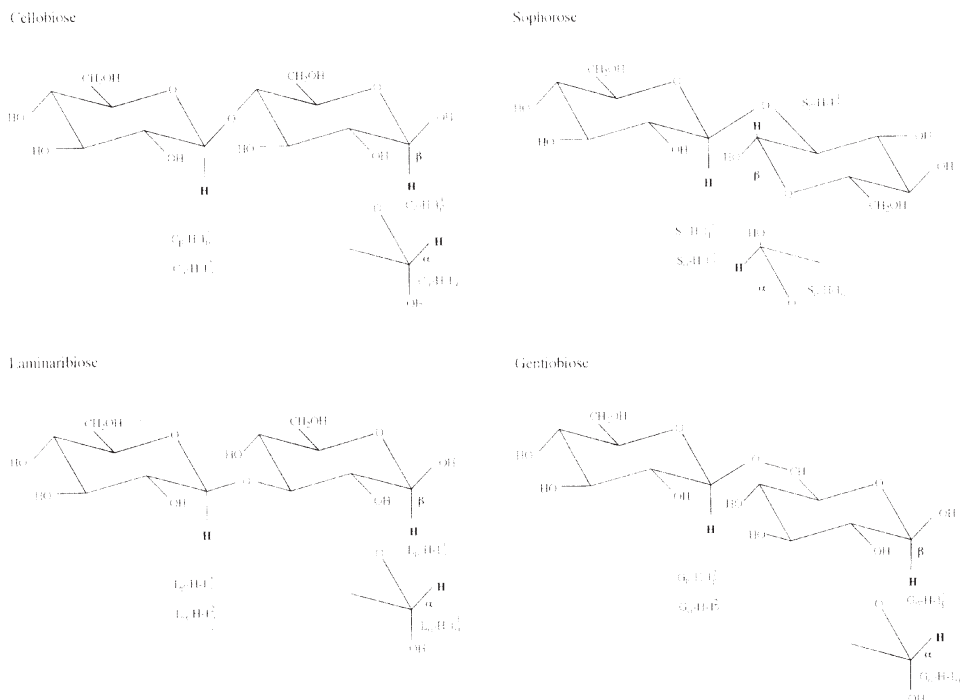


Fig. 5. The location of H-1 protons of cellobiose, sophorose, laminaribiose, and gentiobiose

Bhat 등(1)은 *Sporotrichum thermo-phil*에서 분리한  $\beta$ -glucosidase와 cellobiose의 반응산물을 chromatography로 분석하여 사당체(tetramer)가 생성됨을 보고하였다. Cellobiose와 *S. thermophile*에서 분리한  $\beta$ -glucosidase 반응산물을 TLC로 분석하여 미확인된 이당체와 삼당체들이 생성됨도 보고되었다(17). 이 외에도 많은 논문에서  $\beta$ -glucosidase의 transglucos-ylation 산물에 대한 보고가 있었으나 산물의 정확한 구조에 대하여서는 분명히 밝혀지지 않았다.

본 실험은 *T. koningii*에서 순수분리된  $\beta$ -glucosidase가 한 종류의  $\beta$ -linked 이당체에서 다른 종류의  $\beta$ -linked 이당체를 transglycosylation을 통하여 생성되며, 여기에는 sophorose가 포함되고 있음을 보여주고 있다.

### 감사의 글

본 연구는 울산대학교 이사장연구비에 의하여 수행되었습니다.

### 참고문헌

- Bhat, K. M., J. S. Gaikwad, and R. Maheshwari. 1993. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* and its influence on cellulase activity. *J. Gen. Microbiol.* 139, 2825-2832.
- Bryun, 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.
- Fowler, T., and R. D. Brown Jr. 1992. The *bgl1* gene encoding extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Mol. Microbiol.* 6, 3225-3235.
- Gum Jr., E. K., and R. D. Brown. 1977. Two alternative HPLC separation methods for reduced and normal cellobioligosaccharides. *Anal. Biochem.* 82, 372-375.
- Gusakov, A. V., A. P. Sinitsyn, G. H. Goldstein, and A. A. Klyosov. 1984. Kinetics and mathematical model of hydrolysis and transglycosylation catalyzed by cellobiase. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 227-235.
- Inglis, M., B. A. Feinberg, and J. R. Loewenberg. 1980. Partial purification and characterization of a new intracellular-glucosidase of *Trichoderma reesei*. *Biochem. J.* 185, 515-519.
- Kamagata, Y., M. Yachi, T. Kurasawa, M. Suto, H. Sasaki, S. Takao, and F. Tomita. 1991. Cellulase induction by cellobiose-octaacetate in *Penicillium purpurogenum*. *J. Ferment. Technol.* 72, 217-220.
- Kanfer, J. N., S. S. Raghaven, and R. A. Mumford. 1975. Hydrolytic and transglucosylation activities of a purified calf spleen beta-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta.* 391, 129-140.
- Kubicek, C. P. 1983.  $\beta$ -glucosidase excretion in *Trichoderma* strains with different cell wall bound  $\beta$ -1,3-glucanase activities. *Can. J. Microbiol.* 29, 163-169.
- Kubicek, C. P., R. Messner, F. Gruber, M. Mandels, and E. M. Kubicek-Pranz. 1993. Triggering of cellulase biosynthesis by cellulose in *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* 268, 19364-19368.
- Kurasawa, T., M. Yachi, M. Suto, Y. Kamagata, S. Takao, and F. Tomita. 1992. Induction of cellulase by gentiobiose and its sulfur-containing analog in *Penicillium purpurogenum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 106-110.

12. Kwon, K. S., J. Lee, H. G. Kang, and Y. C. Hah. 1994. Detection of  $\beta$ -glucosidase activity in polyacrylamide gels with esculin as substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4584-4586.
13. Lee, H. J., C. S. Jeong, S. O. Kang, and Y. C. Hah. 1989.  $^1\text{H-NMR}$  Spectroscopic evidence on the glycosylated products of low molecular weight  $\beta$ -D-glucosidase from *Trichoderma kiningii*. *Kor. J. Microbiol.* 27(1), 35-42.
14. Loewenberg, J. R. 1984. Sophorose induction of an intracellular  $\beta$ -glucosidase in *Trichoderma*. *Arch. Microbiol.* 137, 53-57.
15. Mandels, M., and E. T. Reese. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* 79, 816-826.
16. Mandels, M., F. W. Parrish, and E. T. Reese. 1962. Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*. *J. Bacteriol.* 83, 400-408.
17. Meyer, H. P., and G. Canevascini. 1981. Separation and some properties of two intracellular  $\beta$ -glucosidase of *Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 924-931.
18. Rho, D., M. Desrochers, L. Jurasek, H. Driguez, and J. Defaye. 1982. Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* 149, 47-53.
19. Schmid, G. and C. Wandrey. 1987. Purification and partial characterization of a cellodextrin glucohydrolase ( $\beta$ -glucosidase) from *Trichoderma reesei* strain QM 9414. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 571-585.
20. Stenberg, D., and G. R. Mandels. 1979. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.* 139, 1321-1326.
21. Stenberg, D. 1976. Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6, 35-53.
22. Vaheri, M., M. Leisola, and V. Kaupinnen. 1979. Transglycosylation products of cellulase system of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Lett.* 1, 41-47.
23. Watanabe T, T. Sato, S. Yoshioka, T. Koshijima, and M. Kuwahara, 1992. Purification and properties of *Aspergillus niger* beta-glucosidase. *Eur. J. Biochem.* 209(2), 651-659.
24. Wood, T. M. and S. I. McCrae. 1982. Purification and some properties of the extracellular  $\beta$ -glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microb.* 128, 2973-2982.
25. Woodward, J. and A. Weisman. 1982. Fungal and other  $\beta$ -D-glucosidase-their properties and application. *Enz. Microb. Technol.* 4, 73-79.

(Received January 7, 2000/Accepted February 11, 2000)

---

# ABSTRACT: The Action Mode of $\beta$ -glucosidase Purified from *Trichoderma koningii*

**Jeong, Choon-Soo, Ji-Young Choi, Heon-Ju Lee<sup>1</sup>, Pil-Jae Maeng<sup>2</sup>, In-Seob Han, Sa-Ouk Kang<sup>1</sup>, and Yung-Chil Hah<sup>1</sup>**(Department of Biological Science, College of Natural Sciences, University of Ulsan, Ulsan, 680-749, Korea, <sup>1</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul, Korea, <sup>2</sup>Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungnam National University, Taejeon, Korea)

We have examined the mode of transglycosylation, catalyzed by an extracellular  $\beta$ -glucosidase purified from *Trichoderma koningii* ATCC 26113, using cellobiose, sophorose, laminaribiose and gentiobiose as substrates. The dimers separated from the reaction mixture by HPLC were analyzed by  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopy. When cellobiose was subjected to the action of the  $\beta$ -glucosidase, the products included laminaribiose, sophorose and gentiobiose. When laminaribiose, sophorose or gentiobiose was used as a substrate, the  $\beta$ -glucosidase accumulated transglycosylation products possessing different types of  $\beta$ -glycosidic linkages from the original one. The amount of dimers accumulated as reaction proceeded seemed to be dependent on the velocity of hydrolysis but not on that of formation.