

## Trichoderma viride가 생산하는 Cellobiohydrolase의 분리 및 특성

오태광<sup>1\*</sup> · 박관화<sup>2</sup>

한국과학기술원 유전공학센터 <sup>2</sup>서울대학교 농과대학

### Purification and Characterization of Cellobiohydrolase from Trichoderma viride

Oh, Tae Kwang<sup>1\*</sup> and Kwan Hwa Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Genetic Engineering Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, P.O.Box 131,  
Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 440-744, Korea

Two isozymes of cellobiohydrolase and fifteen isozymes of endoglucanase from *Trichoderma viride* QM 9414 were purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-100 column chromatography, DEAE-Sephadex A-50 column chromatography and preparative electrophoresis. The purified cellobiohydrolase had a molecular weight of 71,000 estimated by electrophoresis and amino acid analysis showed its main amino acids to be in the form of aspartic acid and glutamic acid resulting from its low pI point of 3.81. The optimum pH and temperature were 5.1 and 50°C respectively.

지구상에 가장 많이 존재하는 섬유질자원을 식량, 화학약품, 및 에너지를 얻기 위한 많은 연구가 이루어졌지만 현재까지는 섬유소를 가용화 및 당화시키는 획기적인 방법을 찾지 못하고 있는 실정이다. *Trichoderma* sp. (1-5), *Cellulomonas* sp. (6) 그리고 *Clostridium* sp. (7, 8) 등의 미생물에 의해 분비되는 섬유소 분해효소는 1,4- $\beta$ -D-glucanoglucanohydrolase(endoglucanase, C<sub>x</sub>, EC. 3.2.1.2), 1,4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase(exoglucanase, C<sub>1</sub>, EC.3.2.1.91), 및  $\beta$ -glucosidase(cellobiase, EC.3.2.1.21) (9-11)의 복합효소로 구성되어 있을 아니라 섬유소 자체도 섬유소 분해효소의 작용을 받기 어려운 결정성 섬유소와 비교적 분해되기 쉬운 무정형 섬유소로 이루어져 있어 섬유소의 이용에는 많은 어려움이 있다. 초기 Reese 등(12)은 섬유소 분해효소중 C<sub>1</sub> 성분이 결정성이 높은 섬유소를 활성화시켜서 분해되기 쉬운 형태로 변하게 하는 작용을 한다는 가설을 세웠지만 Reese가 제시한 C<sub>1</sub> 성분과 같은 작용을 하는 성분을 분리하지 못하여 최근 다른 연구자들(13-15)에 의해 C<sub>1</sub> 성분은 결정성과 중합도가

높은 섬유소에 특이성이 높은 1,4- $\beta$ -D-glucancellobiohydrolase(이하, Cellobiohydrolase로 표기)임이 보고(16) 되었다. 섬유소 분해효소가 섬유소에 작용하는 일반적인 기작(17, 18)에 대해서는 무정형의 섬유소 부위에 endoglucanase가 작용하여 비활원성 말단기를 노출시키면 exoglucanase가 작용하여 결정성 부위를 공격하고, 이어서, endoglucanase와 exoglucanase의 공동작용에 의해서 cellobiose로 분해되면 최종적으로  $\beta$ -glucosidase의 작용을 받아서 glucose 단위까지 분해된다고 알려져 있다.

본 연구는 *Trichoderma viride*를 발효기에서 배양한 후 Sephadex G-100, DEAE-Sephadex column 및 preparative electrophoresis를 이용하여 cellobiohydrolase를 정제하여 효소학적 특성을 구명하고자 실시하였다.

#### 재료 및 방법

#### 재료

실험에 사용한 균주로는 US Army Natick

Key words: Cellobiohydrolase, purification and characterization, *Trichoderma viride*

\*Corresponding author

Research(Natick, USA)에서 분양받은 *Trichoderma viride* QM 9414를 사용하였고, 효소분리용 Sephadex G-100, DEAE-Sephadex는 Pharmacia(Sweden) 제품을 사용하였다.

### 섬유소 분해효소의 생산

Potato Dextrose Agar의 사면배지상에 보관된 군주를 Table 1에 나타난 액체배지에 접종하여 3일간 진탕배양한 것을 종균으로 사용하여 2.5l 용량의 jar fermentor(Marubishi사, Model MD-250, Japan)에 1% (v/v) 접종하고 28°C에서 초기 2일 동안은 100 rpm, 그 후는 150 rpm으로 교반하면서 통기량은 1.25 vvm이 되게 유지시키면서 배양하였다. 소포제로는 Neorin 202(한국 Polyol사)를 발효 초기에 총 용량의 0.02% (v/v)를 첨가하였다.

### 섬유소 분해효소의 정제

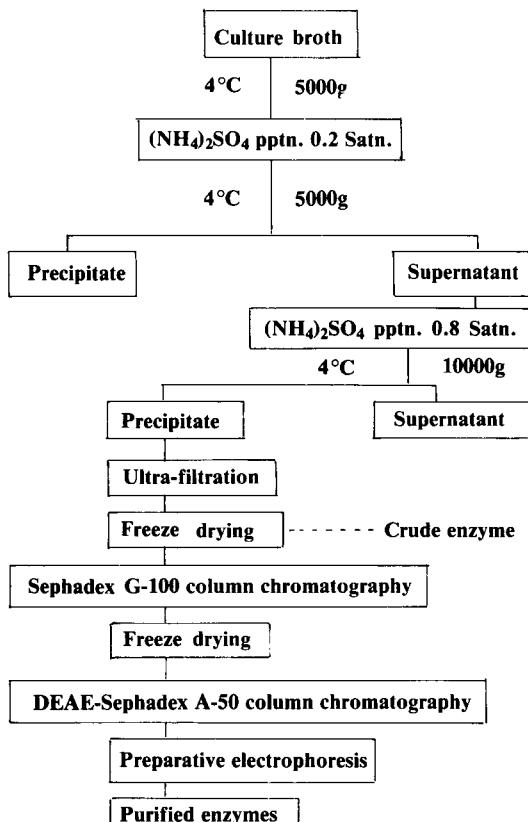
섬유소 분해효소의 정제는 Fig. 1에 나타난 과정과 같이 실시하였다. 발효가 끝난 배양액을 4°C, 5000g에서 원심분리하여 균사체 및 불용성 물질을 제거한 후 상清액을 취하여 배양효소액으로 사용하였다. 배양효소액에 황산암모늄을 20-80%로 포화시켜 침전물을 얻고 이 침전물을 25 mM citrate buffer(pH 4.8)에 녹인 다음 분자량 분별범위가 1000인 반투막을 이용하여 질소가스(3kg/cm<sup>2</sup>) 가압하에 한외여과장치로 탈염한 후 냉동건조하여 조효소로 사용하였다.

#### Sephadex G-100 column chromatography : 0.02%

**Table 1. Media composition for *Trichoderma viride* cultivation**

Ingredients	Final amount
10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> solution	14m/
1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> solution	15m/
10% Urea solution	3m/
10% CaCl <sub>2</sub> solution	3m/
10% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O solution	3m/
Proteose peptone	0.75g
-cellulose	7.5g
Tween 80	2m/
Trace element stock soln.*	1m/
Distilled water	1/

\* Trace elements stock soln.: 5m/conc. HCl, 2.5g FeSO<sub>4</sub>, 0.98g MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.83g ZnCl<sub>2</sub>, and 1.0g CoCl<sub>2</sub> in 495 ml water



**Fig. 1. Purification steps of cellulolytic enzymes**

Sodium azide가 포함된 25 mM citrate buffer(pH 4.8)에서 팽창시킨 Sephadex G-100 (particle size, 40~120 μ)을 100°C의 수조에서 1시간동안 활성화시킨 후 진공펌프로 공기를 제거시켜 24mmφ×1300mm의 유리관에 충진하였다. 조효소 120 mg을 25 mM citrate buffer(pH 4.8) 30 ml에 녹여서 관상단에 가하고 10cm의 수압하에서 20분에 10 ml/씩 분획 채취하였다. 효소활성 분획물은 냉동건조하여 다음 단계에 사용하였다.

**DEAE-Sephadex A-50 column chromatography :** Sephadex G-100 column에서 얻은 효소활성 분획물 300mg을 25 mM citrate buffer(pH 5.3)에 녹인 다음 미리 25 mM citrate buffer(pH 5.3)로 평형시켜둔 DEAE-Sephadex column(2, 5mmφ×350mm)에 가하여 10 ml/20 min의 유속으로 5 ml/씩 분획 채취하였다. 이때, 흡착된 단백질은 NaCl 농도 0-1 M 사이의 linear gradient을 걸어서 분리하였다. 분리된 활성분획물을 탈염, 농축하여 냉동건조 시켰다.

**Preparative electrophoresis :** David's 방법(19)에 의해서 polyacrylamide 7.5% gel을 만들고 30cm×15cm 크기의 유리판 위에 gel의 두께를 2mm로 하여 Separating gel을 12cm, Stacking gel을 2cm 되게 만들었다. DEAE-Sephadex column에서 분리한 단백질 3mg을 가하고 4mA/cm의 전류로 tracking dye가 양극(+)에 도달할 때까지 전기영동하였다. 전기영동 후 한쪽 끝에서 0.5cm×15cm의 크기로 gel을 도려내어 Blakesley 방법(20)에 의해서 급속히 단백질을 염색한 후 염색된 단백질과 동일한 위치의 gel을 잘라서 0.1M Citrate buffer(pH 4.8)로 추출하여 효소단백질을 분리하였다.

#### 분리된 cellobiohydrolase의 특성

**분자량 결정 :** 효소의 분자량은 단백질을 변성시키지 않고 전기영동에 의해서 측정하는 Firgaira 방법(20)에 준하여 실시하였고 표준단백질로는 분자량 14,200에서 480,000 dalton에 이르는 7개 단백질(Sigma사)을 사용하였다. 분자량 계산은 전기영동 후 tracking dye가 움직인 거리에 대한 시료의 이동거리를 백분율로 Rf치의 대수값과 분자량의 대수값을 이용하여 표준곡선을 구하여 측정하였다.

**등전점 결정 :** 효소단백질의 등전점은 Rodola 방법(21)에 의해서 isoelectric focusing을 행하여 구하였다. Carrier pharmalyte(Pharmacia사)는 pH 3-10 범위를 사용하였고, 양극에는 0.1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>용액, 음극에는 0.1M NaOH 용액을 채우고 tube(0.5mmφ×110mm)당 50 volt의 전류로 8시간동안 행하였다. 표준단백질로는 등전점이 3.55인 amyloglucosidase와 9.30인 trypsinogen 등 8개의 단백질을 사용하였으며 등전점 계산은 양극에서 전개된 거리와 등전점과의 관계를 이용하여 구하였다.

**효소의 아미노산 조성 :** 효소의 아미노산 조성은 amino acid analyzer(Biotronik LC 5000)을 이용하여 분석하였다.

**효소활성 측정 :** 효소 역가는 Mandels 방법(22)에 준하여 측정하였다. Endoglucanase(CMCCase)의 역가는 25mM citrate buffer(pH 4.8)에 녹인 1% carboxymethyl cellulose salt 용액 0.5ml에 희석된 효소액 0.5ml을 가하고 50°C의 항온수조에서 20분간 반응시킨 후 3ml의 DNS 용액(22)을 가하여 효소반응을 중지시킨 다음 환원당을 정량하여 측정하였다. Exoglucanase(FPase) 역가는 25mM citrate buffer(pH 4.8)에 1×6cm 크기의 여지

(Whatman No. 1, 50 mg)을 기질로 넣고 여기에 효소액 0.5ml을 가하여 50°C의 항온수조에서 40분간 반응시킨 후 3ml의 DNS 용액으로 효소반응을 중지시킨 다음 환원당을 정량하여 측정하였다. 효소 역가의 단위는 1분간에 1μmol의 glucose에 상당하는 환원당을 생산하는 효소의 양을 1단위로 표시하였다.

#### 단백질 및 환원당 정량

단백질은 Folin-Lowry 방법(23)으로 정량하였고 표준단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였으며 환원당은 Miller 방법(24)에 의해서 DNS 방법으로 정량하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 섬유소 분해효소의 생산

*Trichoderma viride* QM 9414를 jar fermentor에 접종하여 발효기간별로 pH, 환원당, 단백질 및 섬유소 분해효소 활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 발효 6일 이후에는 pH가 4.0 이하로 급격히 감소하는 반면 CMCase와 FPase의 활성은 급격히 증가하는 양상을 보였고 CMCase는 발효 7~8일 사이에 0.82 IU/ml, FPase는 발효 11일에 0.54 IU/ml로 최대치를 나타내었다. 상기결과는 Ryu(13) 등의 결과와 대체로 비슷하였다. 본 실험에서는 cellobiohydrolase의 생산이 목적이기 때문에 발효 11일에 수확하였다.

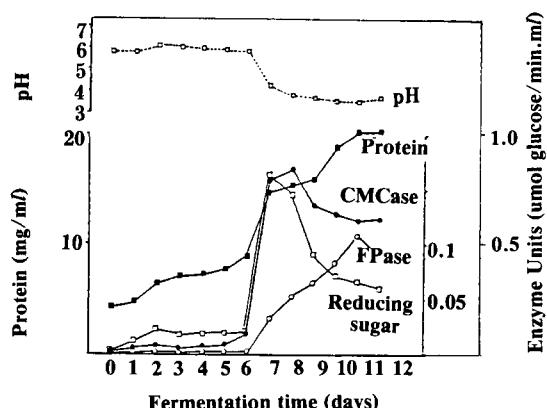


Fig. 2. Production of cellobiohydrolase during the culture of *Trichoderma viride* with  $\alpha$ -cellulose in 2.5/l jar fermentor

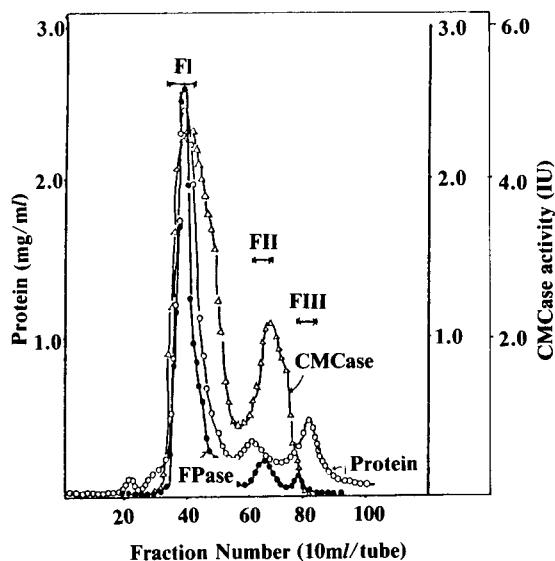


Fig. 3. Sephadex G-100 gel chromatograms of ammonium sulfate precipitated fraction of cellulase

#### 섬유소 분해효소의 정제

발효액을 황산암모늄으로 20~80% 포화농도에서 분획시킨 후 탈염 및 냉동건조한 조효소를 Sephadex G-100 Column에 가하고 분획한 결과 Fig. 3과 같은 4개의 단백질 peak을 얻었다.

분획구 20번 부근은  $\beta$ -glucosidase의 활성을 가지는 반면, 나머지 3개의 peak에서는 CMCase와 FPase 활성을 보여서 Fl(35~43 분획), FII(61~70 분획) 및 FIII(75~80 분획)라 각각 명명하고 각 분획구의 FPase와 CMCase의 활성을 측정한 결과를 Table 2에 요약하였다.

Fl 분획은 CMCase와 FPase의 절대적 활성이 높을 뿐만 아니라 CMCase에 대한 FPase 역가가 상대적으로 높아서 고분자 섬유소에 특이성이 큰 cellobiohydrolase가 존재할 것이라 판단되어 농축하여 DEAE-Sephadex column으로 더 정제하였다 (Fig. 4). Chromatography 결과 흡착된 부위(NaCl gradient 분획)에서는 전혀 효소의 역가를 나타내지

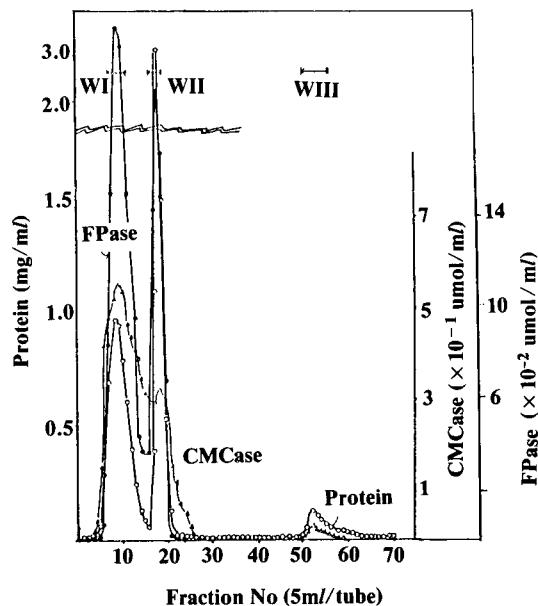


Fig. 4. DEAE Sephadex gel chromatograms of Fl fraction from Sephadex G-100 gel chromatography

않았고 비흡착 부위에서 3개의 단백질 peak를 분리 할 수 있어서 각기 WI(7-12 분획), WI(16-19 분획) 및 WIII(50-58 분획)이라 명명하였다. WII 분획은 Fig. 4에서와 같이 다른 분획구에 비해서 FPase의 활성이 높게 나서 cellobiohydrolase가 포함될 가능성이 큰 것으로 추측된다. Column chromatography에서 분리된 FII, FIII, WI, WII 및 WIII의 분획구를 탈염농축하여 preparative electrophoresis를 행하여 단백질을 분리한 결과는 Fig. 5에서와 같다. 각기 분리된 peak의 CMCase와 FPase의 활성은 Table 3에 나타나 있다. WI-1과 WII-2 분획은 CMCase에 대한 FPase의 활성이 각기 0.651 및 1.207로 나타나서 고분자 섬유소에 특이성이 높은 cellobiohydrolase로 추정되지만, 특히, FPase에 특이적인 효소인 WII-2 분획을 cellobiohydrolase라 확정 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Wood(14), Nummi 등(25)이 분리한 cellobiohydrolase와 비슷한 종류의 효소임을 알 수 있었다. 이로서, *Trichoderma viride*의 배양액으로부터 2개의 cellobiohydrolase(FPase)와 15개의 endoglucanase(CMCase)의 아이조자임을 분리 할 수 있었다.

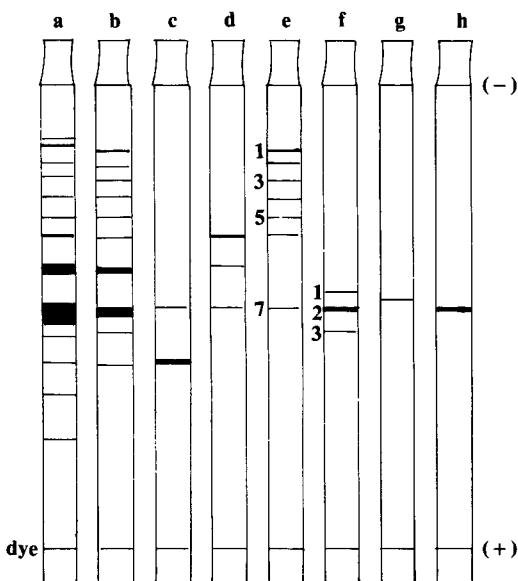
#### 분리된 cellobiohydrolase의 특성

작용최적 조건: 분리한 cellobiohydrolase(WII-2)를 온도와 pH를 달리하여 FPase의 역가를 측정한 결과, Fig. 6에 나타난 바와 같이 최적온도는 50°C,

Table 2. Relative cellulase activities of three fractions separated from Sephadex G-100 column chromatography

Unit: IU/ml

Enzyme Fractions	CMCase	FPase	FPase/CMCase
Fl	4.67	3.62	0.775
FII	2.13	0.24	0.113
FIII	0.40	0.13	0.325



**Fig. 5. Electrophoretograms of crude cellulase (a), FI(b), FII(c), FIII(d), WI(e), WII(f), WIII(g), and purified cellobiohydrolase(h) from preparative electrophoresis**

최적 pH는 5.1이었으며 55°C 이상의 온도와 산성 pH에서는 효소역가가 심하게 감소함을 알 수 있었다.

**분자량 결정 :** Cellobiohydrolase의 분자량을 결정하기 위하여 분자량을 알고 있는 표준 단백질과 분리한 cellobiohydrolase로 전기영동한 결과는 Fig. 7

**Table 3. Relative cellulase activities of each fractions separated from WI, WII and WIII by preparative electrophoresis**

Unit; IU/ml

Enzyme Fractions	CMCase	FPase	FPase/CMCase
WI-1	0.103	0.158	0.651
2	4.877	0.512	0.105
3	5.665	1.409	0.249
4	5.173	0.453	0.087
5	7.469	2.335	0.313
6	7.577	3.114	0.411
7	8.277	1.580	0.182
8	4.887	0.246	0.050
WII-1	4.454	2.365	0.531
2	3.675	4.434	1.207
3	1.892	0.424	0.224
WIII	1.636	0.453	0.278

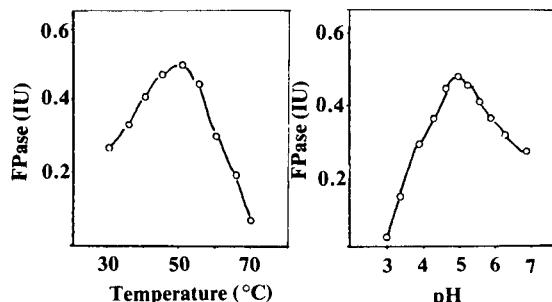
**Table 4. Amino acid composition of the cellobiohydrolase**

Unit: mg/100mg protein

Amino acid	Quantities
Lysine	0.23
Histidine	0.47
Arginine	0.26
Aspartic acid/Asparagine	0.89
Threonine	0.79
Serine	0.72
Glutamic acid/Glutamine	0.77
Proline	0.09
Glycine	0.65
Alanine	0.48
Valine	0.34
Methionine	0.11
Isoleucine	0.17
Leucine	0.42
Tyrosine	0.44
Phenylalanine	0.30
Total	7.13

과 같다. 표준곡선으로부터 cellobiohydrolase의 분자량은 71,000임을 알 수 있었다. Wood(18)와 Pettersson(26)은 *Trichoderma* sp.에서 분자량이 62,000과 42,000인 cellobiohydrolase를 분리한 바가 있다.

**등전점 및 아미노산 조성 :** 등전점이 알려진 8개의 표준단백질과 분리한 cellobiohydrolase를 isoelectric focusing하여 표준곡선을 작성하고, 이 표준곡선으로부터 본 실험에서 분리한 cellobiohydrolase는 등전점 o' 3.81임을 알 수 있었다. 또한, cellobiohydrolase의 아미노산조성은 Table 4에서 보는 바와 같이 주로 aspartic acid(asparagine), threonine, serine,



**Fig. 6. Temperature- and pH- activity curves of the cellobiohydrolase**

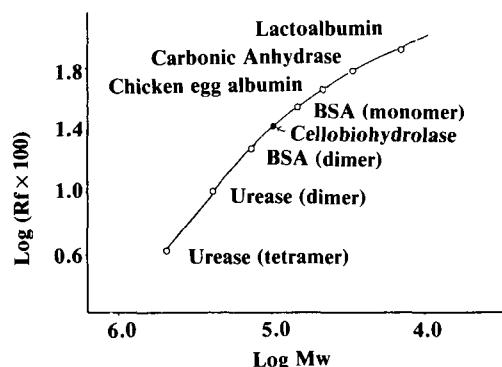


Fig. 7. Plot of electrophoretic migration of standard protein and cellobiohydrolase against molecular weights

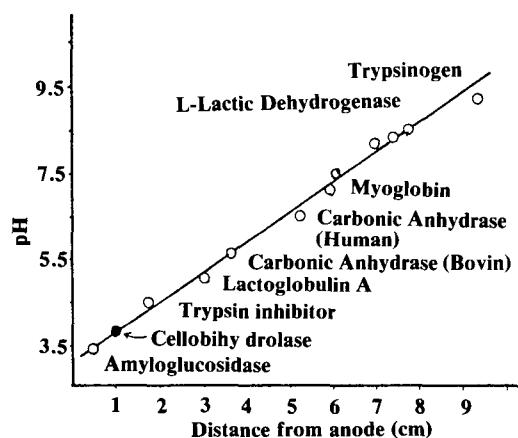


Fig. 8. Determination of pI of the cellobiohydrolase by isoelectric focusing with standard proteins

glutamic acid(glutamine)으로 구성되어 있으며, 등전점이 산성을 나타내는 것으로 보아 aspartic acid(asparagine)와 glutamic acid(glutamine)는 주로 aspartic acid와 glutamic acid 형태로 존재할 것으로 추측된다. Pettersson 등(26)과 Wood 등(18)이 분리한 cellobiohydrolase의 등전점은 3.79로, 본 실험 결과와 상당히 유사했다. 하지만, 아미노산의 조성에 대한 결과는 Håkansson 등(27)이 조사한 아미노산 조성과는 상당히 다른 결과를 나타내었다.

## 요약

*Trichoderma viride*가 분비하는 섬유소 분해효소를 황산암모늄침전, Sephadex G-100 및 DEAE Sephadex column을 통과시켜서 5개의 섬유소 분해아이조자임을 분리하였으며 전기영동 방법에 의해서 2개의 cellobiohydrolase와 15개의 endoglucanase로

분리하였다. 분리된 cellobiohydrolase는 분자량이 71,000, 최적 pH 5.1, 최적온도 50°C, pI가 3.81이며 주종아미노산은 aspartic acid, glutamic acid, threonine, serine 및 glycine이었다.

## 참고문헌

- Khan, A.W., Meek, E., and Henschel, J.R.: *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 465 (1985).
- Kumakura, M., Tamada, M., and Kaetsu, I.: *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 411 (1984).
- Grous, W., Converse, A., Grethelein, H. and Lynd, L.: *Biotech. Bioeng.*, **27**, 463 (1985)
- Duff, S.J.B.: *Biotechnol. Lett.*, **7**(3), 185 (1985)
- Reese, E.T. and Ryu, D.Y.: *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 239 (1980)
- Gray, P.P. and Dunn, N.W.: in Abstr. 2nd Int. Symp. Bioconv. Biochem. Eng., Delhi, India (1980).
- Cooney, C.L., Wang, D.I.C., Wang, S.D., Gorden, J., and Jiminez, M.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8**, 103 (1978)
- Na, T.K., Ben, B.A., and Zeikus, J.G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1337 (1981)
- Halliwell, G. and Vincen, R.: *Biochem. J.*, **199**, 409 (1981)
- Laewenberg, J.R., and Chapman, C.W.: *Arch. Microbiol.*, **113**, 61 (1977)
- Holber, H.: *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 178 (1976)
- Reese, E.T., Siu, R.G.H., and Lelinson, H.S.J.: *J. Bacteriol.*, **59**, 485 (1950)
- Ryu, D.D.Y., and Mandels, M.: *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 91 (1980)
- Wood, T.M., and McCrae, S.I.: *Biochem. J.*, **171**, 61 (1978)
- Petterson, N.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 997 (1979)
- Bisaria, V.S., and Ghose, T.K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 90 (1981)
- Ladish, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., and Tsao, G.I.: *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 82 (1983)
- Wood T.M., and McCrae, S.I.: *Carbohydr. Res.*, **57**, 117 (1977)
- Davids, B.J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- Firgaira, F.A., Cotton, R.G.H., and Danks, D.H.: *Biochem. J.*, **197**, 31 (1981)
- Rodola, B.: *Electrophoresis*, **1**, 43 (1980)
- Mandels, M.: in *Laboratory procedures in Growth*,
- Enzyme measurement and Related Analytical procedure, Int. Course-Cum-Symp., New Delhi, India (1977).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and

- Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 256 (1956).
24. Miller, G.L.: *Analytical Chem.*, **13**, 426 (1959).
25. Nummi, M., Niku-Paavola, M.-L., Envari, T.-H. and Raunio, V.: *Analytical Biochemistry*, **116**, 137 (1981).
26. Pettersson, L.G.: in Proc. Symp. Enz. Hydrol. Cel-
- lulose, Anlanko, Finland, 225 (1975).
27. Håkansson, ULE, Lars, G., Fagerstan, L., Pettersson, G. and Andersson, L.: *Biochem. J.*, **179**, 141 (1971).

(Received April 13, 1988)