

## (S6-B)

### *Penicillium verruculosum*으로부터 Cellobiohydrolase의 정제 및 특성

조 남 철<sup>1</sup>, 김 강 화<sup>2</sup>, 전 순 배<sup>3</sup>, 정 기 철<sup>4</sup>

<sup>1</sup>동신전문대학 식품영양과, <sup>2</sup>전남대학교  
식품영양학과, <sup>3</sup>미생물학과, <sup>4</sup>낙농학과

#### 초 록

*Penicillium verruculosum* 배양액으로부터 소단위체 분자량이 60,000(cellobiohydrolase I)과 66,000(cellobiohydrolase II) 및 76,000(cellobiohydrolase III)인 cellobiohydrolase를 분리 정제하여 그들의 일반적 특성을 검토하였다. 이들 세 효소들은 모두 당단백질로서 cellobiohydrolase I, II 그리고 III는 각각 8.6%, 4.2% 그리고 8.5%의 당함량을 나타냈으며 세 효소 모두 pH 4.5 - 5.0, 온도 50 - 60 °C에서 최적조건을 나타냈다. Cellobiohydrolase I, II 및 III는 모두 Avicel, cotton, 여지 등의 결정성 섬유소 뿐만 아니라 carboxymethylcellulose에도 활성도를 나타냈다. 정제된 cellobiohydrolase I, II 및 III의 Avicel에 대한 비활성도는 각각 0.07, 0.10, 그리고 0.07 unit per mg. of protein 이었으며 Avicel 분해 생성물은 거의 cellobiose였다. 또한 p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobioside를 기질로 하였을 때 이들 세 효소 모두 포도당에 의해 활성도가 저해되지 않은 반면 cellobiose에 의해서는 저해되었다.

아미노산조성, 트립신에 의한 펩타이드들의 용출양상 그리고 항체를 이용한 Immunoblotting 결과로부터 cellobiohydrolase II와 III는 동일 유전자산물이거나 1차 구조가 거의 유사한 단백질로 추정된다. Cellobiohydrolase II로부터 분리한 2 개의 펩타이드의 아미노산 서열은 *Trichoderma* cellobiohydrolase I과 상동성을 보였으며 또한 이 두 효소의 아미노산조성은 매우 유사하였다.

#### 서 론

Exoglucanase, cellobiohydrolase(CBH), 혹은 Avicelase로 불리우는  $\beta$ -glucan cellobiohydrolase(E.C.3.2.1.91)는 섬유소 말단으로부터 cellobiose 단위로  $\beta$ (1-4)글리코시드 결합을 가수분해하는 효소로서 천연

섬유소 분해에 있어서 endocellulase( $\beta$ -glucan glucanohydrolase) 및  $\beta$ -glucosidase와 함께 필수적이며 주로 *Trichoderma reesei*(*T. reesei*)의 효소계에 대하여 연구되어 왔다(Collmer and Wilson, 1983; Shoemaker et. al., 1983). 최근 Chung 등(1982)에 의해 자연계로부터 분리된 *Penicillium verruculosum* (*P. verruculosum*)은 섬유소분해효소 생성에 있어서 천연섬유소 분해능력이 매우 우수할 뿐만 아니라 특히 섬유소분해산물을 포도당으로 전환시키는데 필요한  $\beta$ -glucosidase의 활성도 또한 다른 균주에 비해 높아 섬유소자원 이용에 보다 적합한 균주로 제안되었으며 이 균주에 대한 효소생산 유도물질의 효과, 배지조성의 개량, 효소 생산성이 높은 변이주의 개발 등 지속적인 연구는 진행되어 왔으나(Chung et. al., 1988) 이 균주의 섬유소분해효소 복합체의 개별성분에 대한 분리 정제 및 효소특성에 관한 연구는 이루어지지 않았다. 본 실험실에서는 탄소원에 따라 *P. verruculosum*의 배양액에 다른 종류의 CBH가 생성됨을 관찰하였는 바, cellobiose octaacetate (COA)와 KC-flock을 각각 함유한 배지에서 *P. verruculosum*을 배양하여 그 배양상등액 중에 생성된 세 종류의 CBH를 분리 정제하고 그들의 일반적 성질을 관찰하였다.

## 재 료 및 방 법

### 효소의 정제

유일한 탄소원으로서 COA 혹은 KC-flock을 포함하는 배지에서 *P. verruculosum*을 배양한 배양상등액으로부터  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  침전법을 이용하여 배양상등액으로부터 얻은 조단백질을 DEAE-sephadex ion exchange chromatography 및 HPLC용 DEAE-5PW column, Phenyl-5 PW column, gel column chromatography를 이용하여 정제하였다.

### 효소활성도 측정

CBH의 Avicel 분해활성도는 Avicel을 2% 함유한 0.1 M 초산나트륨 완충용액(pH 5.0)에 일정량의 효소액을 가하여 30 분간 50 °C에서 진탕반응시킨 다음 생성된 환원당을 dinitrosalicylic acid 방법으로 정량하였으며 1 분 동안에 포도당으로 환산한 환원당 1  $\mu\text{mole}$ 을 생성하는 효소량을 1 unit라 하였다. Carboxymethylcellulose (CMC, 1%), 여지(Whatman No.1, 10%), 또는 cotton(2.5%)에 대한 분해활성도는 각각의 사용한 기질농도를 제외하고는 Avicel 분해활성도 측정과 동일한 방법으로 측정하였다.

p-Nitrophenyl- $\beta$ -D-cellobiose(PNPC)에 대한 활성도는 10 mM의 PNPC를 포함하는 0.1 M 초산완충용액(pH 5.0)에 효소액을 가하여 30 분간 50 °C에

서 반응시킨 후 생성된 p-nitrophenol(PNP)의 량을 400 nm에서의 흡광도로 측정하였으며 1 분동안에 1  $\mu$ mole의 PNP를 생성하는 효소량을 1 unit라 하였다.

### 기타 분석방법

효소단백질의 당함량은 Dubois 등(1956)의 방법으로 포도당을 표준물질로 사용하여 측정하였으며 단백질 농도측정은 Lowry 방법(1951)을 이용하였다. 단백질시료는 Laemmli (1970)의 방법으로 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 포함한 10 % acrylamide gel에서 전기영동하였다. 효소반응 생성물은 Silica Gel 박층 크로마토그래피로 확인하였다. 전개용매로서는 n-butanol : ethanol : water (5:3:2) 계(Kennedy et. al, 1979)를 이용하였으며 발색시약으로는 silver nitrate-sodium hydroxide를 이용하였다.

### 결 과

#### CBH 의 정제

효소생성유도물질 및 유일한 탄소원으로서 COA를 가한 배지에서 *P. verruculosum*을 배양한 배양상등액으로부터 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)상에서 분자량이 60,000(CBH I)과 66,000(CBH II)인 두 종류의 CBH와 탄소원으로서 KC-flock을 가한 배지의 배양상등액으로부터 SDS-PAGE상에서 분자량이 76,000(CBH III)인 또 하나의 CBH를 정제하였다. 이들 세 효소들은 COA 혹은 KC-flock를 가한 배지의 배양상등액 중의 주된 단백질들이었다(Fig. 1). 정제된 세 단백질들은 모두 당단백질로서 당함량은 CBH I의 경우 8.6 % , CBH II의 경우 4.2 % 그리고 CBH III의 경우 8.5 % 였다.

#### CBH들의 일반적 성질

CBH I, II 및 III의 Avicel 분해활성도는 세 효소 모두 pH 4 - 5, 온도 50 - 60 °C 범위에서 최대활성도를 나타냈으며 또한 이들 세 효소들은 모두 pH 2에서 pH 10까지의 넓은 범위에서 24 시간 이상 안정하였다. pH 5.0에서 온도에 대한 안정성을 조사하였을 때 60 °C에서 10 시간동안 노출시 약 30 % 정도 활성이 소실되었으며 50 °C에서는 48 시간 후에도 원래의 활성도를 유지하였다. 이들 모두 Avicel뿐만 아니라 cotton 및 여지에 대해서도 활성을 나타냈다(Table 1). CBH I의 경우 Avicel에 대한 활성도와 여지에 대한 활성도가 비슷한 반면에 CBH II와 III의 경우 Avicel에 대한 활성도보다

는 여지에 대한 활성도가 2 배 이상 높았으며 cotton에 대한 활성도는 CBH I, II 및 III 모두 Avicel에 비하여 낮았다. 그러나 이들 세 효소들은 가용성섬유소인 CMC에 대해서도 분해활성을 보였으며 Avicel에 비하여 2 - 5 배의 활성도를 나타냈다. PNPC 분해활성도는 CBH I의 경우 Avicel에 비하여 낮았으나 II와 III는 Avicel 분해활성도와 비슷하였다. Avicel에 대한 CBH I, II 및 III의 비활성도는 각각 0.07, 0.10 그리고 0.07 unit per mg. protein 으로서 매우 낮았다. 이러한 결과들은 일반적인 CBH들의 특성과 잘 부합되는 것으로(Fargestam and Pettersson, 1980; Kanda et. al., 1978; Nisizawa et. al., 1972; Shoemaker et. al., 1983) 특히 *Trichoderma*의 CBH들의 경우 Avicel 기질에 대한 효소 비활성도는 0.05 - 0.2 unit per mg. of protein이며 소단위체 분자량은 약 60,000 정도로서 배양여액 중에 존재하는 총 단백질량의 60 % 이상을 차지한다고 보고된 (Shoemaker et. al., 1983) 것과 매우 유사하였다.

#### 효소분해산물 및 생성물에 의한 저해효과

정제된 CBH I, II 및 III의 Avicel, cotton 및 여지 등 결정성섬유소에 대한 가수분해산물은 cellobiose였으며 포도당은 거의 확인되지 않았다 (Fig. 2). 이들 세 효소들의 PNPC 기질에 대한 분해활성도는 cellobiose에 의하여 저해되었는데 CBH I의 경우 10 mM의 cellobiose에서 50 % 정도 억제되었고 CBH II와 III의 경우는 20 mM 에서 50 % 정도 억제되었으며 50 mM의 cellobiose 농도에서는 25 - 30 % 정도의 활성도만 나타냈다. 그러나 포도당의 경우 100 mM에서도 저해효과가 없었다. 이런 결과들은 정제된 세 효소들이 섬유소말단기로부터 cellobiose 단위로 분해하는 일반적인 CBH들의 특성과 잘 부합되었다. 그러나 CMC를 기질로 한 경우 반응산물 중에 cellobiose뿐만 아니라 포도당과 아울러 올리고당류도 생성되었다(Fig. 2). 따라서 이들 정제된 세 효소들이 가용성섬유소인 CMC에 대해서는 endoglucanase의 활성을 나타내는 것으로 추정된다.

균주에 따라 CBH들이 매우 다양한 특성을 나타내는 것이 보고된 바 *P. verruculosum*으로부터 정제된 CBH I, II 및 III는 Avicel, cotton에 대해 cellobiose를 생성하며 CMC에 대해서는 무작위로 작용하는 Nisizawa 등 (1972)의 결과와 유사하였다.

#### CBH I, II 및 III 의 상승효과

*P. verruculosum*으로부터 정제한 CBH I, II 및 III를 서로 조합하여 Avicel분해활성을 조사하였을 때 이들간의 상승효과는 관찰되지 않았다.

CBH III와 동일 균주로부터 정제한 CMCase II(MW, 58,000)(김연희, 1990)

와  $\beta$ -glucosidase (MW, 120,000)(김동호, 1990)를 조합하여 cotton분해에 대한 상승효과를 조사하였을 때 CBH와  $\beta$ -glucosidase를 함께 가한 경우 반응 초기에는 CBH 만을 가한 경우와 별 차이가 없었으나 6 시간이후 약간의 상승효과가 관찰되었고 CBH와 CMCase 그리고  $\beta$ -glucosidase를 동시에 가한 경우 CBH만을 가한 경우에 비해 반응 초기부터 약 2.5 배의 상승효과를 나타냈다. 그러나  $\beta$ -glucosidase만을 반응시켰을 때 20시간 후에도 환원당이 측정되지 않았으며 CMCase만을 가한 반응액에서는 미량의 환원당이 생성되었다. 반응액에 CMCase와  $\beta$ -glucosidase를 함께 가한 경우 약간의 활성이 나타났으며 이는 CBH 만을 가한 경우의 절반 수준이었다. Avicel 분해에 대한 이들 세성분들의 상승작용을 관찰한 바 기질을 cotton으로한 경우와 유사한 결과를 보였으며 이들 세성분을 다 포함하였을 때 CBH 단독으로 작용할 때 보다 약 3.5배의 상승효과를 나타냈다(Fig. 3).

#### 아미노산 조성 및 펩타이드 용출양상

정제된 CBH I, II 및 III의 아미노산 조성은 Table 2와 같았다. 세 효소 모두 methionine과 histidine의 함량은 매우 낮았다. 아미노산 조성을 서로 비교하였을 때 CBH II와 III는 거의 같았다. 그러나 CBH I은 CBH II 및 III에 비해 상당한 차이를 보였다. 이들 세단백질들의 아미노산조성을 *T. reesei*의 CBH I, II(Fagerstam & Petterson, 1980)와 비교하였을 때 CBH II와 III의 아미노산 조성은 *T. reesei*의 CBH I의 아미노산 조성과 매우 유사했다.

정제된 각각의 단백질을 트립신으로 가수분해하여 생성된 펩타이드의 용출양상을 비교하였다. 단백질시료를 트립신으로 처리한 후  $C_{18}$  column을 이용하여 분리하였을 때 210 nm에서 펩타이드의 용출 양상은 CBH II와 III의 경우 매우 유사하였으나 CBH I의 경우는 이들과 현저하게 달랐다. 아미노산 조성에 있어서 CBH II와 III가 거의 같게 나타난 결과와 아울러 매우 유사한 펩타이드 지도의 결과로부터 CBH II와 III는 동일한 유전자산물임에 비하여 CBH I 효소단백질은 이와는 다른 유전자산물임을 추정할 수 있었으며 그들의 SDS-PAGE상에서의 분자량의 차이는 당함량이 CBH II에 비하여 CBH III가 더 높기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 *P. verruculosum*에는 CBH에 대한 최소 두 종류의 유전자가 있음을 추정할 수 있다.

#### 펩타이드의 아미노산서열

CBH I과 II 단백질을 트립신으로 가수분해한 후 정제한 펩타이드의 아미노산서열은 Fig. 4와 같았다. 이들 펩타이드들의 아미노산서열을 보고된 다른 섬유소분해효소들과 비교하였을 때 CBH II로 부터 정제한 펩타이드가 *T.*

*reesei*의 CBH I의 아미노산서열(Fagerstam et al., 1984)과 상동성을 보였다. 그러나 CBH I으로부터 정제한 펩타이드의 서열과 상동성이 있는 단백질은 찾을 수 없었다.

#### CBH항혈청에 의한 Immunoblot

토끼로부터 얻은 CBH I과 II에 대한 항혈청을 이용하여 CBH I, II 및 III에 대해 immunoblotting하였을 때 CBH I에 대한 항혈청은 CBH I 단백질에 반응하고 CBH II와 III에 대해서는 반응성이 매우 낮았다. CBH II에 대한 항혈청은 CBH II과 III에 반응을 나타냈으며 CBH I에 대해서는 매우 낮은 반응성을 보였다(Fig. 5).

#### 고 찰

*P. verruculosum*으로부터 정제된 이들 세 종류의 CBH는 결정성섬유소인 cotton과 Avicel을 가수분해하며 그 반응산물이 cellobiose이었고 포도당이나 올리고당류는 거의 검출되지 않았다. 또한 이들 세 효소들은 포도당에 의해 활성도가 억제되지 않은 반면 cellobiose에 의해서는 억제되었으며 Avicel을 기질로 하였을 때 효소 비활성도가 0.07 - 0.1 unit per mg. of protein으로 매우 낮았다. 이러한 결과들은 일반적인 CBH들의 특성과 잘 부합되는 것으로 특히 *Trichoderma*의 CBH들의 경우 Avicel 기질에 대한 효소 비활성도는 0.05 - 0.2 unit per mg. of protein이며 소단위체 분자량은 약 60,000 정도로서 배양상등액 중에 존재하는 총 단백질량의 60% 이상을 차지한다는 Shoemaker등(1983)의 보고와 매우 유사했다. 특히 *P. verruculosum*에서 정제된 CBH II 또는 III의 아미노산조성이 *T. reesei*의 CBH I(Fagerstam & Petterson, 1980)과 매우 유사했으며 펩타이드의 아미노산서열에 있어도 높은 상동성을 보였다(Fagerstam et al., 1984). 따라서 이러한 점들을 볼때 *P. verruculosum*으로부터 정제한 CBH II가 *T. reesei*의 CBH I과 매우 유사한 단백질일 것으로 추정된다. 그러나 *Penicillium*으로부터 정제된 이들 세 효소들은 가용성섬유소인 CMC에 대하여 높은 활성을 나타낼 뿐만 아니라 그 반응산물이 주로 cellobiose였으나 포도당과 아울러 소량의 올리고당류 또한 생성된다는 점은 결정성 섬유소만을 가수분해하는 일반적인 CBH와는 차이가 있었다.

정제된 이들 CBH효소들은 섬유소분해효소복합체의 다른 성분들에 비하여 효소 비활성도가 매우 낮지만 배양상등액 중의 총 단백질량의 절반 이상을 차지하는 주된 단백질들로서 가수분해되기 어려운 결정성섬유소 분해의 초기과정에 중요한 기능을 할 것으로 추정된다.

## 참 고 문 헌

- Cho, N. C., Kim, K. H., Chun, S. B. and Chung, K. C. (1990) *Korean J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 18, 383
- Chung, K. C., Kawai, K., Yashima, S. and Enguchi, Y. (1982) *Hakkokogagu*, 60(5), 355
- Chung, K.C., Park, C. R., Bai, S., Chun, S. B. and Kim, K. C. (1988) *ibid.* 16, 163
- Collmer, A. and Wilson, D. B. (1983) *Biotech.* 7, 594
- Dubois, M., Hamilton, K. A., Rbers, P. A. and Smith, F. (1956) *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- Fagerst, L. G. and Pettersson, L. G. (1980) *FEBS Letter* 119, 98
- Kanda, T., Nakakubo, S., Wakabayashi, K. and Nisizawa, K. (1978) *J. Biochem.* 84, 1217
- Kennedy, J. F., White, C. A. and Riddiford, C. L. (1979) *Starch/Starke* 31, 235.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, 227, 680
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, 193, 265
- Nisizawa, K. et. al. (1972) In: Terui G (ed) *Proc IV Intern. Ferment. Symp. Osaka*, p 719
- Shoemaker, S. P. *verruculosum*, Watt, K., Tsitovsky, G. and Cox, R.V. (1983) *Biotech.*, 1, 687

Table 1. Specific activities of CBH I, II and III of *P. verruculosum* on various substrates.

Substrate	CBH		
	I	II	III
Avicel	0.070	0.100	0.070
Cotton	0.014	0.080	0.040
Filter paper	0.060	0.230	0.140
CMC	0.350	0.330	0.390
PNPC	0.013	0.060	0.100

Table 2. Amino acid composition of cellobiohydrolase I, II and III of *P. verruculosum*.

Amino acid	Molar Ratio (%)		
	Cellobiohydrolase		
	I	II	III
Asp	10.6	12.4	12.3
Glu	6.9	6.2	6.1
Ser	9.0	11.8	11.7
Gly	11.0	16.7	16.7
His			
Arg	1.6	3.0	2.9
Thr	10.2	13.0	13.0
Ala	16.1	7.2	7.1
Pro	6.5	4.4	4.4
Tyr	6.6	4.8	5.5
Val	5.6	6.2	6.1
Met			
Cys			
Ile	4.5	3.5	3.8
Leu	6.9	5.4	5.4
Phe	2.1	3.3	3.3
Lys	2.4	2.1	2.1



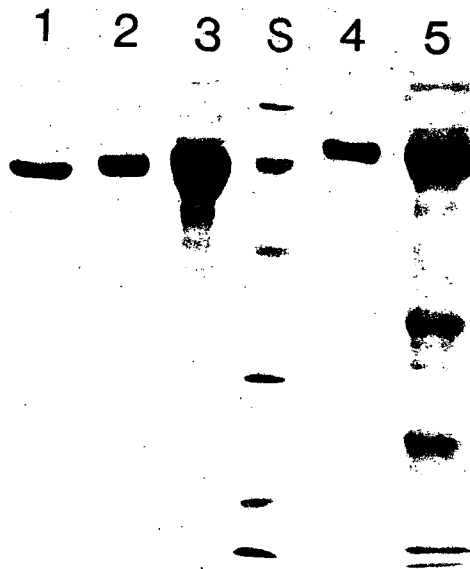


Fig. 1. SDS-PAGE of cellobiohydrolase(CBH) from culture broth of *P. verruculosum*. Purified enzymes were separated by 10 % SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie blue. Lanes: 1, CBH I(40  $\mu\text{g}$ ); 2, CBH II(40  $\mu\text{g}$ ); 3, crude extract from COA media; 4, CBH III(40  $\mu\text{g}$ ); 5, crude extract from KC-flock media; S, molecular weight standard.

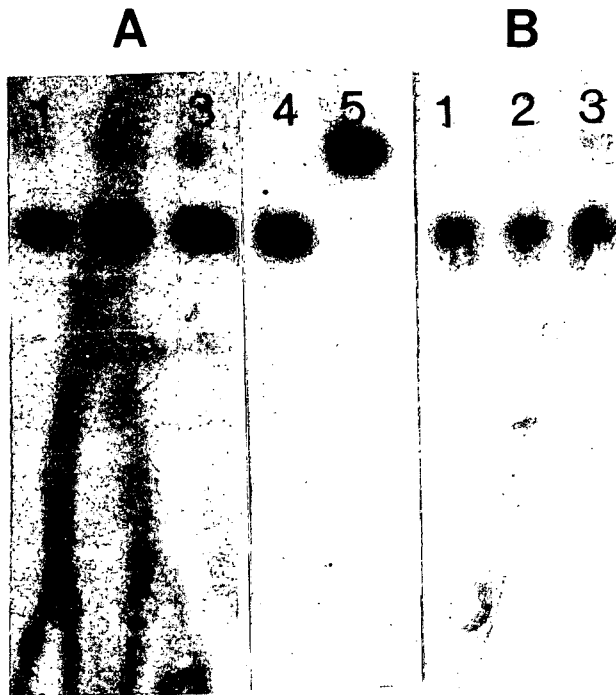


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of Avicel and CMC by purified cellobiohydrolases (CBH) from culture broth of *P. verruculosum*. Reaction mixture containing 50 mM sodium acetate buffer, pH 5.0, 2 % Avicel or 1 % CMC and purified CBH I or II or III. The supernatant of the reaction mixture was separated using butanol: ethanol: water (5: 3: 2) as a developing solvent system on precoated silica gel plate and reducing sugars were detected by silver nitrate-sodium hydroxide reagent. A: Avicel. B: CMC, Lanes: 1, CBH I; 2, CBH II; 3, CBH III; 4, cellobiose; 5, D-glucose

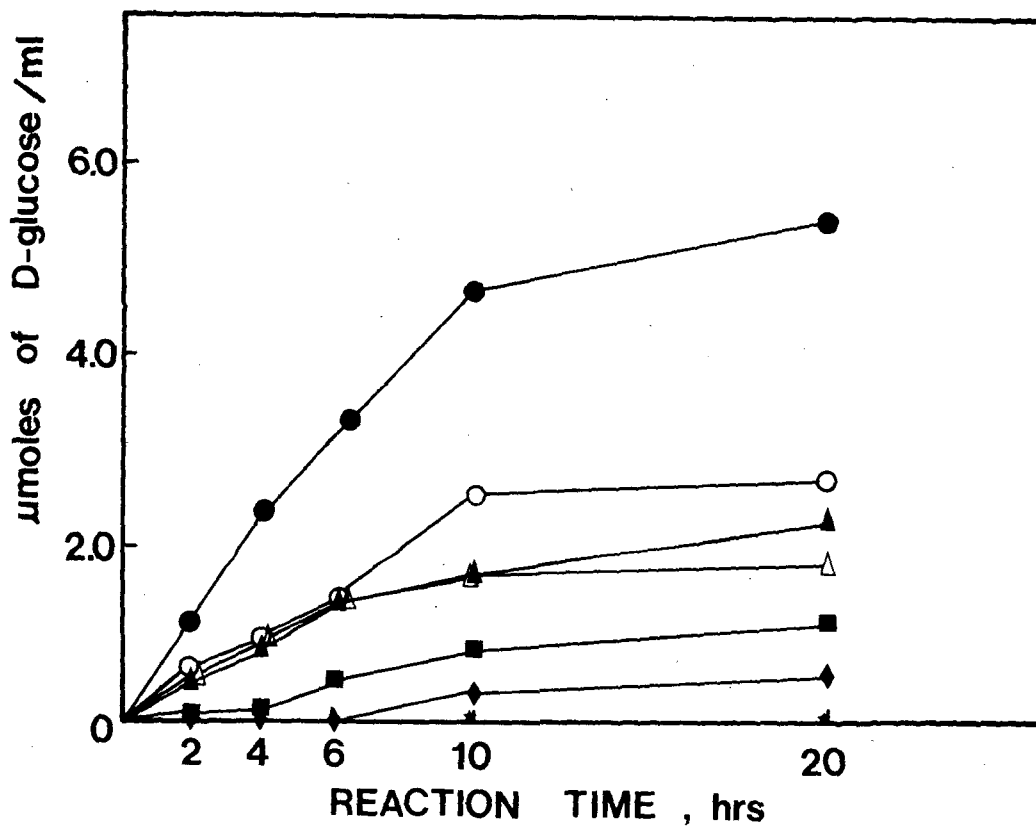


Fig. 3. Hydrolysis of cotton by *P. verrucosum* cellobiohydrolase(CBH), CMCCase and  $\beta$ -glucosidase, alone and in combination. CBH III only( $\Delta$ ), CMCCase only( $\blacklozenge$ ) and  $\beta$ -glucosidase only( $\blackstar$ ), CBH + CMCCase( $\circ$ ), CBH +  $\beta$ -glucosidase( $\blacktriangle$ ), CMCCase +  $\beta$ -glucosidase( $\blacksquare$ ), CBH + CMCCase +  $\beta$ -glucosidase( $\bullet$ )

P. verruculosum Met Leu Trp Leu Asp Thr Thr Tyr Pro Pro Ala Ile Thr Leu

(Cellobiohydr-  
olase II-a)


T. reesei Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr Asn Glu Thr Ser

(Cellobiohydr- 369 382  
olase I)

P. verruculosum Ser Gly Gly Ser X Ser X Asn Ser Gly Ala

(Cellobiohydr-  
olase II-b)


T. reesei Ser Gly Gly Thr Cys Thr Gln Gln Thr Gly Ser

(Cellobiohydr- 21 31  
olase I)

P. verruculosum Ala Ala Glu Ile Pro Ser Phe Val Trp Leu Asp Thr Ala Ala

(Cellobiohydr-  
olase I-a)

Fig. 4. Sequence of tryptic peptides from cellobiohydrolase(CBH) I and II of *P. verruculosum*. The same amino acid to that at the equivalent position of *P. verruculosum* CBH II is marked by as(—) and amino acid different from but same type, i.e. nonpolar uncharged, or charged, is marked as (...). The number under amino acid of *T. reesei* CBH I indicates No. of residue from terminal of polypeptide.

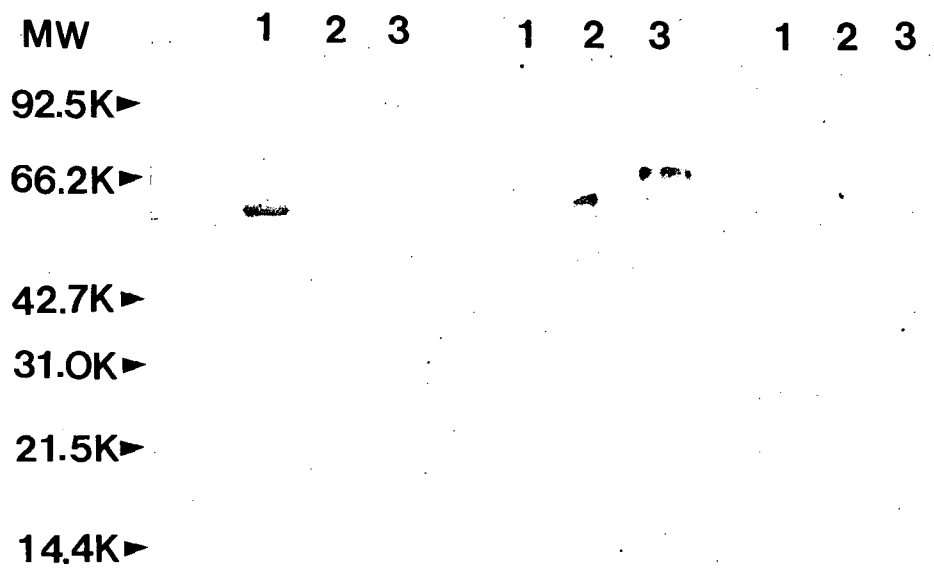


Fig. 5. Immunoblots of cellobiohydrolase(CBH) I, II and III of *P. verruculosum*. One ug of purified CBH I(lane 1), II(lane 2), or III(lane 3) of *P. verruculosum* were separated by SDS-polyacrylamide gel and probed with antibodies against the CBH(left) or II(center) or with control serum(right).