

면역학적 방법에 의한 Cellobiohydrolase의 열역학적 특성

오태광^{1*} · 박관화²

¹한국과학기술연구원 유전공학센터 ²서울대학교 농과대학 식품공학과

Thermal Inactivation Kinetics of *Trichoderma viride* Cellobiohydrolase Determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay and Residual Enzyme Assay

Oh, Tae-Kwang^{1*} and Kwan-Hwa Park²

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

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

Thermal inactivation of *Trichoderma viride* cellobiohydrolase was investigated by immunoassay and residual enzyme assay such as carboxymethyl cellulase (CMCase) and filter paper degradation activity (FPase). Arrhenius plots of cellobiohydrolase were appeared as straight line. The Z-values of cellobiohydrolase calculated by CMCase, FPase and immunoassay were 5.2°C, 6.4°C and 5.8°C, respectively. The thermodynamic parameters obtained from FPase were better agreement with those of immunoassay than CMCase assay.

섬유소는 식품, 사료, 연료 및 화학물질 등의 유용물질로 전환시킬 수 있는 가장 풍부한 자원 중 하나이지만, 효소적 전환시, 기질의 다양성(1), 복잡한 효소계(2) 및 효소의 불활성(3) 등으로 인하여 실제 응용에 큰 난점을 갖고 있다. 이 중 섬유소 분해효소의 불활성은 주로 열, pH, 마찰력, 금속이온, 단백질분해효소 및 섬유소 흡착제 등의 요인(4, 5)에 의해서 유발된다. 이와같은 효소 불활화 특성은 효소반응조의 설계 및 제조에 중요 요인이 되기 때문에 효소특성 연구에 한 분야로 평가된다. 하지만, 섬유소 자체가 다양한 기질(6)이 존재할 뿐 아니라 분해효소마저 복합효소(2, 7)로 구성되어 있어서, 현재까지 효소역가측정에 이용되었던 환원당 정량방법(8, 9)으로는 각개의 섬유소 분해효소의 불활화 정도를 파악하기는 미흡한 실정이다. 면역학적 방법(10, 11)은 고도의 특이성과 민감성을 가져서 복합적인 계에서 특정성분을 특이하게 정량 및 동정할 수 있는 방법으로 알려져 왔다. 섬유소 분해효소에

대한 면역학적 연구는 Hakansson 등(12), Nummi 등(10, 13), Wood 등(14), Award 등(11) 및 Montenecourt 등(15)에 의해서 이루어져 왔지만 주로, 단순한 면역침강반응을 이용해서 동정 및 개략적인 정량을 행했고 정확한 면역정량방법은 오 등(16, 17)에 의해서 *Trichoderma viride*가 생산하는 cellobiohydrolase를 enzyme linked immunosorbent assay(이하 ELISA로 표기)로 정량하였다. 면역특이성을 이용한 단백질의 열특성에 대한 연구로는 Lyster 등(18)이 single immunodiffusion 방법을 이용하여 우유 중 α -lactoalbumin의 열특성 조사, Iwaki 등(19)과 Ogawa 등(20)은 radio immunoassay을 이용하여 효소의 열불활화를 조사한 보고가 있다.

본 연구는 *Trichoderma viride*에서 분리된 cellobiohydrolase의 열특성을 전통적인 잔류효소 역가측정방법과 cellobiohydrolase의 항체를 이용한 ELISA 방법을 이용하여 비교 측정하고 열역학 상수를 산출

Key word: Cellobiohydrolase, immunoassay, thermal inactivation

*Corresponding author

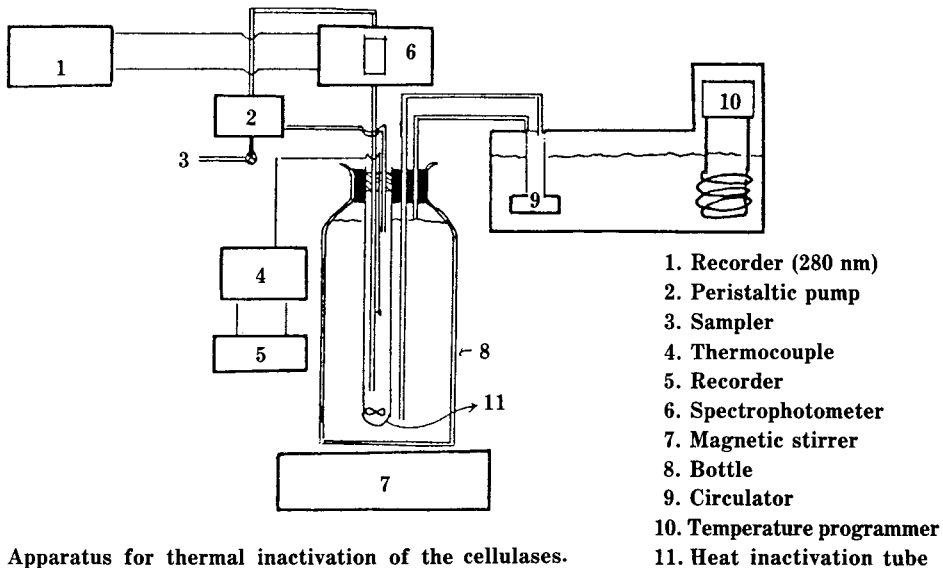


Fig. 1. Apparatus for thermal inactivation of the cellulases.

하였다.

재료 및 방법

재 료

실험에 사용한 cellobiohydrolase 는 전보(21)에 방법에 의해서 순수분리된 효소를 사용하였고 ELISA 을 행하기 위해서 사용한 항체는 전보(16)에서 사용된 것을 이용하였다.

효소의 열불활성화

효소단백질의 열불활성화는 Fig.1 에서와 같은 열처리 장치를 제작하여 실시하였다. 수조는 일정속도로 온도가 상승하도록 또는, 항온으로 순환되도록 장치하였고 열처리 bottle 은 수조에서 유입된 물에 의해서 시료 tube 외부에서 와류를 일으키고 tube 내에서는 자석식 교반기에 의해서 와류를 일으켜서 열전달을 용이하게 하였다. 시료 tube 내의 온도는 내부에 장착된 감지기에 의해서 자동으로 기록하였고, 시료 tube 내의 반응물을 연동펌프로 flow cell spectrophotometer 을 통과하게 하여서 단백질 구조변성 정도를 280 nm 에서의 흡광도 변화로서 측정할 수 있도록 하였다. 한편, 열처리된 시료는 연동펌프 하단에 장치된 3-way valve 로 시간별로 채취하여 잔류효소 측정과 ELISA 에 의한 cellobiohydrolase 의 정량을 향하였다.

잔류효소액 측정방법

효소의 역가변화는 2.5 mM citrate buffer (pH 4.8) 9 ml 을 예열하여 온도감지기에서 감지된 온도가 열불활성화시키고자 하는 온도에 도달했을 때 효소단백질 1 ml 을 넣고서 열처리를 행하였고, 시료채취는 일정시간 열처리를 행한 후 즉시, ice bath 에 보관하고 모든 처리가 끝난 후, 효소의 잔류역가를 측정함으로써 열불활성도를 결정하였다. 잔류역가는 1% carboxymethyl cellulose 을 기질로 하는 carboxymethyl cellulase (이하 CMCase 로 표기)의 역가와 50 mg 의 여지를 기질로 하는 filter paper degradation activity (이하 FPase 로 표기)은 측정하였다.

ELISA 방법에 의한 cellobiohydrolase 정량

잔류효소액 측정방법에서 얻어진 시료를 전보(16)의 방법과 같은 ELISA 방법으로 측정하였다. ELISA 방법에 사용된 효소는 alkaline phosphatase 였다. 초기, microhemagglutination plate 에 cellobiohydrolase 가 포함된 시료로 흡착시키고 흡착된 cellobiohydrolase 에 cellobiohydrolase 을 항원으로 한 토끼의 항혈청을 특이하게 흡착시킨 후 최종적으로 토끼항혈청에 특이하게 흡착하는 산양의 항혈청에 alkaline phosphatase 을 marker 로 흡착시켜서 alkaline phosphatase 의 역가를 측정함으로써 초기에 흡착된 cellobiohydrolase 를 정량하였다.

열역학 상수계산

열역학 상수는 잔류역가 및 농도 측정시는 Ering 식(22)을 이용하였고 단백질구조변성 측정시는

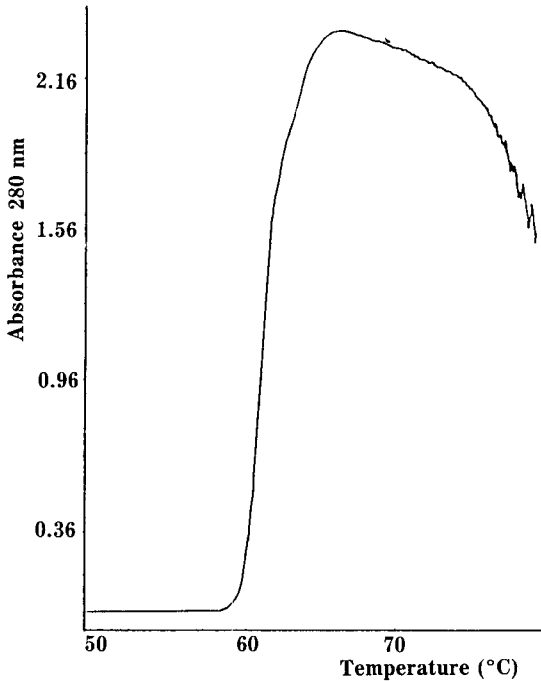


Fig. 2. Thermal transition profiles of cellobiohydrolase.

Brandts (23) 방법에 의했다.

결과 및 고찰

열불활성화 온도범위 결정

열불활성화 장치로 30°C에서부터 분당 1°C씩 상승시키며 280 nm에서 흡광도를 측정 한 결과는 Fig.2와 같다. 온도가 59.2°C에서 흡광도가 급격히 증가하는데, 이는 이 온도에서 cellobiohydrolase의 단백질 구조가 변화되면서 단백질 3차구조의 내부에 존재하

는 친유성 아미노산이 단백질의 외부로 노출되면서 흡광도가 올라가고 67.2°C에서는 완전히 노출되어서 최대의 흡광도를 나타내었고 70°C 이상에서는 노출된 친유성 아미노산들이 hydrophobic interaction에 의해서 다시 응집되어 침전되면서 흡광도가 감소되는 것으로 추정되었다. 실제로, 70°C 이후 온도에서 단백질 침전이 관찰되어서 현탁되는 것을 알 수 있었다. 이상과 같이, 단백질의 변성은 59.2°C 이상에서 일어남을 알 수 있어서 열불활성화 온도는 60~70°C의 범위에서 행하였다.

Cellobiohydrolase의 열변성화

열변성화 온도는 60, 63, 66, 70°C에서 각기 처리시간은 달리하여 열변성시켜서 얻은 시료를 잔류효소역가 측정방법과 ELISA에 의한 정량방법으로 측정하여 잔류역가 및 농도를 초기역가 및 농도의 백분율을 상용대수로 취한 값과 열처리 시간을 도시한 열불활성화 곡선은 Fig.3과 같이 직선관계를 가져서 cellobiohydrolase의 열불활성화 반응은 1차 반응을 따라서 변성됨은 알 수 있었다. 열불활성화 곡선으로부터 90% 변성되는데 필요한 시간인 D-value를 구하였고, D-value로부터 변성속도가 10배 증가하는데 필요한 온도증감으로 정의된 Z-value를 D-value의 상용대수와 반응온도를 도시하여 계산하여서 Table 1에 요약하였다. ELISA로 측정한 Z-value가 5.8°C로 나타나는데 비해서 잔류효소역가 측정시는 FPase의 경우는 6.4°C, CMCase의 경우는 5.2°C로 각각 나타나서 FPase로 측정한 값과 ELISA로 측정한 값이 CMCase로 측정한 값에 비해서 더 유사하게 높게 나타났고, 아울러, 각 온도에서 변성속도상수도 더 비슷하게 나타났다. 이와같은 결과는 FPase 활성과 면역학적 정량에 의한

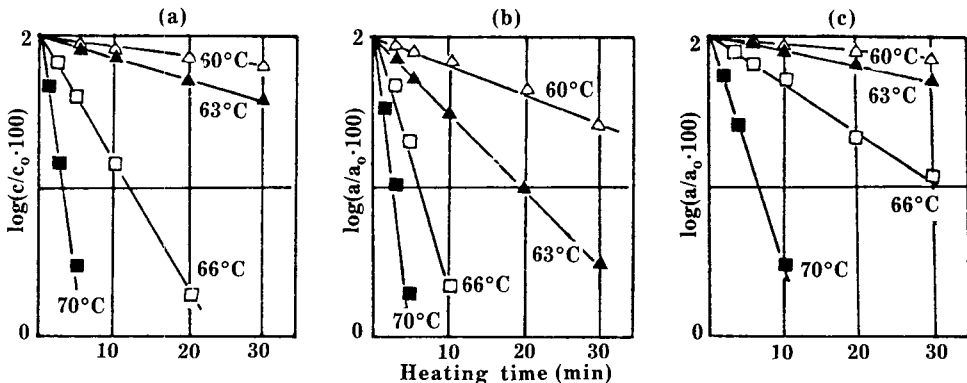


Fig. 3. Thermal inactivation curves of cellobiohydrolase by immunoassay (a), FPase assay (b) and CMCase assay (c); $c/c_0 \cdot 100$: percent of residual concentration of cellobiohydrolase by immunoassay; $a/a_0 \cdot 100$: percent of residual enzyme activity.

Table 1. First order reaction rate constants, D-value and Z-value for thermal inactivation of cellobiohydrolase monitored by enzyme assay and immunoassay.

Assay method	Heating temp. (°C)	D-value (sec)	Reaction rate constant (sec ⁻¹)	Z-value (°C)
FPase	60	3000	7.68	6.4
	63	1200	19.19	
	66	360	63.97	
	70	156	147.63	
CMCase	60	16200	1.42	5.2
	63	12600	1.83	
	66	1332	17.29	
	70	390	59.05	
ELISA	60	9900	2.33	5.8
	63	4140	5.56	
	66	710	32.44	
	70	180	127.94	

cellobiohydrolase의 양이 높은 상관관계를 가진다는 오 등(17)의 결과와 일치된다.

열역학 상수산출

Table 1에서 얻어진 열변성 속도상수를 이용하여 Ering 방법(22)에 의해서 63°C를 기준으로 열역학 상수를 계산한 결과 Table 2와 같이 나타났다. FPase의 잔류효소 활성측정방법에 의한 열역학 상수는 ELISA 방법에 의한 측정상수와는 거의 동일한 결과를 갖는데 비해서 CMCase 잔류역가 측정과는 상이한 결과를 갖는다. Cellobiohydrolase의 엔탈피 변화는 내열성 효소인 peroxidase의 162 kJ/mole(24)보다 높은 수치를 갖음으로 열안정성이 떨어짐을 알 수 있었어서, 섬유소분해를 실용화하기 위해서는 Ryu 등(4)의 제안과 같이 새로운 내열성 균주개발이 중요하다. 단백질 구조변성을 나타내는 Fig.2로부터 Brandts 등(23)의 방법에 의해서 단백질구조 변성시 열역학 상수를 산출하면 Table 3과 같다. 단백질 구조변성시 엔탈피변화도 ribonuclease의 경우, 221 kJ/mole(23), myoglobin의 경우는 176 kJ/mole(23)인데 비해서 cellobiohydrolase의 경우는 훨씬 낮게 나타났다. Spectrophotometer를 이용한 단백질 구조변화 측정, 잔류효소역가측정 및 면역학적 정량방법을 비교하면, 효소 열불활성화 개시온도는 대체로 같으나 열역학 상수는 방법간, 상당한 차

Table 2. Thermodynamic data of cellobiohydrolase inactivation at 63°C analyzed by enzyme assay and immunoassay.

Assay Method	ΔH^* (kJ/mole)	ΔG^* (kJ/mole)	ΔS^* (J/K mole)
FPase	327.30	100.10	676.11
CMCase	269.68	106.67	485.15
ELISA	330.11	103.38	674.82

Table 3. Thermodynamic data of cellobiohydrolase analyzed by spectrophotometer at 63°C.

Enzyme	ΔH^* (kJ/mole)	ΔG^* (J/mole)	ΔS^* (J/K mole)
Cellobiohydrolase	106.72	287.62	318.53

이를 보였다. 이와같은 결과는 효소의 열불활성화는 단백질구조가 변화되는 것에도 기인되지만, 효소의 활성부위의 구조가 변하면 효소의 역가가 변화되므로 이들 방법간에 차이가 생기는 것으로 생각된다. 하지만, 열역학 상수가 FPase 활성측정시와 면역학적 정량방법간에 큰 차이가 없는 것으로 보아 면역 특이성은 이용해서 복잡한 혼합용액에서 cellobiohydrolase만 특이하게 정량할 수 있을 것으로 평가된다.

요 약

*Trichoderma viride*가 생산하는 cellobiohydrolase의 열불활화 특성을 잔류효소역가 측정방법과 면역학적 정량방법으로 측정하였다.

정제된 cellobiohydrolase의 열불활 곡선은 Arrhenius plots에서 직선관계를 가졌고 이 때의 Z-값은 carboxymethyl cellulase의 정량시 5.2°C, filter paper degradation activity 정량시 6.4°C, immunoassay 시 5.8°C로 각기 나타났다. 열역학 상수 산출시는 immunoassay와 filter paper degradation activity 측정이 carboxymethyl cellulase의 역가 측정보다 잘 일치하는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Gupta, J.K., Y.P. Gupta and N.B. Das: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2662 (1973)
- Halliwel, G. and R. Vincen.: *Biochem. J.*, **179**, 409

- (1981)
3. Howell, J.A. and M. Mangat : *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 847 (1978)
 4. Reese, E.T. and D.Y. Ryu : *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 239 (1980)
 5. Hagerdal, B., J.D. Ferchak and E.K. Pye : *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1515 (1980)
 6. Ferrer, A., Y. Alroy and I. Brito : *Proc. Annu. Biochem. Eng. Symp.*, **7**, 83 (1977)
 7. Holber, H.: *Trends Biochem. Sci.*, **1**, 178 (1976)
 8. Sternberg, D and M. Mandels : *J. Bacteriol.*, **139**, 741 (1979)
 9. Bailey, M.J. and K.M.N. Nevalainen : *Enzyme Micro. Technol.*, **3**, 152 (1981)
 10. Nummi, M., M.-L. Niku-Paavola , A. Lappalainen , T.-L. Enari and V. Raunio : *Biochem. J.*, **215**, 677 (1983)
 11. Award, M. and L.N. Lewis : *J. Food Sci.*, **45**, 1625 (1980)
 12. Hakansson, ULE, G. Lars , L. Fagerstan , G. Pettersson and L. Andersson : *Biochem. J.*, **179**, 141 (1971)
 13. Nummi, M., M.-L. Niku-Paavola , T.-H. Envari and V. Ravnio : *Analytical Biochemistry*, **116**, 137 (1981)
 14. Wood, T.M. and S.I. McCrae : *Biochem. J.*, **234**, 93 (1986)
 15. Montenecourt, B.S., T.J. Kellether and D.E. Eveleign : *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **10**, 47 (1981)
 16. Oh, T.K., Y.H. Kho , J.I. Kim and K.H. Park : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), 226 (1988)
 17. Oh, T.K., S.H. Kim and K.H. Park : *Biotechnol. Lett.*, **8**, 403 (1986)
 18. Lyster, L.J.: *J. Dairy Res.*, **37**, 233 (1970)
 19. Iwaki, K., M. Ogawa , T. Kitahara , S. Tanaka and G. Kosaki : *Enzyme*, **29**, 153 (1983)
 20. Ogawa, M., Y. Taketsuka , T. Kitahara , K. Matsuhira and G. Kosaki : in *Method in Enzymology*, **71**, 290 (1981)
 21. Oh, T.K. and K.H. Park : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), 219 (1988)
 22. Eyring, H. and A.E. Stearn : *Chem. Rev.*, **24**, 253 (1939)
 23. Brandts, J.F. and L. Hunt : *J. An. Chem. Soc.*, **89**, 4826 (1967)
 24. Yoon, J.R. and K.H. Park : *Korea J. Food Sci. Technol.*, **14**, 125 (1982)

(Received June 14, 1989)