

면역친화 크로마토그래피에 의한 *Trichoderma viride* 의 Cellobiohydrolase 분리

오 태 광*

한국과학기술연구원 유전공학센터

Purification of *Trichoderma viride* Cellobiohydrolase by Immunoaffinity Chromatography

Oh, Tae Kwang

Genetic Engineering Center, Korea Institute of Science and
Technology, P.O. Box 17, Dae Duk Science Town, Dae Jeon, 305-606, Korea

A cellobiohydrolase was purified from the culture broth of *Trichoderma viride* by using immunoaffinity chromatography. A single protein band in polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectrofocusing after immunoaffinity purification corresponded to cellobiohydrolase activity. A immunoaffinity purified cellobiohydrolase is more effective in the hydrolysis of highly crystalline cellulose than amorphous cellulose.

섬유소 분해효소는 1,4- β -D-glucanglucanohydrolase (EC 3.2.1.4), 1,4- β -D-glucancellobiohydrolase (EC 3.2.1.91) 및 β -glucosidase (EC 3.2.1.21)의 복합효소로 구성되어 (1,2), 상호작용에 의해서 섬유소가 분해되는데, 이 중, 1,4- β -D-glucancellobiohydrolase (이하, cellobiohydrolase 로 표기)는 다른 효소성분에 비해서 결정성이 높은 거대분자의 섬유소에 친화력이 높은 특성이 있어서 (3,4), 섬유소분해를 실용화시키기 위해서 cellobiohydrolase 의 활성이 높은 미생물을 탐색 (5), 육종 (6) 및 정제 후 특성조사 (4-7)에 관한 연구를 많이 해왔다. Cellobiohydrolase 의 정제에 관한 연구는 많은 연구자들 (2,8-11)에 의해서 진척되어 왔지만, 주로 gel filtration, ion exchange 등의 방법을 사용하여 정제단계가 길고 정제수율이 낮은 단점 때문에 cellobiohydrolase 을 다량 분리정제하여 특성을 조사하기는 어려운 방법이다. 기질친화력을 이용한 섬유소 분해효소의 정제는 Halliwell 등 (12)이 행한 바 있고, 항체를 ligand 로 사용한 예는 Nummi (13)과 Håkansson (14) 등에 의해

서 이루어진 바 있다.

본 연구에서는 전보 (15)에서 얻어진 *Trichoderma viride* cellobiohydrolase 의 항체를 이용해서 immunoaffinity chromatography 을 조제하여, 배양액으로부터 cellobiohydrolase 을 용이하게 분리하는 방법을 개발하였고, 면역친화력에 의해 정제된 cellobiohydrolase 의 특성을 전보 (11)에서, gelfiltration, ion exchange, chromatography 및 preparative electrophoresis 에 의해 분리된 cellobiohydrolase 와 비교하였다.

재료 및 방법

재료

Cellobiohydrolase 의 항체는 전보 (15)에서 얻어진 토끼의 항혈청을 사용하였고, CNBr activated Sepharose 4B, 전기영동용 시약은 Sigma Co.(USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 *Trichoderma viride* QM9414 는 US Army Natick Research (USA)에서 분양받아 사용하였다.

Key words: immunoaffinity, chromatography, Cellobiohydrolase, *Trichoderma viride*

* Corresponding author

Cellobiohydrolase 에만 유효한 IgG 분리

전보(15)에서 얻어진 cellobiohydrolase의 항혈청으로부터 cellobiohydrolase에만 유효한 IgG를 분리하기 위해서 Dean 등(16)의 coupling 방법으로 affinity chromatography을 제작하였다. CNBr activated Sepharose 4B를 0.1M glycine-NaOH buffer(pH 9.0)에서 충분히 팽윤시킨 후, 전보(11)에서 분리한 cellobiohydrolase을 과량으로 넣고서 4°C의 냉장고에서 Nutator(Clay Adams, USA)을 이용해서 천천히 교반시키며, 12시간 반응시켰다. 반응된 cellobiohydrolase가 붙은 Sepharose 4B을 1cm ϕ ×12cm column에 충전한 후, 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)로 coupling 되지 않은 cellobiohydrolase를 제거하였다. 충전된 column 상단에 토끼에서 얻은 항혈청을 가하고 pH 7.0의 buffer로 cellobiohydrolase에 친화력이 없는 부분을 세척해내고 친화력이 있는 IgG는 0.1M glycine-HCl buffer(pH 3.0)을 사용하여 용출하였다.

용출된 단백질은 1.0M NaOH로 중화시킨 후 냉동건조하였다. 분획은 분당 0.5ml의 속도로 tube 당 2.5ml씩 분획하였다.

Cellobiohydrolase 분리

T. viride 배양액을 전보(11)의 방법으로 준비하였다. Cellobiohydrolase을 분리하기 위한 immunoaffinity chromatography는 상기 cellobiohydrolase에만 유효한 IgG를 분리한 방법에서 ligand를 cellobiohydrolase 대신 cellobiohydrolase에만 유효한 면역친화 정제된 IgG를 사용했고, 분리하는 시료를 *T. viride*의 배양액을 사용한 이외는 모든 분리조건을 동일하게 사용하였다.

항체역가의 측정

항체역가는 ELISA 방법(17)에 의해서 행하였다. 즉, microhemagglutination plate(Becton Dickinson)에 cellobiohydrolase(1 mg/ml)을 coating시킨 후 그 위에 항체를 희석시키면서, 흡착시키고 항원항체 반응을 시킨다. 반응하지 않은 항체 단백질을 세척시킨 후 토끼 항체에 면역특이성이 있는 alkaline phosphatase conjugated antirabbit IgG을 흡착시켜서, 흡착된 alkaline phosphatase의 역가를 측정함으로써 초기, cellobiohydrolase와 항원항체 반응을 한 항체의 양을 정량하였다. 이 때, OD 값은 ELISA reader로 측정하였고, 항체역가 단위는 OD 값이 1.0이 나올 때의 항체 희석배율로 표시하였다.

효소역가의 측정

효소역가는 전보(11)의 방법에 준하여 측정하였다. Endoglucanase(CMCase)은 1% carboxyl methyl cellulose salt 용액, exoglucanase(FPase)는 1×6cm 크기의 여지(Whatman No.1, 50mg)은 기질로 사용하며, 25mM citrate buffer(pH 4.8)에서, 50°C 항온 수조를 사용하여 효소반응을 한 후 환원당은 정량하여 효소역가를 측정하였다.

효소역가의 단위는 1분간에 1 μ mol의 glucose에 상당하는 환원당을 생산하는 효소의 양을 1단위로 표시하였다.

전기영동과 isoelectrofocusing

Immunoaffinity chromatography를 행한 후 단백질의 순수도, 분자량, 및 pI 값을 알아보기 위해서 전기영동은 Firgaira 방법(18), isoelectrofocusing은 Rodola 방법(19)에 준하여 행하였다.

결과 및 고찰

Cellobiohydrolase에만 유효한 IgG 분리

토끼에 cellobiohydrolase을 면역접종하여 얻은 항혈청에 대해서 항체역가를 ELISA 방법으로 측정한 결과 10⁸ 정도의 수치를 갖는 것을 알 수 있었고, 이 항혈청을 cellobiohydrolase가 coupling된 Sepharose 4B column에서 분리한 결과는 Fig.1과 같다.

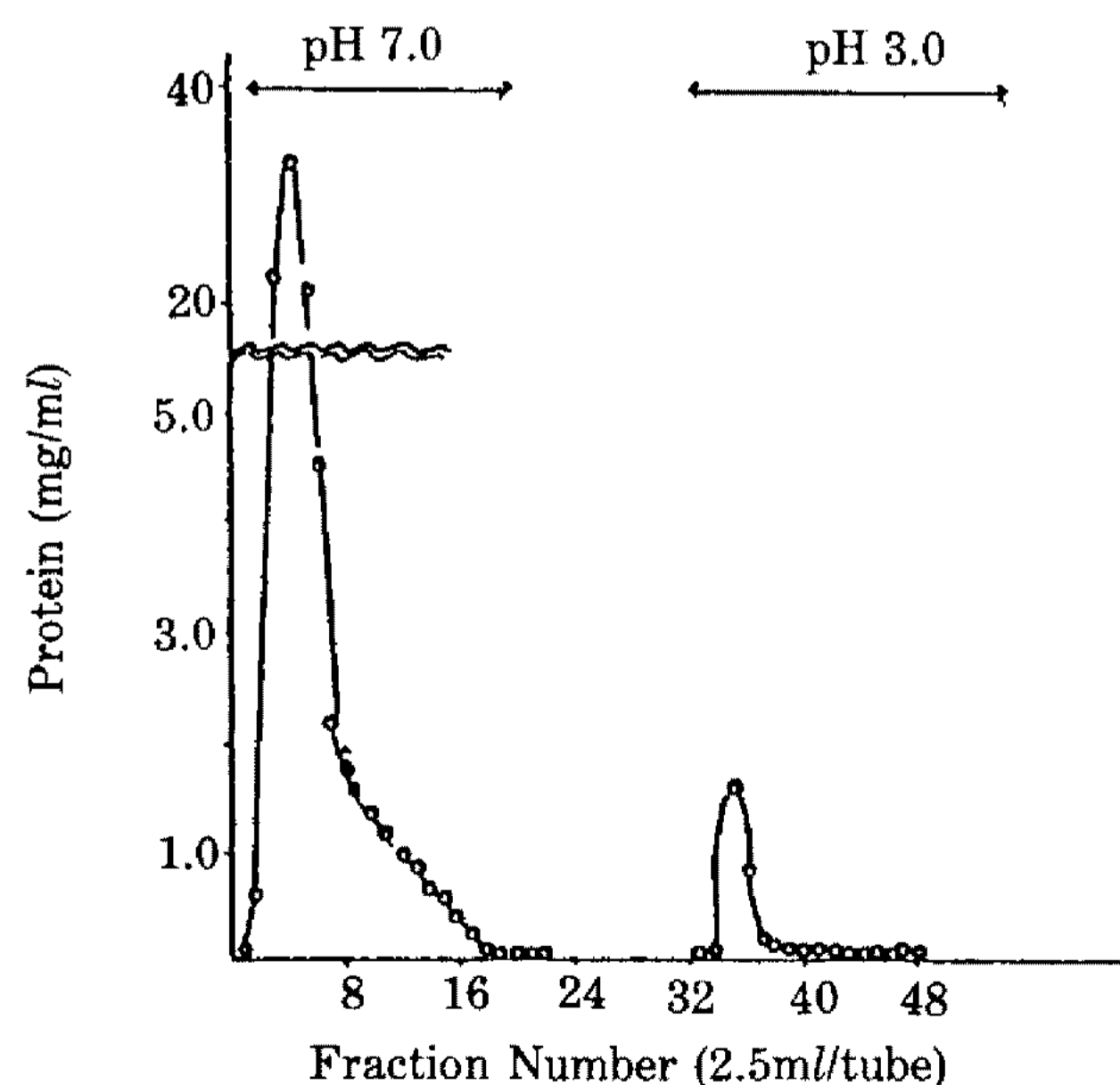
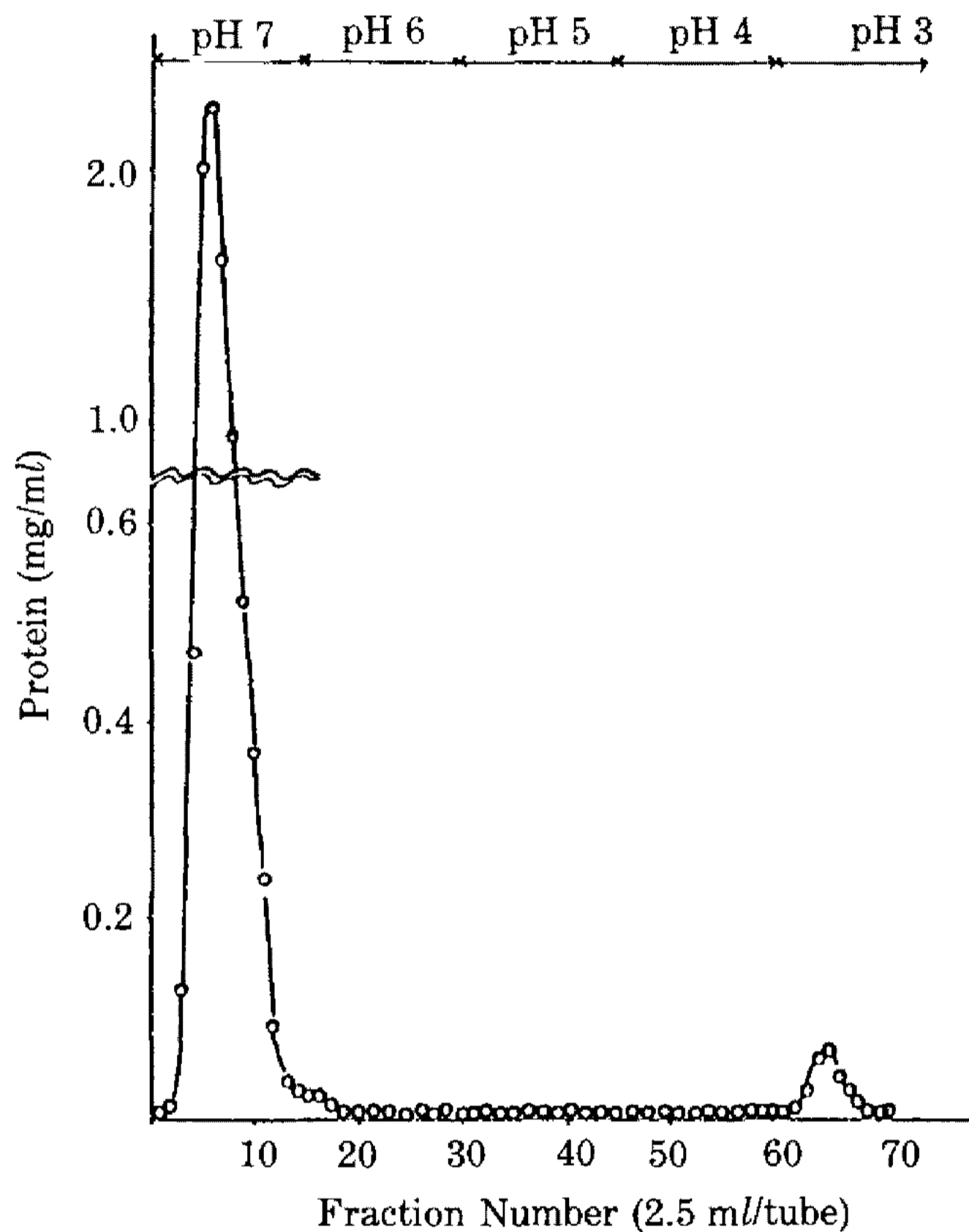


Fig. 1. Affinity chromatogram of rabbit antiserum using purified cellobiohydrolase as ligand

Table 1. Summary of immunoaffinity purification of crude antiserum against cellobiohydrolase .

Purification Step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Titer (ml)	Specific titer (/mg)	Purification fold
Crude antiserum	4	101	3.98×10^7	3.94×10^5	1
Affinity chromatography	12	1.1	0.66×10^7	0.60×10^7	15.2

**Fig. 2. Affinity chromatogram of crude cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* using cellobiohydrolase recognized IgG as ligand .**

pH 7.0의 buffer에서 비흡착된 단백질과 pH 3.0의 buffer에서 흡착 후 용출된 단백질의 2개 분획을 얻었고, 2개의 분획에 대해서 ELISA 방법으로 면역성을 조사한 결과 2번째 분획에서만 면역특이성을 가져서 이 부분의 단백질이 cellobiohydrolase에만 유효한 IgG로 판단할 수 있었다. 항혈청과 분리된 IgG의 정제도는 Table 1에서 보는 바와 같이 약 15배 정제되었다. 또한 cellobiohydrolase에만 유효한 IgG의 양은 총 항혈청 단백질의 3.26%로 계산되어서 Al-Sarraj 등(20)이 casein을 항원으로 얻은 1.4%보다 훨씬 높게 나타났는데, 이는 순수분리된 항원을 사용했기 때문으로 판단된다.

Cellobiohydrolase 분리

Table 2. Comparison of CMCase and FPase activities of the cellobiohydrolase purified by affinity and column chromatography .

Purification method	($\times 10^{-3}$ IU/ml)		
	CMCase	FPase	FPase CMCase
Affinity Chromatography	4.172	5.486	1.315
Gel and ion exchange Chromatography	3.675	4.434	1.207

CNBr activated sepharose 4B에 cellobiohydrolase에만 면역특이성이 있는 IgG를 ligand로 결합시킨 immunoaffinity column에 *T. viride*의 배양액을 가하여 chromatography를 행한 결과는 Fig. 2와 같이 pH 7.0의 buffer에서 항체에 면역친화성이 없는 단백질과 pH 3.0의 buffer에서 흡착된, 항체에 면역특이성이 있는 단백질을 분리할 수 있었다. Immunoaffinity chromatography에 의해서 분리한 단백질을 전보(11)에서 gel filtration, ion exchange chromatography 및 preparative electrophoresis에 의해서 분리한 cellobiohydrolase를 섬유소 분해효소의 기질을 달리하여 효소역가를 측정된 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 전보(11)에서 정제된 cellobiohydrolase의 특성과 동일하게 무정형 섬유소인 carboxymethyl cellulose 보담은 고결정성인 filter paper 분해력이 뛰어나 지금까지 발표된 cellobiohydrolase(3, 4)의 특성과 동일함을 알 수 있었다. 전보(11)에서 정제된 cellobiohydrolase와 비슷한 filter paper 분해력과 carboxymethyl cellulose 분해력의 비를 갖는 것으로 동일한 cellobiohydrolase를 분리한 것을 알 수 있다. 하지만, 정제하는데 걸리는 시간은 immunoaffinity chromatography을 행할 시는 2시간 이내에 가능한데 비해서, gel filtration, ion exchange 및 preparative electrophoresis을 사용한 전보(11)의 방법을 사용할 시는 2~3주일 이상의 장시간이 소요된다. 따라서, 대량으로 신속하게 cellobiohydrolase를 분리하여 특성을 연구할 시는 immunoaffinity chromato-

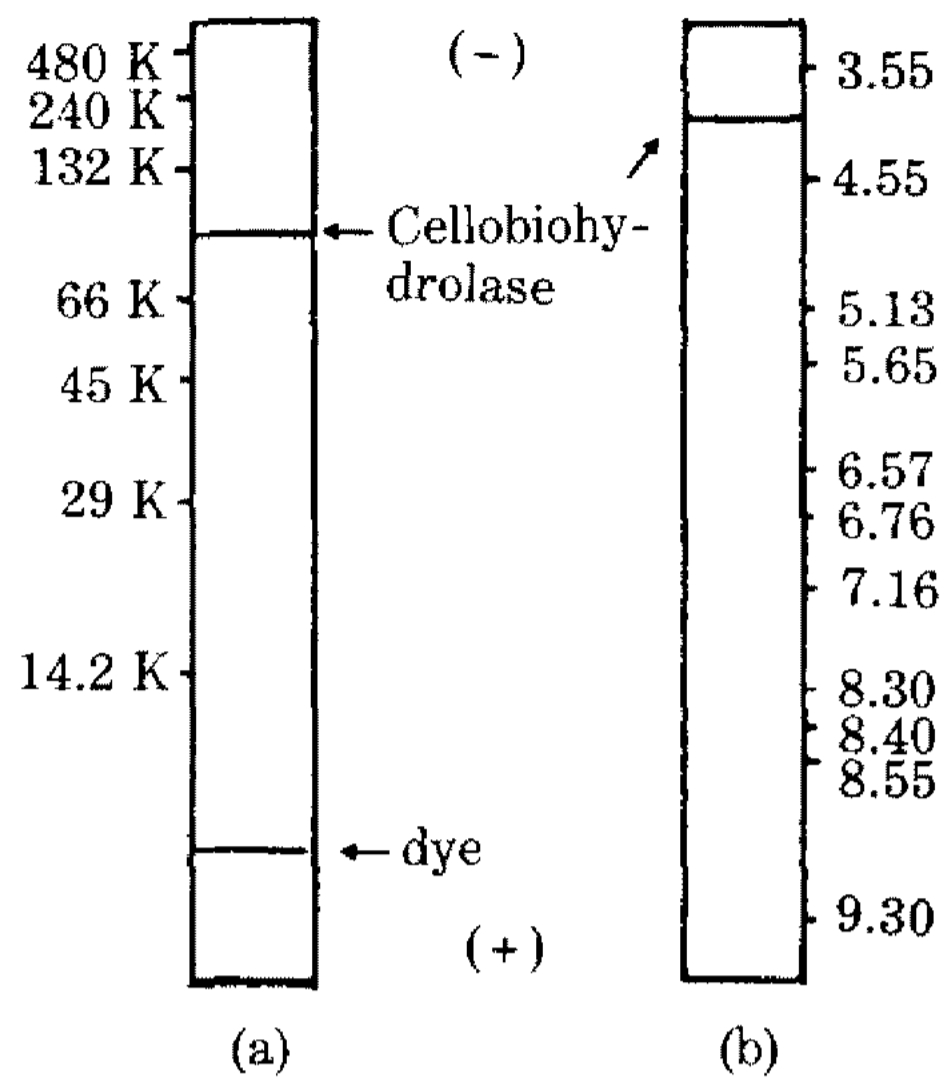


Fig. 3. Electrophoretogram (a) and isoelectrofocusing electrophoretogram (b) of immunoaffinity purified cellobiohydrolase from *Trichoderma viride* : molecular weight marker, 48 K: Urease (dimer), 240 K: Urease (monomer), 132 K: BSA (dimer), 66 K: BSA (monomer), 45 K: Albumin, 29 K: Carbonic anhydrase, 14.2 K: Lactalbumin, pI marker, 3.55: Amyloglucoside, 4.55: Trypsin inhibitor, 5.13: Lactoglobulin, 5.65: Carbonic anhydrase B 6.57: Carbonic anhydrase H, 6.76, 7.16: Myoglobin, 8.30, 8.40, 8.55: Lactic dehydrogenase, 9.30: Trypsinogen .

graphy 가 유리하다.

Immunoaffinity 정제된 cellobiohydrolase 의 순수도를 확인하기 위해서 전기영동과 isoelectrofocusing 을 행한 결과 Fig.3에서와 같이 단일 밴드를 가져서 순수하게 분리된 것을 알 수 있었고 표준단백질을 사용하여 분자량 및 pI 을 결정한 결과 각각 70,000 및 3.8로 나타났다. 이와 같은 결과는 오 등(11)이 분리한 cellobiohydrolase 와는 동일하고 Nummi 등(13)이 *Trichoderma reesei* 에서 분리한 분자량 65,000, pI 치가 4.2 인 cellobiohydrolase 와는 기질특이성이 다른 것으로 보아 본 보에서 분리한 cellobiohydrolase 와는 상이한 단백질을 알 수 있었다. 이상과 같은 결과에서 항체를 이용한 immunoaffinity chromatography 로 *T. viride* cellobiohydrolase 을 용이하게 분리할 수 있었으며, 분리된 cellobiohydrolase 는 무정형 섬유소보다 고결정성 섬유소에 특이성이 높고 정제결과, 단일단백질로 확인되었다.

요 약

Trichoderma viride 의 cellobiohydrolase 을 im-

munoaffinity chromatography 를 제조하여 조효소로부터 일단계로 용이하게 분리할 수 있었다. 분리된 cellobiohydrolase 는 전기영동과 isoelectrofocusing 상에서 단일단백질로 확인되었고, 분자량이 70,000, pI 치는 3.8 인 산성단백질이었다. 면역친화 정제된 cellobiohydrolase 는 무정형 섬유소보다는 고결정성 섬유소에 특이성이 높았다.

참고문헌

- Halliwell, G. and R. Vincen: *Biochem. J.*, **199**, 409 (1981)
- Wood, T.M. and S.I. McCrae: *Biochem. J.*, **171**, 61 (1978).
- Howell, J.A. and M. Mangat: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 847 (1978).
- Bisaria, V.S. and T.K. Ghose: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 90 (1981).
- Na, T.K., B.A. Ben and J.G. Zeikus: *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1337 (1981).
- Montenecourt, B.L. and D.E. Eveleigh: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**(6), 777 (1977).
- Shoumaker, S.P. and R.D. Brown: *Biochem. Biophys. Acta.*, **523**, 133 (1978).
- Pettersson, N.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 997 (1979).
- Brown, D.E. and M.A. Zainudeen: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 941 (1977).
- Ladich, M.R., K.W. Lim, M. Volch and G.I. Tsau: *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 82 (1983).
- Oh, T.K. and K.H. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), 219 (1988).
- Halliwell, G. and M. Griffin: *Biochem. J.*, **169**, 713 (1978).
- Nummi, M., M.-L. Niku-Paavola, A. Lappalainen, T. Enari and V. Raunio: *Biochem. J.*, **215**, 677 (1983).
- Håkansson, U., L.G. Fagerstam and L.G. Pettersson: *Biochem. J.*, **179**, 141 (1979).
- Oh, T.K., Y.H. Kho, J.I. Kim and K.H. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), 226 (1988).
- Dean, P.D.G, W.S. Johnson and F.A. Middle: *Affinity Chromatography*, IRL, Press, Oxford, 31 (1985).
- Engvall, E. and P. Perlmann: *Immunochemistry*, **8**, 871 (1971).
- Firgaira, F.A., R.G.H. Cotton and D.H. Danks: *Biochem. J.*, **197**, 31 (1981).
- Radda, B.: *Electrophoresis*, **1**, 43 (1980).
- Al-Sarraj, K., D.A. White and R.J. Mayer: *Biochem. J.*, **173**, 877 (1978).

(Received June 29, 1990)