

Trichoderma viride Cellulase의 돌연변이 과정 및 기질유도의 면역학적 연구

오태광* · 권기석

한국과학기술연구원 유전공학연구소

Immunological Studies on Mutation Process and Substrate Induction of *Trichoderma viride* Cellulase

Oh, Tae-Kwang and Gi-Seok Kwon

Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology,
P.O. Box 17, Taeduk Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — Mutation process and substrate induction of *Trichoderma viride* cellobiohydrolase were investigated by immunological techniques. Since mutants of *Trichoderma viride* such as QM9123, QM9414, TK041 and MCG77 produced immunologically same cellobiohydrolase, it may be that the mutation be occurred in the regulatory gene rather than in the structural gene of cellobiohydrolase. α -Cellulose and Solka Floc were found to be the best inducer for the production of cellobiohydrolase in *Trichoderma viride* culture compared to low molecular weight inducer such as carboxymethyl cellulose and cellobiose.

섬유소 분해효소 생산균주인 *Trichoderma viride*(1, 2)는 고결정성인 거대분자의 섬유소에 친화력이 높은 1,4- β -D-glucan cellobiohydrolase(3, 4)(이하, cellobiohydrolase로 표기)의 활성이 높다고 보고되고 있다. 섬유소로부터 식량, 화학약품 및 에너지를 얻기 위한 섬유소 분해의 실용화를 위해서 cellobiohydrolase의 고생산균으로 돌연변이(5, 6), constitutive 효소화(7), catabolite repression 저항성 균주개발(8, 9) 및 효소생산의 유도(1, 10)에 대한 연구가 부단히 이루어졌다. 이 중 cellobiohydrolase의 고생산균의 돌연변이(3)는 U.S. Army Natick Research와 Rutgers University에서 *Trichoderma viride* QM6 α 에서 각각 QM9414, MCG77과 C30T을 분리하였고, Nevalaine 등(11)은 QM9414을 이용해서 cellobiohydrolase의 역가가 3배 이상 강한 VTT-D-78035을 개발하였다.

섬유소 분해효소는 대부분 유도효소로 존재하지만

섬유소 자체가 거대분자이고 물에 대한 친화력이 낮아서 유도체로 되지 못한다는 보고(10)와 효소유도시 세포내의 cAMP의 농도가 상승되는데 실제로는, 불용성 섬유소를 유도체로 사용했을시 cAMP의 농도와 연관성이 없다는 보고(23)에서는 고분자의 섬유소가 유도체로 인정되기 어렵지만, 유도체로 사용한 불용성 섬유소에 작용하는 활성에너지가 유도체로 사용되지 않은 섬유소를 분해하는 것보다 적다는 결과(13)에서 불용성 섬유소가 유도체로 작용할 수 있음을 의미한다. 고분자 섬유소가 유도체로 작용할 수 있음은 세포와의 물리적 접촉에 의한 유도(14), 세포벽에 존재하는 섬유소 분해효소에 의한 유도(15) 및 constitutive cellobiase와 transglycosylation 역가에 의한 섬유소 분해효소 생산의 유도체인 sophorose의 생성에 의한 유도(16, 17) 등의 가설로 설명하고 있다. 진정한 유도체는 cellobiose(18), lactose(19) 및 sophorose(10, 20)로 제안되고 있지만, 이와 같은 섬유소 분해효소 유도도 생산균주(21)에 따라서 다르게 나타난다. 이상에서와 같이 고생산 돌연변이주의 개

Key words: *Trichoderma viride*, cellulase, mutation, induction immunological technique

*Corresponding author

발과 효소의 유도에 대한 연구는 많이 이루어졌지만, 효소단백생산시 어떤 부위에 돌연변이 되었는지, 또한 효소생산을 위한 진정한 유도체에 대한 연구가 부족하여 섬유소의 효소적 분해의 이용에 난점이 있는 실정이다. 본 연구에서는 전보(22)에서 얻어진 *Trichoderma viride* cellobiohydrolase에만 면역특이성이 있는 monospecific antibody를 이용해서 현재까지 많이 연구해온 *Trichoderma viride* 변이주(U.S. Army Natick Research, USA)의 cellobiohydrolase의 mutation process 중 변이를 조사하였고, 또한 고분자 섬유소와 저분자 당류의 첨가시 고분자 섬유소에 특이성이 높은 cellobiohydrolase 생산의 유도효과를 측정하였다.

재료 및 방법

재료

Cellobiohydrolase의 항체는 전보(22)에서의 항혈청을 cellobiohydrolase conjugated affinity column으로 분리한 monospecific antibody를 사용하였고 *Trichoderma viride*의 돌연변이주 QM9123, QM9414, TK 041 및 MCG77은 U.S. Army Natick Research(U.S. A)에서 분양받아서 사용하였고, wild type은 국내에서 분리하여 사용하였다. 액체 배양시 사용한 탄소원으로는 고결정성 섬유소로는 α -cellulose(Sigma) 및 Solka Floc(James River), 저분자 당류로는 cellobiose(Sigma) 및 glucose를 사용하였다.

효소액의 배양

효소액의 배양은 Mandels(23)의 방법에 의해서 행하였다. 기본배지에 탄소원으로 glucose, cellobiose, α -cellulose 및 Solka Floc을 사용하였고 돌연변이 균주간의 효소생산성을 조사할 때는 공히 α -cellulose를 사용하였다. 발효는 진탕배양기(Yamato사, Japan)에서 28°C, 90 pairs/min의 속도로 배양하였다.

Ouchterlony의 이중확산법

돌연변이된 균주의 배양액이나 유도하는 탄소원을 달리한 배양액의 cellobiohydrolase의 면역적 특성을 조사하기 위해서 면역이중확산법(24)을 사용하였다. Agarose 1%와 polyethylene glycol 4,000 3% 용액을 microslide 위에 부어서 굳힌 후, 고형화된 gel에 0.5

cm의 원형 well을 중심으로 중심간의 거리가 0.85 cm인 원형 well을 정육각형으로 배치되게 하여 면역이중확산용 판을 만들었다. 중심 well에 항체를 20 μ 넣고 주변의 6개의 well에 반응시키고자 하는 시료를 넣고서 humid chamber에서 하룻밤 방치 후 면역침전선의 발생여부, 침전선의 모양에 따라서 시료의 면역적 특성을 조사하였다.

Cellobiohydrolase의 정량

배양액 중 cellobiohydrolase는 ELISA 방법(22)에 의해서 행하였다. 즉, 바닥이 평평한 microhemagglutination plate(Becton, Dickinson)에 배양액을 희석하여 coating한 후 토끼에서 얻어진 cellobiohydrolase의 항체를 37°C에서 반응시키고 반응치 않은 항체를 세척한다. 토끼의 항체에 면역특이성이 있는 alkaline phosphatase conjugated antirabbit goat IgG을 흡착시켜서 흡착된 alkaline phosphatase의 역가를 측정함으로 초기에 cellobiohydrolase의 양을 결정하였다.

효소역가의 측정

효소의 역가는 Mandels(23)의 방법에 준하여 측정하였다. Endoglucanase(CMCCase)는 1% carboxyl methyl cellulose salt 용액, exoglucanase는 1×6 cm 크기의 여지(Whatman No. 1)을 기질로 사용하여, 25 mM citrate buffer(pH 4.8)에서, 50°C의 항온 수조를 사용하여 효소반응을 한후 환원당을 정량하여 효소역가를 측정하였다. 효소역가의 단위는 1분간에 1 μ mol의 glucose에 해당하는 환원당을 생산하는 효소의 양을 1단위로 표시하였다.

결과 및 고찰

돌연변이 균주간의 cellobiohydrolase 특성조사

국내에서 분리된 야생균주와 U.S. Army Natick Research에서 개량한 *Trichoderma viride*의 QM9123, QM9414, TK041, MCG77을 플라스크내에서 발효기간별로 시료를 채취하여 효소역가를 측정해 본 결과 Table 1에서와 같이 나타났다. Filter paper degradation activity(이하 FPase 활성으로 표기)는 QM9414와 MCG77이 가장 높았고 국내에서 선발된 야생균주가 활성이 가장 낮았다. 그러나, carboxyl methyl cellulose 분해력(이하 CMCCase 활성으로 표기)은

Table 1. Comparison of Cellulase activity against different substrate among *Trichoderma viride* mutants
(Unit: IU/ml)

Substrate Mutants Culture time	Filter paper					Carboxyl methyl Cellulose salt				
	Wild	QM9123	TK041	MCG77	QM9414	Wild	QM9123	TK041	MCG77	QM9414
2 days	0	0.016	0.015	0.025	0.028	0.092	0.088	0.007	0.108	0.152
5 days	0.025	0.044	0.102	0.155	0.154	0.108	0.139	0.113	0.150	0.144
7 days	0.035	0.082	0.102	0.182	0.203	0.155	0.151	0.147	0.223	0.166

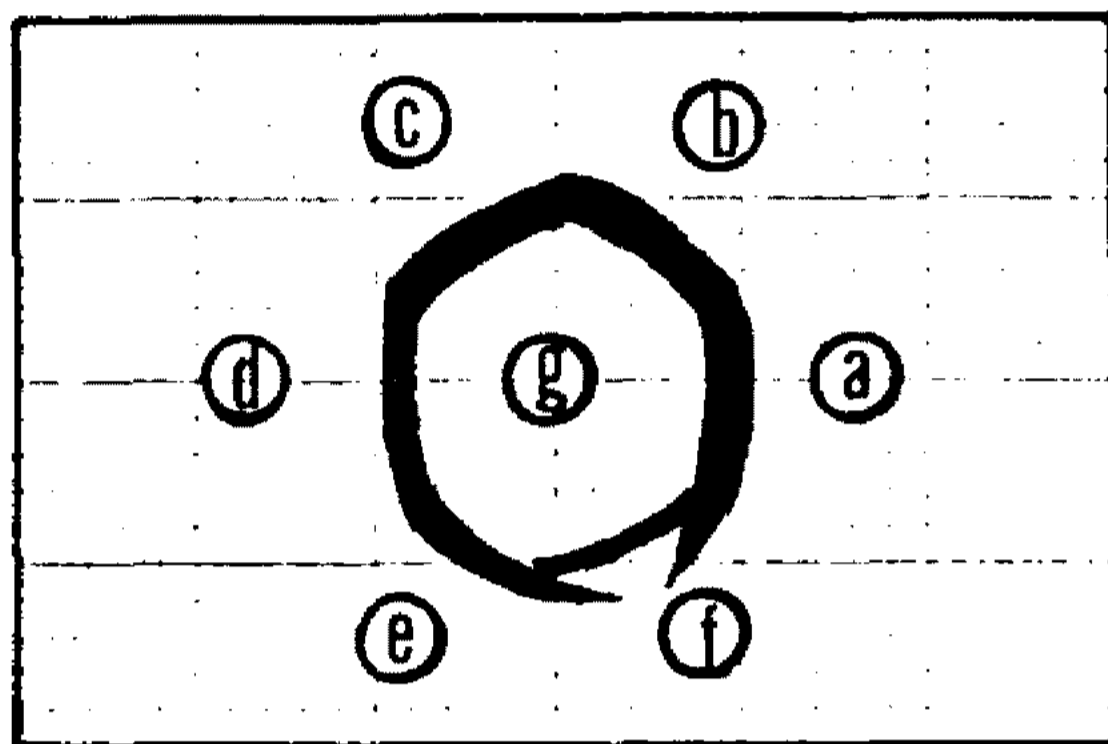


Fig. 1. Double immunodiffusion of the culture filtrate of *Trichoderma viride* mutants against antibody of cellobiohydrolase.
a: cellobiohydrolase, b: QM9123, c: QM9414, d: TK041, e: MCG77, f: wild, g: antibody of cellobiohydrolase from *Trichoderma viride* QM9414.

발효초기에는 활성차이가 있었지만 발효 7일 이후는 모든 실험균주에서 비슷한 양상을 보였다. 이와 같은 결과는 Vaheri 등(16)과 Montenecourt 등(25)의 결과와 유사하고, 결론적으로 균주의 돌연변이는 고분자 섬유소인 여지에 붕괴력을 높이는 방향으로 진행되었음을 알 수 있다. 일반적으로 고분자의 섬유소에 특이성이 높은 섬유소 분해효소를 cellobiohydrolase로 보고(2,4)하고 있어서 각 변이주를 5일 동안 배양한 배양액에 전보(22)의 항혈청에서 affinity purify하여 얻어진 cellobiohydrolase에만 면역특이성이 있는 monospecific antibody를 이용해서 면역이중확산을 시킨 결과 Fig.1에서와 같이 나타났다. *Trichoderma viride*을 이용하여 U.S. Army Natick Research에서 만든 변이주간에는 면역특성이 동일한 cellobiohydrolase를 생산하는 것을 알 수 있었지만 국내에서 분리한 wild type은 항체가 면역특이성이 극히 높은 polyclonal antibody(22)인 것으로 보아 면역학적 부분구조가 동일한 특성이 다른 cellobiohydrolase을 생산함을 알 수 있었다.

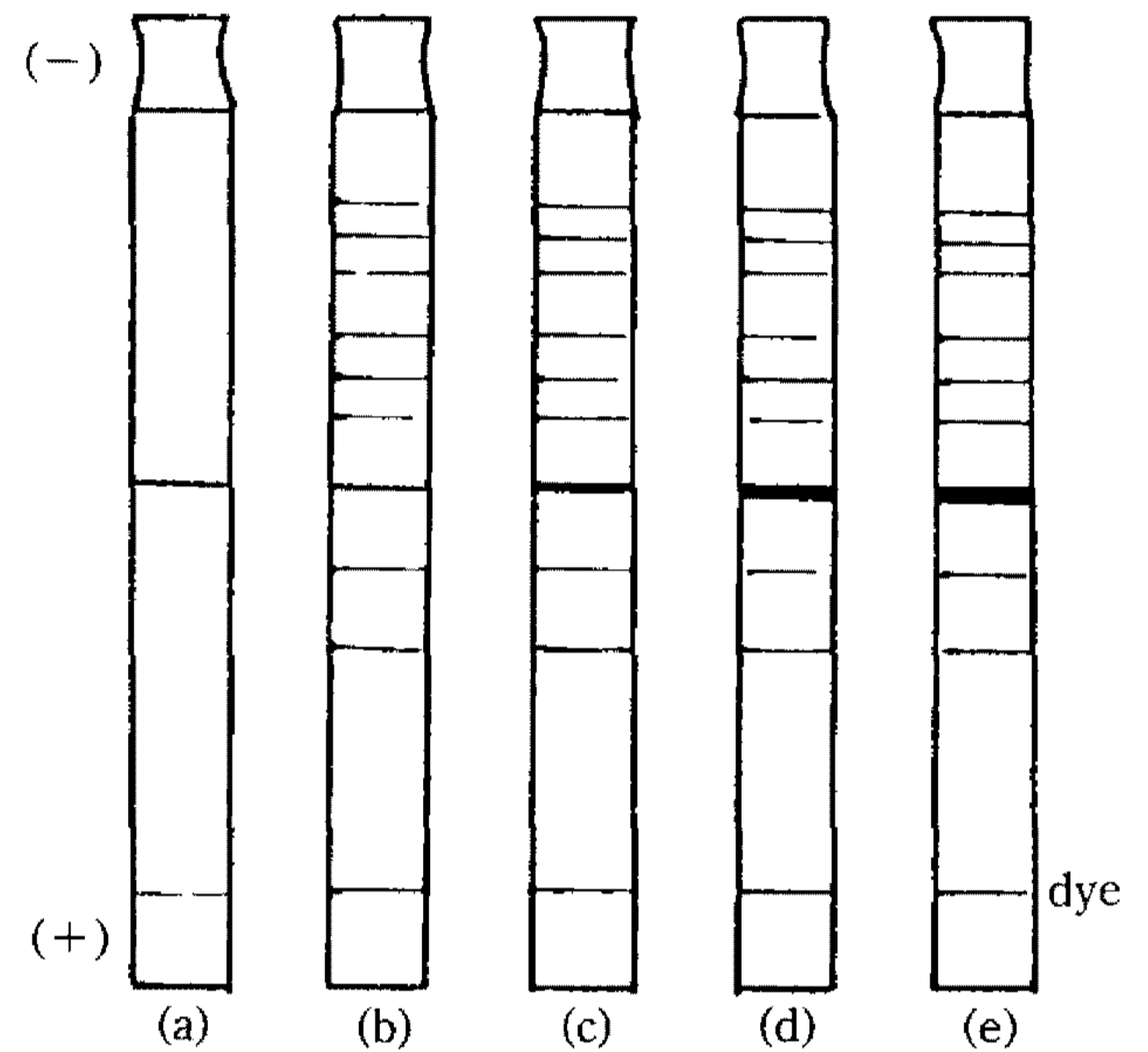


Fig. 2. Electrophoretograms of the culture filtrate of *Trichoderma viride* mutants.
(a) purified cellobiohydrolase, (b) QM9123, (c) TK041, (d) MCG77, (e) QM9414.

Pettersson 등(26)은 *Trichoderma viride*의 변이균주인 Rut-NG14, Rut-C30, MCG77 및 QM9414의 배양에서 동일한 면역반응을 보이지만 변이균주간에 효소생산량이 다르다는 보고와 일치하였고 각 변이균주의 5일 배양을 전기영동한 결과 Fig.2에서와 같이 변이균주간의 단백질 band 형태는 변화하지 않고 각 단백질 band의 양이 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 전기영동 결과는 Zhu 등(10)의 결과와 일치한다. 또한, 각 변이주를 ELISA 방법으로 전보(22)에 나타난 표준곡선을 활용하여 cellobiohydrolase의 양을 정량한 결과 Table 2에서와 같이 Table 1에 나타난 FPase 활성이 높은 것이 cellobiohydrolase의 양이 10일 동안 충분히 발효한 후에도 많음을 알 수 있었다. 따라서 이상과 같은 결과에서 *Trichoderma viride*의 변이주의 개량은 cellobiohydrolase을 생산하는 구조유전자의 변이에 의해서 효소활성이 높아진 것이 아니고 조절

Table 2. Cellobiohydrolase assay of various *Trichoderma viride* mutants by ELISA after 10 days fermentation.
(Unit: mg/ml)

Mutants	Cellobiohydrolase quantities
QM9123	0.087
TK041	0.120
MCG77	0.338
QM9414	0.345

유전자의 변이로 인하여 cellobiohydrolase가 많이 생산되는 쪽으로 개량되었음을 알 수 있다.

기질에 의한 cellobiohydrolase의 유도효과

기질이 cellobiohydrolase의 생산에 미치는 유도효과를 알기 위해서 탄소원으로 glucose, cellobiose, CMC, Solka Floc 및 α -cellulose을 넣고서 *Trichoderma viride* QM9414를 배양한 후 배양액을 cellobiohydrolase에만 특이성있는 항체에 대해서 면역이중확산법을 행한 결과 Fig. 3과 같이 나타났다. 기질이 고분자의 α -cellulose와 Solka Floc의 경우는 배양 5일 이후부터 cellobiohydrolase의 항체와 면역침전 반응이 뚜렷이 나타나는데 비해서 glucose을 탄소원으로 첨가했을 때는 세포의 성장은 왕성하게 일어났지만 cellobiohydrolase가 생산되지 않다가 glucose가 거의

소비되고 난 9일 발효 이후 면역적으로 차이가 있는 cellobiohydrolase의 유사물질이 생성되었다. 저분자의 cellobiose와 CMC을 처리했을 때는 면역특이성이 약간 다른 물질이 발효초기부터 생겼지만 발효후기에 면역특이성이 같은 cellobiohydrolase가 생성됨을 알 수 있었다. 이와 같이 면역특이성이 약간 다른 단백질의 생성은 Zhu 등(10)이 보고한 저분자 알콜 첨가시 원래의 cellobiohydrolase와 전기영동상에서는 같게 나타나나 등전점이 다른 효소가 생산된다는 결과와 유사하게 설명될 수 있다. 이상과 같은 결과에서 고분자 섬유소의 경우는 발효초기부터 cellobiohydrolase가 강력하게 유도됨을 알 수 있는데 비해 저분자의 cellobiose와 CMC을 사용할시는 발효 초기에는 면역 특성이 다른 cellobiohydrolase의 유사물이 생산되고 발효 후기에 cellobiohydrolase가 유도됨을 알 수 있다. 즉 고분자 섬유소인 α -cellulose와 Solka Floc에 의해서 유도되는 cellobiohydrolase의 기작과 저분자 CMC 및 Cellobiose에 의해서 유도되는 것과는 다름을 알 수 있었고 고분자의 불용성 섬유소가 cellobiohydrolase의 유도에 중요한 역할을 하고 이는 주로 세포의 표면에서 섬유소 분해효소가 유도 및 생합성에 중요하다는 Berg 등(27)의 실험과 일치한다. 또한 glucose는 cellobiohydrolase 생산에 강력한 저해효과를 가짐을 알 수 있었다.

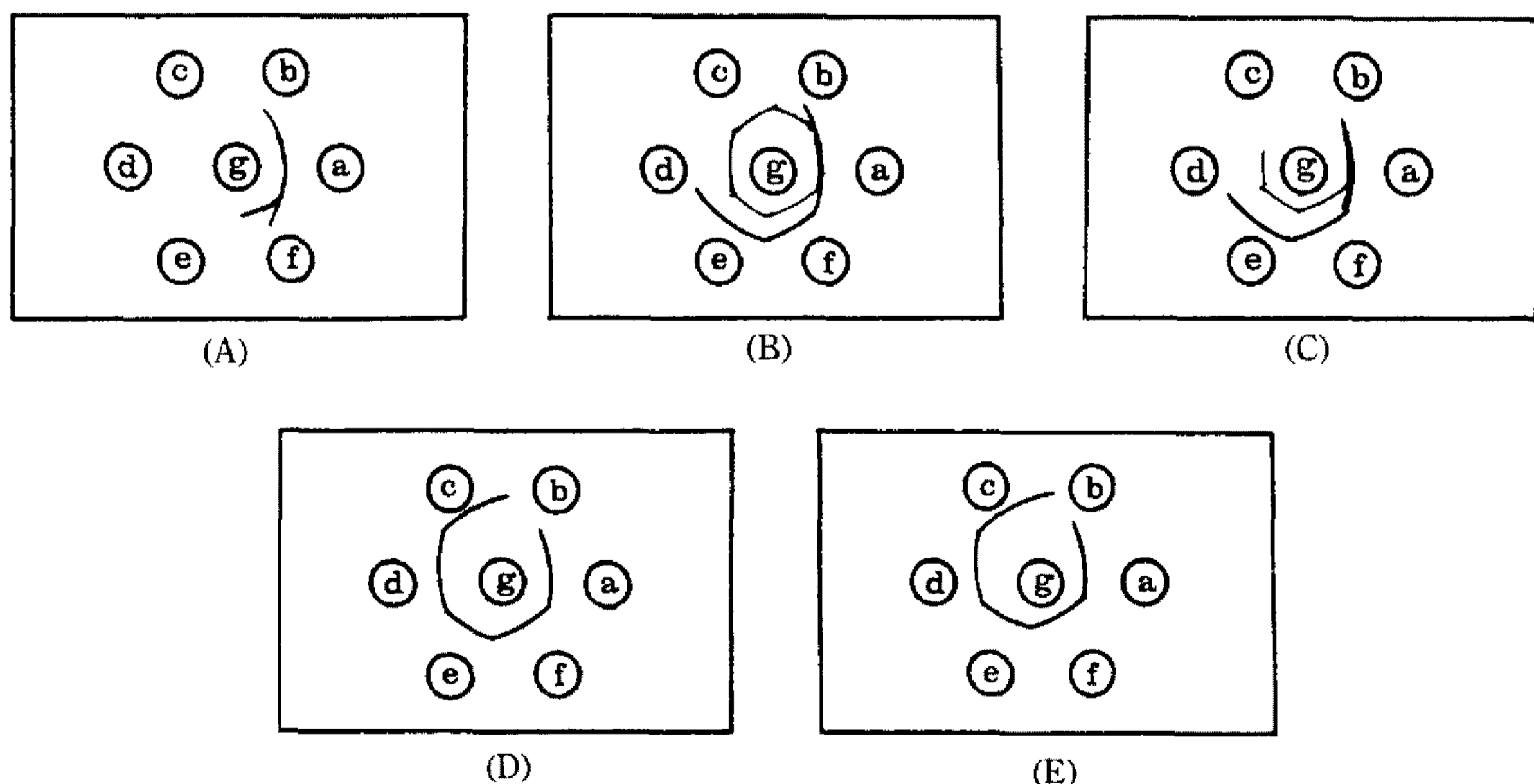


Fig. 3. Double immunodiffusion of crude cellulase from *Trichoderma viride* QM9414 incubated with different carbon source against antibody of cellobiohydrolase according to fermentation time; Carbon source: glucose.
(A), cellobiose (B), carboxyl methyl cellulose (C), Solka Floc (D), and α -cellulose (E), Diffusion wells; a: cellobiohydrolase, b: 5-day, c: 6-day, d: 7-day, e: 8-day, f: 9-day fermentation, g: antibody of cellobiohydrolase.

요 약

*Trichoderma viride*의 변이주인 QM9123, QM9414, TK041 및 MCG77은 면역학적으로 동일한 cellobiohydrolase을 분비하는 결과로서 변이균주간은 구조 유전자는 동일하나 조절유전자가 변이했음을 알 수 있었고 탄소원의 cellobiohydrolase의 유도효과는 고분자 섬유소인 α -cellulose와 Solk Floc의 가장 좋은 유도체였고, 저분자 유도체인 cellobiose와 CMC에 의해서 유도되는 형식이 다름을 알았다.

참고문헌

- Grous, W., A. Converse, H. Grethlein and L. Lynd: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 463 (1985)
- Oh, T.K. and K.H. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), 219 (1988)
- Bisaria, V.S. and T.K. Ghose: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 90 (1981)
- Wood, T.M. and S.I. McCrae: *Biochem. J.*, **171**, 61 (1978)
- Montenecourt, B.S. and D.E. Eveleigh: *Adv. Chem. Ser.*, **181**, 279 (1979)
- Bailey, M.J. and K.M.H. Nevalainen: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 153 (1981)
- Roy, S.K., S.K. Raha, S.K. Dey and S.L. Chakrabarty: *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 710 (1990)
- Labudosa, I. and V. Farkas: *FEMS Microbiol. Lett.*, **20**, 211 (1983)
- Kubicek-Pranz, E.M., S. Vollenhofer, C. Fritscher, A. Plicka, W.A. Hampel and C.P. Kubicek: *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 39 (1991)
- Zhu, Y.S., Y.Q. Wu, W. Chen, C. Tan, J.H. Gao, J.X. Fei and C.N. Shin: *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 3 (1982)
- Nevalainen, K.M.H., E.T. Palva and M.J. Bailey: *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 59 (1980)
- Montenecourt, B.S., S.D. Nhlapo, H. Trimino-Vazquez, S. Cuskey, D.H.J. Schamhart and D.E. Eveleigh: *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals* (Hollaender, A., Ed), Plenum Press, N/Y, 35 (1981)
- Zhu, Y.S. and C. Tan: *Acta. Phytophysiologia Sinica*, **4**, 1 (1978)
- Berg, B. and L.G. Pettersson: *J. Appl. Bacteriol.*, **42**, 65 (1977)
- Kubicek, C.P.: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **13**, 226 (1981)
- Vaheri, M.P., M.E.O. Vaheri and V.S. Kauppinen: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 73 (1979)
- Gritzali, M. and R.D. Brown Jr.: *Adv. Chem. Ser.*, **181**, 237 (1979)
- Mandels, M. and E.T. Rheese: *J. Bacteriol.*, **79**, 816 (1960)
- Nisizawa, T., H. Suzuki and K. Nisizawa: *J. Biochem.*, **70**, 387 (1971)
- Laewenberg, J.R. and C.M. Chapman: *Arch. Microbiol.*, **113**, 61 (1977)
- Eriksson, K.-E. and Hamp, S.G.: *Eur. J. Biochem.*, **90**, 183 (1978)
- Oh, T.K., Y.H. Kho, J.I. Kim and K.H. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(3), 226 (1988)
- Mandels, M.: *Laboratory Procedures in Growth, Enzyme Measurement and Related Analytical Procedures*, Int. Course-Cum-Symp., New Delhi, India (1977)
- John, A. and R. Thorpe: *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications (1982)
- Montenecourt, B.S., T.J. Kellether and D.E. Eveleigh: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **10**, 47 (1981)
- Pettersson, N., J. Medeiros and M. Mondels: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1091 (1977)
- Berg, B. and G. Pettersson: *J. Appl. Bacteriol.*, **42**, 65 (1977)

(Received April 18, 1991)