

## Chitosanase를 생산·분리하는 *Bacillus* sp. HSB-21의 분리 및 효소 특성

김성균, 송희상<sup>†</sup>, 김동성, 신중환, 방원기<sup>†</sup>, 최용복  
(주)효성 화학연구소 BIO연구팀, 고려대학교 응용생명환경화학과<sup>†</sup>  
전화 (031) 428-1483, FAX (031) 454-0089

In order to obtain microbial endochitosanase for enzymatic production of chito-oligosaccharides from chitosan, we screened four microbes from soil and selected *Bacillus* sp. HSB-21 which showed highest activity. Chitosanase, produced from isolating microbe, was endo-type and molecular mass of the enzyme was estimated as 21,000 by active staining. Its optimum pH and temperature were 5.5 and 50°C, respectively. It was stable in the pH range of 3.0 to 8.0 and up to 40°C. It did not produce chitomonosaccharide and produced chitooligosaccharide ranging from chitobiose to chitooctose as major end-products from chitosan. The chitosanase from *Bacillus* sp. HSB-21 can be applicable to enzymatic production of chitooligosaccharide which has high degree of polymerization .

### 서 론

키토산은 D-glucosamine이 β-1,4 결합으로 연결된 무색, 무취의 천연고분자 다당체로서 항암 효과, 혈중 콜레스테롤치 저하, 혈당 조절, 고혈압 억제, 간기능 향상, 면역 활성화, 장기능 활성화 등의 기능성을 지니고 있어 산업적으로 많이 이용되고 있다<sup>1,2)</sup>. 그러나 점성이 높고 중성의 물에 녹지 않는 문제가 있어 키토산을 분해하여 수용성 키토산 올리고당으로 제조하여 많이 이용하고 있다. 특히 6 이상의 중합도를 가진 키토산 올리고당의 경우 항암 및 항균작용과 면역증강 등에 큰 효과를 보이는 것으로 밝혀져<sup>3)</sup> 높은 중합도를 가진 키토산 올리고당의 제조 필요성이 증가하고 있다. 수용성 키토산 올리고당의 제조방법으로는 산분해법<sup>4)</sup>과 효소분해법<sup>5)</sup>이 이용되고 있는데, 산분해법의 경우 수율이 낮고, 저중합도의 올리고당이 주로 생산되는 문제점이 있다. 효소분해법의 경우 사용 효소와 공정 조절에 의해 높은 수율의 고중합도 올리고당의 생산이 가능하다. 본 연구에서는 chitosanase를 생산하는 새로운 균주를 분리 및 선별하였고, 이 균주의 배양조건과 효소의 특성을 규명하였으며, 고중합도의 키토산 올리고당의 생산가능성을 확인하였다.

### 재료 및 방법

### **Chitosanase 생산균주 탐색**

미생물 분리를 위해 경기도 지역에서 채취한 토양 sample을 0.85% 생리식염수에 넣고 진탕한 후 여과하고, 희석된 여과액을 LB plate에 도말하여 30°C에서 배양하여 미생물을 분리하였다. 분리된 미생물중 0.5% 키토산 용액을 포함하는 soft agar에서 투명환을 형성하는 미생물을 1차 분리한 다음, 분리된 미생물을 LB broth에 배양하여 배양상등액의 chitosanase 활성을 측정하였다. Chitosanase의 활성은 키토산용액으로부터 생성되는 환원당의 양을 ferricyanide용액을 사용한 Schales법에 따라 측정하여 결정하였으며, 효소 활성단위(U)는 분당 1  $\mu$  mole의 D-glucosamine을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

### **분리균주 HSB-21의 동정 및 배양조건 연구**

HSB-21의 동정은 균체의 지방산 분석법(생명공학연구소 유전자은행) 및 Bergey's manual of systematic bacteriology방법으로 수행하였다. 선발된 균에 대한 탄소원, 배양온도 등의 배양조건을 탐색하였으며, 50 L의 LB배지를 이용하여 75 L 발효조(코바이오텍)에서 30°C, 150 rpm, 1 vvm의 조건으로 대량배양을 실시하였다.

### **Chitosanase 활성염색**

Criterion gel system(BIO-RAD)를 사용하여 10-20% polyacrylamide gel을 50 mA에서 90분간 전기영동한 후 활성염색<sup>6)</sup>을 실시하여 band를 확인하였다.

### **키토산 분해반응 및 HPLC 분석**

4.5% 키토산용액에 75 U의 키토산아제를 첨가하여 45°C에서 200 rpm으로 진탕하면서 반응시켰다. 반응중 시료를 채취하여 HPLC(Shimadzu)를 이용, 분석하여 키토산올리고당 조성을 확인하였다. 시료를 0.22  $\mu$ m filter로 여과한 후 TSK-GEL Amide-80 column(Tosoh)을 이용하여 분석하였다. 250 mM phosphoric acid와 acetonitrile을 55 : 45로 혼합하여 mobile phase로 사용하여 0.7 ml/min의 유속으로 40°C에서 분리하였다.

## **결과 및 고찰**

### **Chitosanase 생산 균주 분리 및 동정**

토양으로부터 530여 종의 미생물을 분리하였으며, 이들중 키토산을 분해하는 균주 37종을 1차분리하였다. 1차분리한 균주가 생산한 chitosanase 활성을 측정하고, 1% 키토산용액과의 반응산물을 HPLC로 분석한 결과 유망한 chitosanase 생산균주 4종(HSB-21, 23, 31, 43)을 선발하였으며, 그중 가장 유망한 균주는 HSB-21이었다. 분리균주 HSB-21는 그람 양성 포자 형성 간균으로 지방산 분석 및 생화학적, 형태적 특성을 분석한 결과 *Bacillus*속에 속하는 것으로 판명되었다.

### **분리균주의 배양조건 및 chitosanase의 생산**

탄소원 종류에 따른 효소 생산성을 실험한 결과 soluble starch를 사용할 때 최대 생산성을 보였다. 배양온도의 경우 30℃에서 가장 높은 효소생산성을 보였다. 효소의 대량생산을 위하여 75 L 교반식 발효조에 배양한 경우 배양 18시간째에서 약 22 U/ml의 효소를 생산할 수 있었다. 상등액을 회수하여 chitosanase의 활성을 측정된 결과 18.7 U/ml이었고, 총 활성은 617,100 U이었다. 상등액을 분자량 cut-off 100,000과 10,000의 membrane을 이용하여 5 L까지 농축한 후 측정된 효소활성은 84.5 U/ml이었으며, 총 chitosanase 활성은 422,500 U였다.

### Chitosanase의 특성

균주의 growth curve와 activity curve를 측정한 결과 효소의 생산은 growth-dependent인 것으로 확인되었다. 또한 키토산 분해반응시 1당을 전혀 생산하지 않고 대부분 2당 이상의 키토산 올리고당을 생산하는 분해 양상을 보여 endo-type의 효소라는 것을 알 수 있었다. HSB-21 균주가 생산하는 효소의 특성을 조사한 결과 최적 pH와 온도는 각각 5.5와 50℃이었으며, pH 안정성을 조사한 결과 pH 3.0~8.0의 범위에서 안정하였다. 온도 안정성은 40℃에서 16시간까지 80% 이상의 활성을 유지하였으나, 50℃에서는 12시간 경과 후 약 80%의 효소활성이 실패되었다. 효소를 SDS-PAGE후 활성염색하여 분자량을 확인한 결과 분자량 21,000인 것으로 확인되었다.

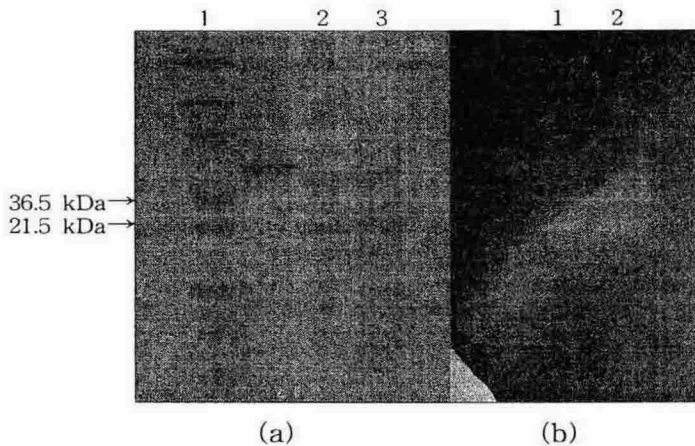


Fig. 1. SDS-PAGE of chitosanase produced by *Bacillus* sp. HSB-21  
 (a) Silver staining. Lanes : 1. marker 2. culture supernatant 3. cut-off 10,000  
 (b) Active staining. Lanes : 1. culture supernatant 2. cut-off 10,000

### 키토산올리고당의 생산

4.5% 키토산용액에 75 U의 chitosanase를 반응시킨 후 HPLC로 분석하여 올리고당 조성을 조사하였다. 반응시간이 길어질수록 2~8당 함량이 증가되어 16시간에는 60%를 넘었으며, 생리활성이 높은 것으로 알려져 있는 5당 이상의 키토산올리고당의 비율은 점점 감소하는 경향을 보였다. 키토산올리고당 생산 공정에 적용하여 생산

된 올리고당의 조성을 분석한 결과 일본에서 생산되는 효소와 비슷한 함량을 보이는 것을 확인하였다.

Table 1. Composition of chitooligosaccharide

	C2~C8* in chitooligosaccharide (%)	Composition in C2~C8 (%)	
		C2~C4	C5~C8
K. Co. (Japan)	67	42	58
<i>Bacillus</i> sp. HSB-21	65	43	57

\*C2, chitobiose; C4, chitotetraose; C5, chitopentaose; C8, chitooctaose

### 요 약

키토산으로부터 키토산 올리고당을 생산하기 위한 유용 효소원을 개발하기 위해서 토양에서 4종의 미생물을 분리하였으며, 가장 높은 활성의 chitosanase를 생산하는 *Bacillus* sp. HSB-21 균주를 선정하였다. 분리균주로부터 생산된 chitosanase는 endo-type의 효소로 분자량이 약 21,000이었다. 최적 pH와 온도는 각각 5.5, 50°C 이었으며, pH 3~8 범위와 40°C까지 비교적 안정한 효소로 나타났다. 본 효소는 키토산을 분해하여 단당을 형성하지 않았으며 주로 2~8당을 포함하는 키토산 올리고당을 만들었다. 그러므로 본 효소는 고중합도 키토산 올리고당의 생산을 위한 응용 가능성이 큰 것으로 판단된다.

### 참 고 문 헌

1. 日本工業技術協會, "키토산, 키토산 올리고당의 개발과 현황. 키토산, 키토산의 개발과 응용"(1987), pp. 110-137, 공업기술회(일본)
2. 키토산 연구회, "키토산, 키토산의 응용"(1990), pp. 71-98, 枝報堂(일본)
3. Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki, "Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose"(1986), *Carbohydr. Res.*, 151, 403-408
4. Rupley, J. A., "The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme"(1964), *Biochim. Biophys. Acta*, 83, 445-455
5. 大宝明 等, "키토산 올리고당의 제조법"(1985), 일본특허공보 召62-30103
6. 최연진, 김은정, 김영수, 신용철, "키토산 올리고당 생산을 위한 키토산 분해효소의 개발"(1997), 한국 키토산·키토산 연구회지, 2, 40-48