

Aeromonas salmonicida YA7-625가 생산하는 Chitinase의 활성부위 특성

이강표* · 최선진 · 문순옥¹ · 오두환
연세대학교 식품공학과, ¹수원대학교 유전공학과

Properties of Active Sites of Chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625

Lee, Kang-Pyo*, Sun-Jin Choi, Soon-Ok Moon¹ and Doo-Hwan Oh

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Department of Genetic Engineering, Suwon University, Suwon 445-890, Korea

Abstract — To investigate the characteristics of active sites of the chitinase isolated from *Aeromonas salmonicida* YA7-625, effects of various chemicals on the enzyme activity were analyzed. Hg^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} ions inhibited the activity of chitinase, while Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Mg^{2+} ions at 1 mM stimulated enzyme activity. The chitinase was not inhibited by sulfhydryl agents, phenylglyoxal, and hydroxylamine, but was inhibited by iodine and N-bromosuccinimide. The pK_{s1} and pK_{s2} values of chitinase were 4.04 and 10.10, respectively. These results suggested that the chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625 contains histidine, tyrosine, and tryptophan at the active center.

해양무척추동물, 곤충, 곰팡이 등에 의해서 대량으로 생합성(1)되고 있는 chitin은 주로 절족류, 강장동물, 연체동물 및 선충류 등 하등동물 껍질의 20~50%, 균류와 조류 등의 하등식물 세포벽에 45%까지 존재하고 있다(2, 3). 이러한 chitin 물질의 분해와 관련하여 chitinase에 대한 관심이 높아지고 있으며 (4) 이를 이용한 새로운 유용물질 개발에 대한 연구가 진행되고 있다. Carroad와 Tom(5, 6) 및 Cosio 등(7)은 수산폐기물인 게와 새우껍질에 함유되어 있는 chitin에 chitinase를 작용시켜 single cell protein을 생산하고자 시도하였으며, Yabuki와 Kasai(8)는 chitinase의 곰팡이 세포벽 분해능을 이용한 protoplast의 제조에 대하여 보고하였다.

본 연구에서는 전보(9)에서 분리, 정제한 *Aeromonas salmonicida* YA7-625의 chitinase에 대한 물리화학적 특성, 수소이온농도가 효소활성중심의 prototrophic group에 미치는 영향을 검토하여 효소의 특성을

규명하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 정제효소

토양에서 분리한 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase를 전보(9)에서와 같은 방법으로 배양, 분리 및 정제하여 사용하였다.

Chitinase의 활성 측정

전보(9)에서와 같이 기질로서 colloidal chitin을 사용하여 40°C에서 1시간 반응시키고 100°C water bath에서 10분간 처리하여 효소반응을 정지시킨 다음 반응액을 원심분리하여 얻은 상침액의 환원당을 DNS 법으로 측정하여 chitinase의 활성을 결정하였다.

저해제의 영향

각종 금속이온, 환원제 및 화학수식제들을 최종농도가 1 mM되게 효소액에 첨가하고 상온에서 30분간 방치한 다음 잔존활성을 측정하였다.

Key words: *Aeromonas salmonicida*, chitinase, active sites

*Corresponding author

결과 및 고찰

효소활성에 대한 chemicals의 영향

환원제를 포함한 chemical들이 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 1), disulfide bond를 환원하며 Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} 을 함유하는 metalloenzyme의 활성을 저해하는 것으로 알려지고 있는 sodium azide(10)에 의해서는 영향을 받지 않았으며, EDTA를 첨가한 경우도 효소활성을 저해하지 않았으므로 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase는 metalloenzyme이 아닌 것으로 생각되었다. 또한 효소단백질의 -SH잔기에 비가역적으로 작용하는 p-chloromercuribenzoate(p-CMB)(11)를 첨가한 결

Table 1. Effect of various chemicals on the activity of chitinase from *A. salmonicida* YA7-625

Chemicals(1 mM)	Relative enzyme activity(%)
None	100.0
β -Mercaptoethanol	92.2
Na-thiosulfate	100.0
Na-sulfite	92.2
Na-citrate	100.0
Cysteine	80.6
Ascorbic acid	100.0
EDTA	95.3
SDS	100.0
Sodium azide	100.0
p-CMB	95.0
PMSF	87.6

Table 2. Effect of metal ions on the activity of chitinase from *A. salmonicida* YA7-625.

Metal ions(1 mM)	Relative enzyme activity(%)
None	100.0
$HgCl_2$	0.0
$CaCl_2$	117.1
$MnCl_2$	72.9
$Pb(CH_3COO)_2$	107.8
$NiCl_2$	87.6
$FeSO_4$	92.9
$ZnCl_2$	110.1
$CoCl_2$	110.1
$CuSO_4$	76.0
$MgSO_4$	110.1

과 활성의 변화가 거의 없었으므로 *Aeromonas salmonicida* YA7-625의 chitinase의 활성중심에는 -SH기가 관여하지 않는 것으로 생각되었다.

각종 금속이온의 영향

Aeromonas salmonicida YA7-625가 생산하는 chitinase는 Table 2에서 보는 바와 같이 $CaCl_2$, $Pb(CH_3COO)_2$, $ZnCl_2$, $CoCl_2$, $MgSO_4$ 등을 첨가한 경우에는 대조구에 비해 약간의 활성증대를 보였으며, $MnCl_2$, $CuSO_4$ 를 첨가한 경우에는 27.1%와 24.0%의 저해효과를 나타내었고, $HgCl_2$ 는 100%의 저해를 나타내었다. Reiser(12)는 *Chytriumyces hyalinus*가 생산하는 chitinase가 Cu^{2+} 와 Cd^{2+} ion에 의해서 저해받는다고 보고하였으나, 본 chitinase는 histidine과 tryptophan 잔기와 반응하는 것으로 알려진 Hg^{2+} ion(13)에 의해 현저한 저해현상을 보였다.

$HgCl_2$ 에 대한 β -mercaptoethanol과 EDTA의 영향

Hg^{2+} ion에 의한 효소활성저해와 β -mercaptoethanol과 EDTA의 영향에 대해 검토한 결과(Fig. 1, 2), chitinase는 1 mM $HgCl_2$ 에 의해서 급격히 실활되었으나 β -mercaptoethanol은 효소활성에 영향을 주지 않았으며, $HgCl_2$ 처리전에 β -mercaptoethanol로 전처리한 경우에는 90% 이상의 chitinase 활성이 유지

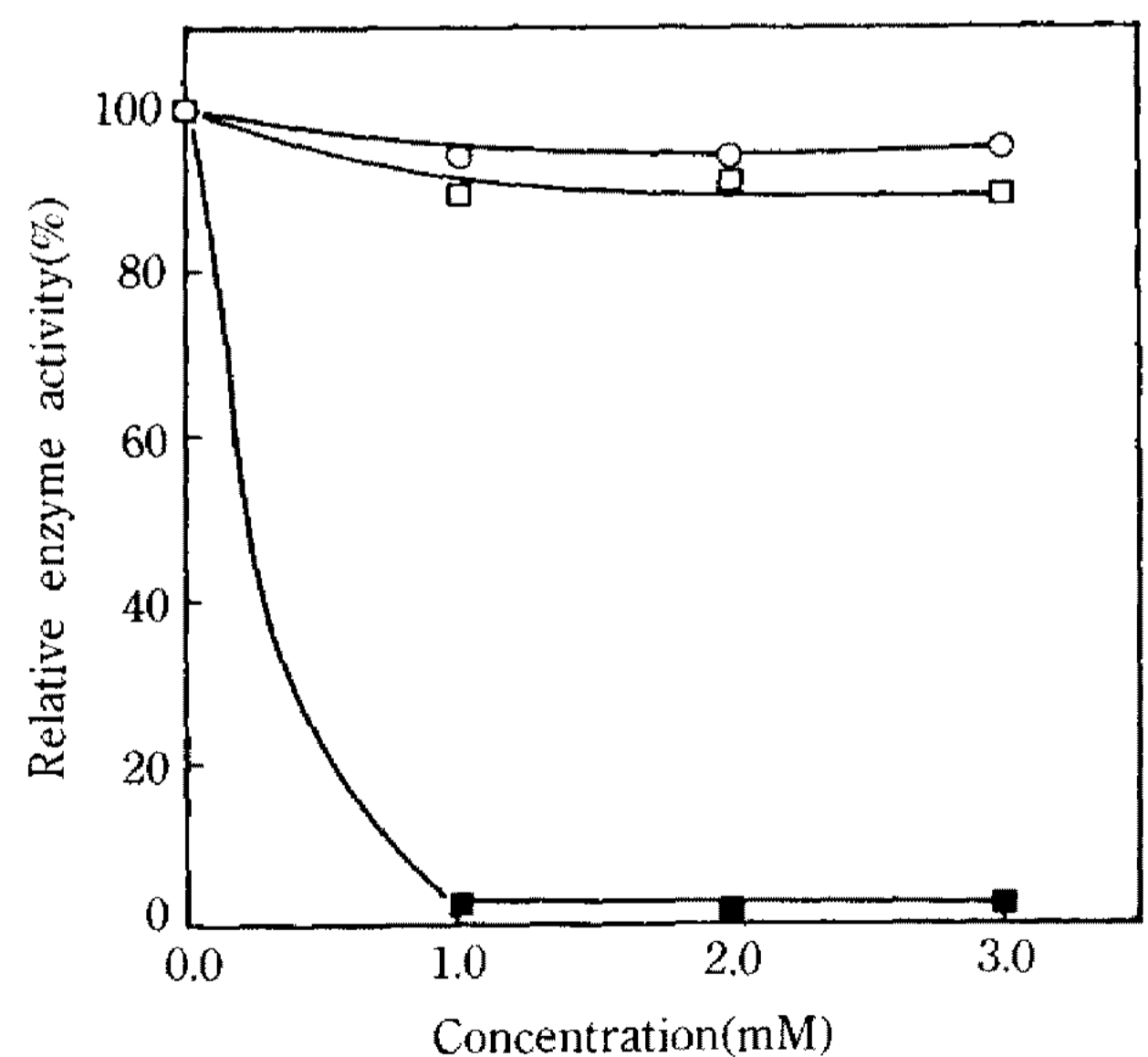


Fig. 1. Effect of β -mercaptoethanol on $HgCl_2$ inhibition of chitinase from *A. salmonicida* YA7-625.

(○; Pretreatment of β -mercaptoethanol without $HgCl_2$ inhibition, □; Pretreatment of β -mercaptoethanol before $HgCl_2$ inhibition, ■; Inhibition of $HgCl_2$).

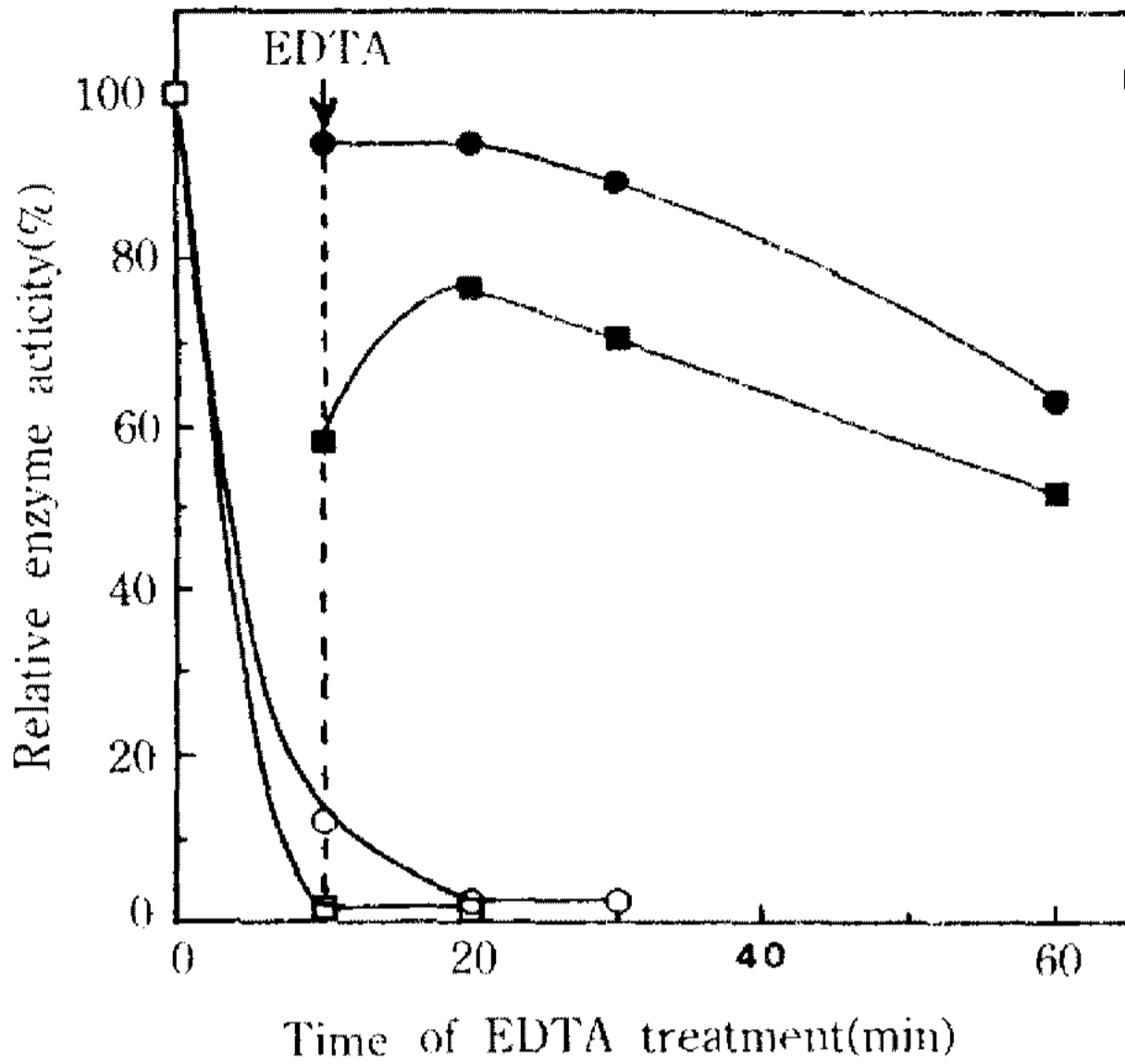


Fig. 2. Effect of EDTA on HgCl₂ inhibition of chitinase from *A. salmonicida* YA7-625.

(○; 0.1 mM HgCl₂, □; 1 mM HgCl₂, ●; 0.1 mM HgCl₂ + 1 mM EDTA, ■; 1 mM HgCl₂ + 1 mM EDTA).

되었다. HgCl₂에 의해 실활된 chitinase에 EDTA를 첨가한 경우에는 조건에 따라 차이는 있으나 효소활성이 회복되었다. 그러나 시간이 지남에 따라 저서히 실활되어 60분 후에는 약 60%의 잔존활성을 나타내었다. 따라서 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase는 HgCl₂에 의하여 기억적인 저해를 받는 것으로 생각되었다.

화학수식제의 영향

화학수식제를 1 mM되게 첨가하여 chitinase 활성에 미치는 효과를 검토하였다. 그 결과 arginine의 guanidyl기에 작용하는 phenylglyoxal(11)은 chitinase의 활성에 영향을 나타내지 않아 chitinase 활성중심에 arginine 잔기가 관여하지 않는 것으로 생각되었으며 (Fig. 3), serine의 -OH기에 특이적으로 작용하는 phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF)도 chitinase의 활성에 영향을 미치지 않아 (Table 1) 본 chitinase는 serine enzyme은 아닌 것으로 생각되었고, carboxyl기와 반응하는 hydroxylamine(11)을 첨가한 경우에도 90% 이상의 잔존활성을 유지하였으므로 chitinase 활성중심에는 aspartic acid와 glutamic acid 잔기가 효소반응에 관여하지 않는 것으로 생각되었다 (Fig. 3). 한편 tryptophan과 결합하여 효소활성을 저해하는 것으로 알려진 N-bromosuccinimide를 처리한 결과

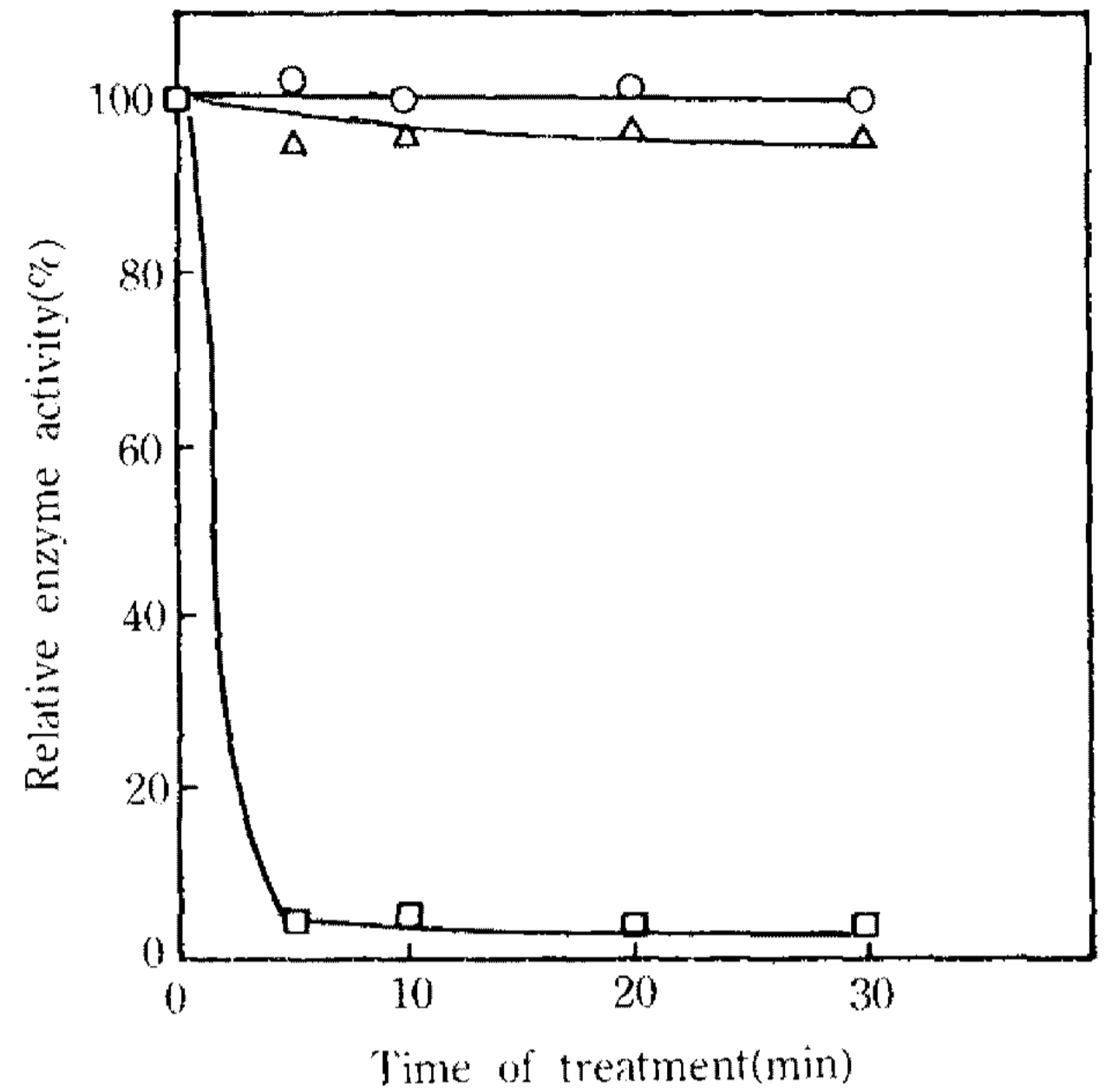


Fig. 3. Effect of phenylglyoxal, N-bromosuccinimide and hydroxylamine on the activity of chitinase from *A. salmonicida* YA7-625.

(○; Phenylglyoxal, △; N-Bromosuccinimide, □; Hydroxylamine).

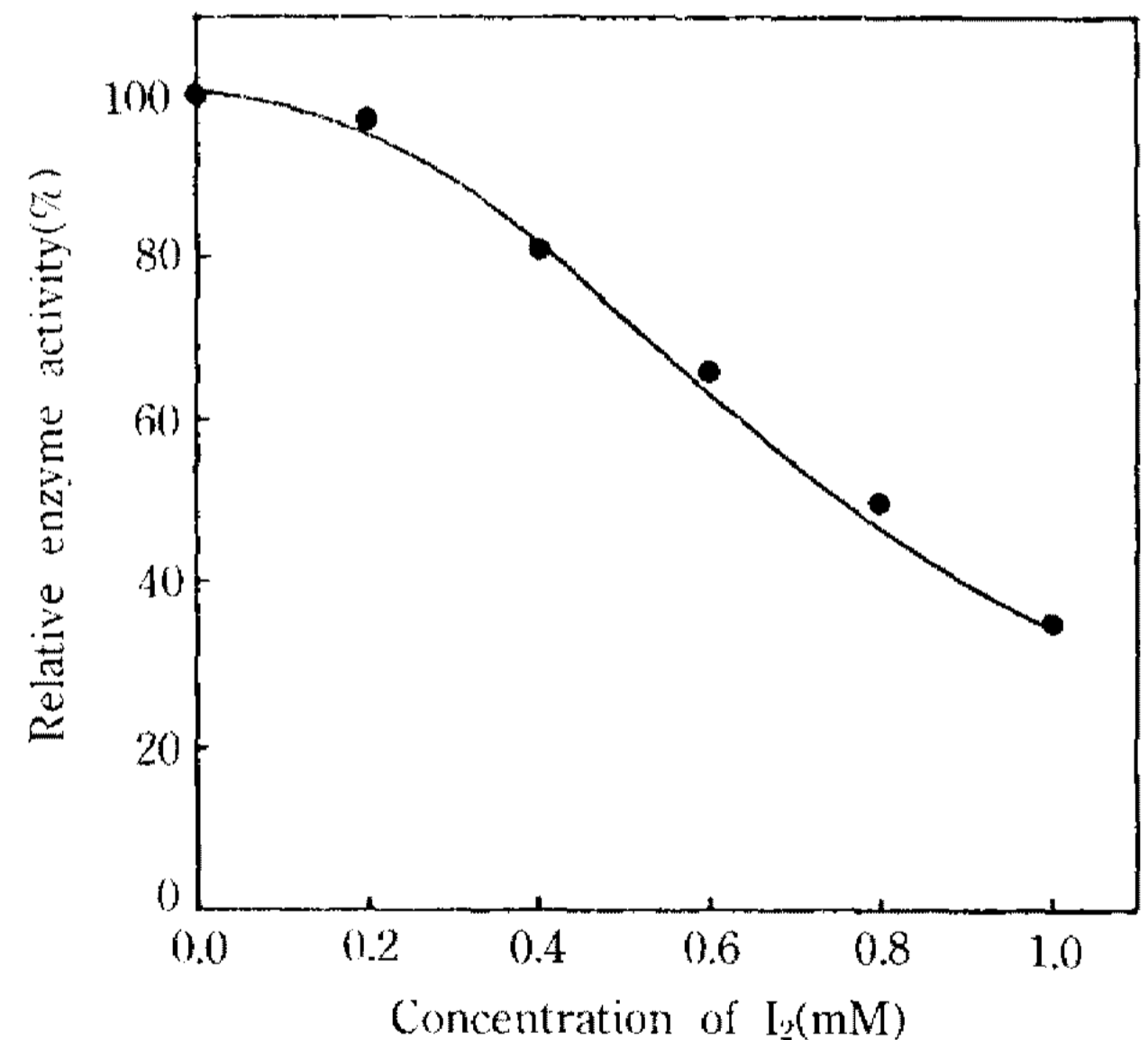


Fig. 4. Effect of I₂ concentration on the activity of chitinase from *A. salmonicida* YA7-625.

chitinase의 활성이 완전히 실활되었고 (Fig. 3), tyrosine, cysteine, histidine 및 tryptophan 잔기와 결합하여 효소활성을 저해하는 물질로 알려지고 있는 iodine(10, 11)을 1 mM까지 첨가하여 그 효과를 검토한 결과 (Fig. 4) 34.8%의 잔존활성을 보였다.

효소활성중심과 pH

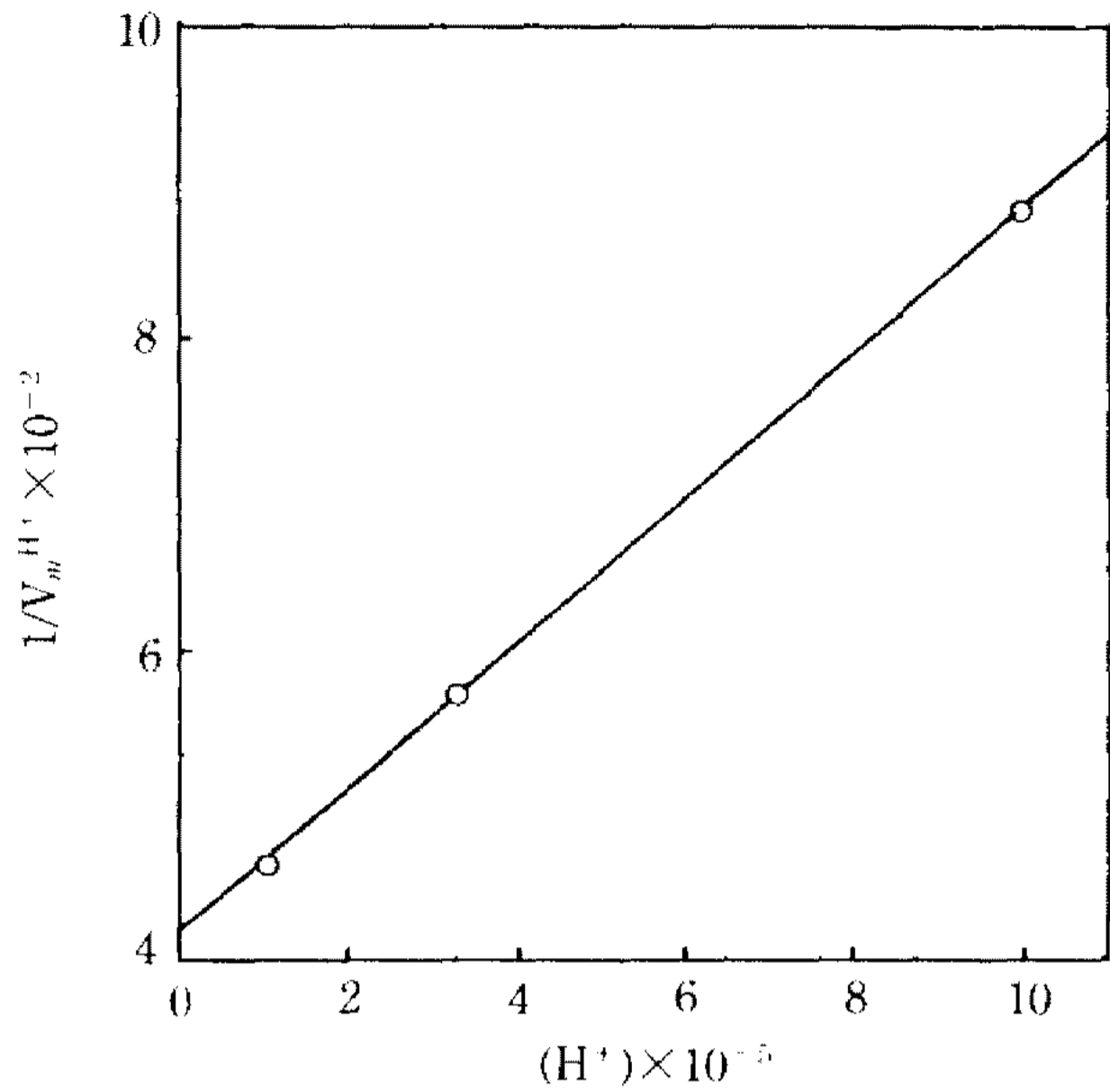


Fig. 5. Determination of $V_m^{H^+}$ and K_{cs1} for chitinase from *A. salmonicida* YA7-625.

pH가 효소 반응속도에 미치는 영향은 Whitaker (10)가 제안한 (1)식과 같이 표현할 수 있으며,

$$\frac{V}{V_{max}} = \frac{[S]}{K_s \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{cs1}} + \frac{K_{cs2}}{[H^+]}\right) + [S] \left(1 + \frac{[H^+]}{K_{cs1}} + \frac{K_{cs2}}{[H^+]}\right)} \quad (1)$$

$$\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{cs1}} + \frac{K_{cs2}}{[H^+]}\right) = f_E''$$

Michaelis pH function for "E"

$$\left(1 + \frac{[H^+]}{K_{cs1}} + \frac{K_{cs2}}{[H^+]}\right) = f_{ES}''$$

Michaelis pH function for "ES"

최대 반응속도는 효소가 모든 기질과 complex를 형성할 때인 $[(E_0) = (EA)]$ 이므로 $V_{max} = k_2(E_0) = K_2(E''S)$ 가 되며, 주어진 수소이온농도에서 최대의 반응속도는 $V_m^{H^+} = K_p(E''S)/f_{ES}''$, 즉 $V_m^{H^+} = V_m/f_{ES}''$ 로 표시할 수 있으며, 이는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\frac{V_m}{V_m^{H^+}} = f_{ES}'' = 1 + \frac{[H^+]}{K_{cs1}} + \frac{K_{cs2}}{[H^+]} \quad (2)$$

(2)식은 다시 (3)식 및 (4)식과 같이 쓸 수가 있다. pH가 pK_{cs1} 부근인 경우

$$\frac{1}{V_m^{H^+}} = \frac{1}{V_m} + \frac{[H^+]}{V_m K_{cs1}} \quad (3)$$

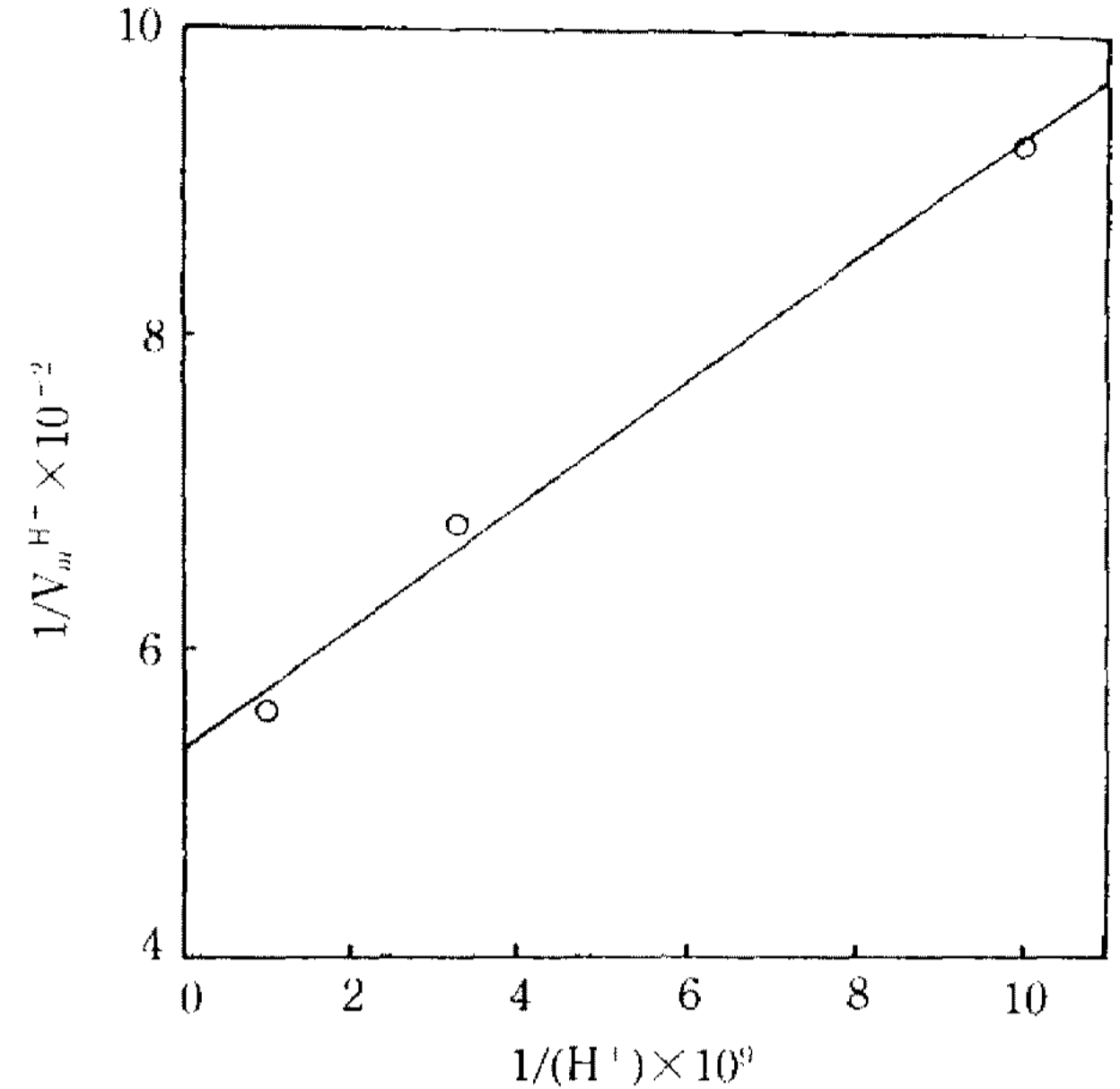


Fig. 6. Determination of $V_m^{H^+}$ and K_{cs2} for chitinase from *A. salmonicida* YA7-625.

pH가 pK_{cs2} 부근인 경우

$$\frac{1}{V_m^{H^+}} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_{cs2}}{V_m [H^+]} \quad (4)$$

(3), (4)식을 이용하여 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase의 수소이온농도에 따른 효소활성중심의 변화를 살펴본 결과(Fig. 5, 6), pK_{cs1} 값과 pK_{cs2} 값은 각각 4.04와 10.10이었다. pK_{cs1} 값(4.04)을 고려할 때 효소활성부위에 aspartic acid와 glutamic acid의 carboxyl기가 있을 것으로 생각되었으나 -COOH기에 특이적으로 작용하는 hydroxylamine에 의하여 활성저해가 없는 점(Fig. 3)을 미루어 보아 -COOH기가 효소활성중심에는 존재하지 않는 것으로 생각되었다. 한편 pK_{cs2} 의 값(10.10)은 효소활성에 tyrosine의 -OH가 관여할 것이라는 것을 나타내며, 이는 Fig. 3, 4에서 보는 바와 같이 N-bromosuccinimide와 iodine을 처리하였을 때 효소활성이 저해 받은 결과와 일치하고 있다. 그러므로 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase의 활성중심에는 tryptophan, tyrosine, histidine잔기들이 직접 또는 간접적으로 관여하는 것으로 생각되었다.

요 약

Aeromonas salmonicida YA7-625가 생산하는 chiti-

nase는 Hg^{2+} 에 의해 저해를 받았으나 β -mercaptoethanol처리에 의해서 활성이 보호되었으며 Na-thio-sulfate, ascorbic acid 등의 환원제들과 sodium azide, p-CMB 등의 -SH 저해제에 대하여 전혀 작용을 받지 않았으므로 본 효소의 활성중심에는 -SH가 없는 것으로 생각되었다. 또한 histidine, cysteine, tyrosine 및 tryptophan에 작용하는 iodine에 의하여 저해를 받았으며 tryptophan에 대해 특이적으로 작용하는 N-bromosuccinimide에 의해 실활되는 것으로 보아 활성중심에 tryptophan, histidine 및 tyrosine 잔기가 존재하는 것으로 생각되었다. 또한 pK_{s2} 를 검토한 결과 tyrosine이 효소활성중심에 존재하는 것으로 생각되었으며 chitinase의 효소활성중심에는 tryptophan, histidine 및 tyrosine이 존재하며 이들은 chitinase의 반응시 직접 또는 간접적으로 관여하고 있다는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 石川文保, 大寶明, 島原健三, 戸倉清一, 平野茂博. 1988. 最後の *Biomass Chitin and Chitosan*. 技報堂出版.
2. Muzzarelli, R.A.A. 1977. *Chitin*. Pergamon Press.
3. Deshpande, M.V. 1986. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *J. Sci. Ind. Res.* **45**: 273.
4. 平野茂博, 嶋口泰之, 島原健三. 1987. 別冊 *Food Chemical. Chitin/Chitosan*의 科學. 食品新聞社.
5. Carroad, P.A. and R.A. Tom. 1978. Bioconversion of shellfish chitin wastes: Process conception and selection of microorganisms. *J. Food Sci.* **43**: 1158.
6. Tom, R.A. and P.A. Carroad. 1981. Effect of reaction condition on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase. *J. Food Sci.* **46**: 646.
7. Cosio, I.G., R.A. Fisher, and P.A. Carroad. 1982. Bioconversion of shellfish chitin waste: Waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.* **47**: 901.
8. Yabuki, M. and Y. Kasai. 1984. Rapid method for converting fungal cells into protoplasts with a high regeneration frequency. *Exp. Mycol.* **8**: 386.
9. Lee, K.P., C.N. Kim, J.H. Yu, and D.H. Oh. 1990. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 599.
10. Whitaker, J.R. 1972. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Maroel Dekker, Inc, New York.
11. Means, G.E. and R.E. Feeny. 1971. *Chemical Modification of Proteins*. Holden-Day Inc.
12. Reiser, P.S. 1972. Studies of the chitinase system of *Chytrium hyalinus* using a C14-chitin assay. *Mycologia* **64**: 288.
13. Vallee, B.L. and D.D. Ulmer. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**: 91.

(Received December 30, 1991)