

Streptomyces 속 균주가 생산한 Chitobiase의 효소학적 성질

김 중 배

상지대학교병설전문대학 식품영양과

Properties of Chitobiase Produced by Streptomyces sp.

Jung-Bae Kim

Dept. of Food and Nutrition, Sangji Junior College, Weonju 220-702, Korea

Abstract

Streptomyces sp. YB-88-20 was isolated from soil and the properties of chitobiase were investigated. The optimal reaction condition for the enzyme was pH 5.5 and 40°C, and was stable in the range of pH 4.0 to 5.5 and temperature at 40°C, and 40 min, respectively. The enzyme was inactivated by heating at 45°C for 1hr. The enzyme was slightly activated by Mn^{2+} , Mg^{2+} , but inhibited by Fe^{2+} . Km and activation energy was 1.5072mM and 8.314kcal/mol.

Key words : *Streptomyces* sp., chitobiase properties.

서 론

Chitin, chitosan은 오랫동안 이용되지 않았던 생물 자원으로 방치되어 왔으나 자원, 에너지 환경보전으로부터 자원순환 및 biomass의 자원화가 중요시됨에 따라 이들 물질의 이용가능성에 관한 연구와 개발이 활발히 진행되고 있다¹⁾. Chitin질은 N-acetylglucosamine의 β -1,4 linkage로 결합된 unbranched chain의 중합체인 당류로서 새우, 게, 곰팡이, 균조류의 세포벽, 곤충 등의 갑각류 등에 많이 존재하고 있으며²⁻⁵⁾, chitin질의 β -1,4 glycoside결합의 가수분해에 관여하는 효소는 chitinase(EC 3.2.1.14), lysozyme(EC 3.2.1.17), chitobiase(EC 3.2.1.30), β -1,4-acetylglucosaminidase(EC 3.2.1.52) 등이 알려져 있다⁶⁾. 이들 효소는 결정화 chitin을 분해시켜 최종산물인 N-acetylglucosamine으로 단계적으로 분해하는 것으로 알려져 있다. 한편 이들 물질의 중요성이 증대됨에 따라 의약, 화학공업에의 이용범위가 폭넓게 검토되고 있다. 물질 분리의 분리기능막은⁷⁾ 의료, 의약분야의 투석막, 역 침투막, 한외 여과막, 기체분리막에 사용이 가능하며, 앞으로 carrier-수송막, 촉매 기능막 및 면역 부활작용에의 응용이

주목⁸⁾된다. 또한 chitin분해효소들은 식물 병원균에 대한 생육저해작용⁹⁾, 자기방어기능 및 곤충탈피의 생체기능해명¹⁰⁾, 탈피 저해제에 관한 연구가¹¹⁻¹²⁾ 활발히 진행되고 있다. 미생물로부터 기원하는 chitinase에 관한 보고¹³⁻¹⁶⁾는 많이 있으나, 천연 chitin을 기질로 한 chitobiase에 관한 연구는 별로 알려져 있지 않다.

본 실험은 토양에서 chitobiase를 강력하게 분비하는 *Streptomyces* sp. YB-89-20 균주를 선별하여 효소학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

1. Chitin의 조제

Charles 등의 방법¹⁵⁾을 약간 변형시켜 colloidal chitin을 만들어 사용하였다. 게 껍질(crab)을 물로 수세하여 건조시켜 분쇄기로 분말로 한 100g을 cold 1N NaOH 5l에 가하여 단백질을 제거한 후 24시간 방치하여 glass wool로 여과하였다. Ca^{2+} 이온을 제거하기 위하여 1N HCl 5l를 가한 후 하룻동안 방냉하여 여과한 후 증류수로 중성이 될 때까지 세척하였다. Conc H_2SO_4 1l를 가하여 기질을 용해시켜 하룻동안 방치한 후 4°C 증류수 50l를 mixing시키면서 현탁시켰다. 여기서 생성된 colloidal chitin질을 여과하여 pH 5.0이 될 때까지 증류수로 세척하여 0.1N HCl용액에 넣어 냉

장고에 보관하였다.

기질의 사용 시에는 0.1N NaOH 용액으로 중화하여 사용하였다.

2. 균의 선별

강원도 원주지방을 중심으로 colloidal chitin 배지를 사용하여 3단 희석법으로 토양에서 분리한 방사선균 약 400 균주 가운데 clear zone의 형성이 큰 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 50 균주 중 액체배지를 사용하여 효소활성이 강한 균주를 2차 선별하여 시험균으로 사용하였다. 본 실험에 사용한 기본배지 구성은 1% colloidal chitin, 0.4% peptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2% agar이였으며, 4주마다 계대배양하였다.

3. 효소 생산

500ml Erlenmyer flask에 colloidal chitin을 함유하는 액체배지 100ml에 균을 접종한 후 28℃에서 8일간 진탕배양하였다. 액체배지 구성은 1% colloidal chitin, 0.5% peptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, initial pH 5.0이었다. 배양 후 glass filter로 배양액을 여과하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

4. Chitinase activity 측정

효소의 활성측정¹⁷⁾은 p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine을 기질로 사용하여 유리되는 p-nitrophenol의 양으로 결정하였다. 0.1M McIlvaine buffer(pH 5.5) 0.5ml와 5mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine 0.1ml에 효소액 0.1ml를 가하여 40℃에서 20분간 반응시킨 후 0.25M Na_2CO_3 을 2ml 가하여 반응을 정지시켜 생성되는 p-nitrophenyl의 양을 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 상기조건 하에서 기질로부터 분당 $1\mu\text{mol}$ 의 p-nitrophenyl을 유리시키는 양을 1 unit로 하였다.

결 과

1. 최적 pH

효소 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여

반응액의 pH를 McIlvaine buffer용액으로 3.0에서 8.0까지 조절하여 40℃에서 20분간 반응시켜 효소활성도를 측정하여 본 결과 Fig. 1과 같이 pH 5.5에서 최고의 활성도를 나타내었다.

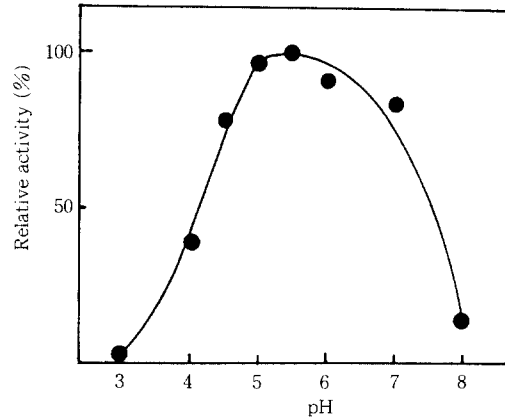


Fig. 1. Effect of pH on the enzyme activity.

2. pH 안정성

본 효소의 pH 안정성을 조사하기 위하여 반응액의 pH를 McIlvaine buffer(pH 3~8)로 조절하여 40℃에서 1시간 처리하여 잔존활성도를 측정하여 본 결과 Fig. 2에서와 같이 pH 4.5에서 pH 5.5까지 안정하였다.

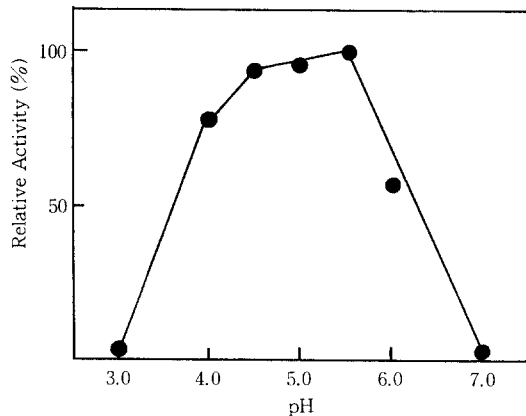


Fig. 2. Effect of pH on the enzyme stability.

3. 최적 온도

효소의 최적 활성온도를 조사하기 위하여 반응액의 온도를 30℃에서 55℃까지 조절하여 20분간 반응시킨 결과 Fig. 3에서와 같이 40℃에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

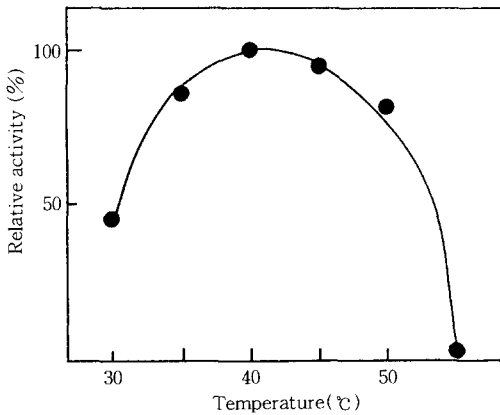


Fig. 3. Effect of temperature on the enzyme activity.

4. 열 안정성

효소액의 pH를 5.5로 조절하여 30, 35, 40, 45℃에서 경시적으로 열처리하여 잔존 활성도를 조사하여 본 결과 Fig. 4에서와 같이 40℃까지는 비교적 안정하였으나 45℃에서는 20분간 반응시킨 결과 50% 실패되었으며 60분간 반응시킨 후 효소의 활성도는 거의 없었다.

5. 금속이온의 영향

금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 금속이온이 반응액에서의 농도가 1mM이 되도록 첨가하여 효소 활성도를 조사하여 본 결과 Table 1에서와 같이 Mn^{2+} , Mg^{2+} 이온은 효소활성도를 약간 증가시켰으나 그 밖의 이온은 별다른 영향을 주지 못하였다. Fe^{2+} 이온은 효소의 활성을 30% 정도 저해시켰다.

6. Km값

기질농도에 따른 반응속도의 영향을 조사하기 위하여

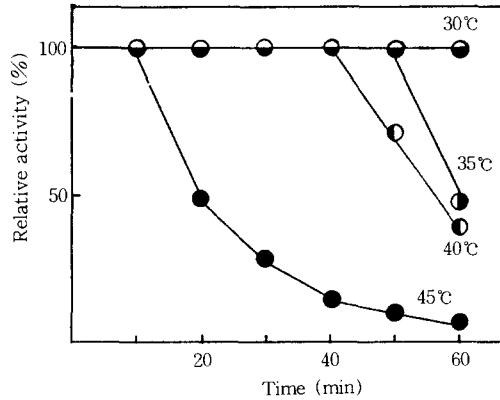


Fig. 4. Effect of temperature on the enzyme stability.

Table 1. Effect of metal ions on the enzyme activity

Metal ion	Relative activity (%)
Control	100
$AgNO_3$	82
$CaCl_2$	95
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	98
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	90
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	29
$Hg(NO_3)_2 \cdot 2H_2O$	84
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	101
$Pb \cdot Acetate \cdot 3H_2O$	94
$ZnCl_2$	98
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	97
$AlCl_3 \cdot 6H_2O$	97
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	93
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	103

40℃에서 20분간 반응시켜 least square method에 의한 Lineweaver Burk plot하여 본 결과 Fig. 5와 같이 1.5072mM이었다.

7. 활성화 에너지

효소의 활성화 에너지를 조사하기 위하여 반응액의 온도를 24℃에서 39℃까지 조절하여 효소활성과 온도와의 관계를 도식한 결과 Fig. 6과 같다. 본 효소의 활

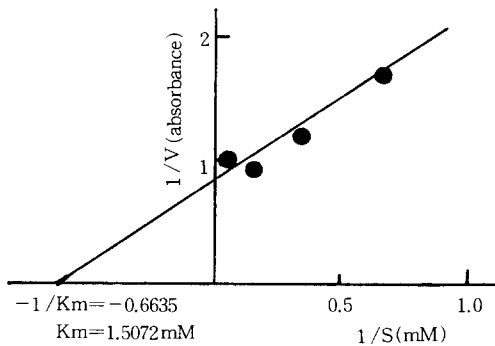


Fig. 5. Lineweaver Burk plot for hydrolysis of substrate by chitobiase.

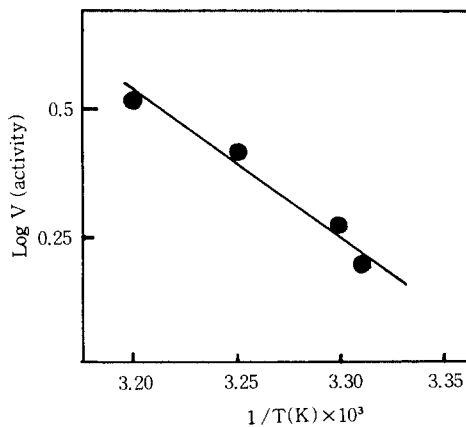


Fig. 6. Arrhenius plot for enzyme catalyzed reaction.

성화에너지는 8.314 kcal/mol이었다.

고찰

미생물성 chitobiase는 곰팡이의 세포벽에 함유된 chitosan을 분해하여 protoplast 제조에 이용할 수 있으며, 산 가수분해법에 비하여 oligo당(GlcN₃₋₅) 제조에 유리한다¹⁾. 또한 효소에 의한 분해산물은 식물병원 균인 *Fusarium* sp.의 생육을 저해시키며, 면역 부활작용이 알려지면서 암, 면역 부전증 등의 새로운 치료법이

검토되고 있다⁸⁻⁹⁾.

본 효소의 성질을 조사한 결과 최적온도와 pH는 다른 것과 비교^{16,17)}하여 비슷하였으나 온도와 pH안정성은 낮게 나타났다. 특히 pH안정성은 안정범위가 좁으며 중성에서 활성이 낮게 나타났다. 금속이온과 활성화 에너지는 별다른 특징을 보이지 않았으며, Km 값은 다른 균주보다¹⁸⁾ 높게 나왔다.

요약

토양에서 분리한 *Streptomyces* sp. 균주에서 분리되는 chitobiase의 효소학적 성질을 검토하였다. 최적반응조건은 pH 5.5, 40℃이었으며, 효소의 안정성은 pH 4.0~5.5, 40℃에서 40분간 이었다. 45℃에서 1시간 열처리하였더니 효소의 활성은 거의 실활되었다. Mn²⁺, Mg²⁺이온에 의해 활성이 약간 증가하였으며 Fe²⁺이온은 저해시켰으며, Km값과 활성화 에너지는 각각 1.5072 mM, 8.314 kcal/mol이었다.

참고문헌

1. 大玉 明 : 微生物 キトサンアゼ-キトサンの分解と利用, 일본농예화학회지, 62, 49(1988)
2. Jaime, M. and Elwyn, T.R. : The chitinase of *Serratia Marcescens*, *Can. J. Microbiol.*, 15, 559 (1969)
3. Anne, M.H. and Graham, W.G. : Properties of chitinase activity from *Mucor mucedo.*, 10, 1359(1984)
4. Yoshi, T. and Yoshio, T. : Purification and some properties of two chitinase from *Streptomyces orientalis* which lyse *Rhizopus* cell wall. *Agr. Biol. Chem.*, 40, 2325(1976)
5. 古賀大三 : 昆蟲キチナアゼ, 일본농예화학회지, 62, 52(1988)
6. Enzyme Nomenclature : *Recommendation of nomenclature Committee of The Biochemistry. Academic. Press, Inc.*(1977)
7. 浦上 忠 : キチン・キトサンから分離機能幕, 일본농예화학회지, 62, 46(1988)

8. 鈴木茂生 : N-アセチルキトオリゴ糖とキトオリゴ糖の免疫復活作用, *일본농예화학회지*, **62**, 59(1988)
9. 平野茂博 : 키트산의關與する植物의細胞活性化および病原菌に對する 自己防禦作用, *일본농예화학회지*, **62**, 56(1988)
10. 古賀大三 : 昆蟲脫皮とキチン分解酵素, *化學と生物*, **24**, 506(1986)
11. Peter, H.C. and Raymond, O.F. : Inhibition of chitin metabolism by avermectin in susceptible organisms., *J. Antibiotics.*, **37**, 253(1984)
12. Penelope, J.B.S., Raymond, C.Y., Lawrence, E.D., Michael, J.M., and David, S.F. : Method for the detection and quantition of chitinase inhibitors in fermentation broths., *J. Antibiotics.*, **40**, 1751(1987)
13. 瀧口泰之, 泳幡紀明, 島原健三 : 키친소分解と同定, *일본농예화학회지*, **59**, 253(1985)
14. 内田 泰, 光富 勝, 大玉 明 : 키치나아제生産細菌의 分類と酵素의生産條件および性質, *일본 발효공학회지*, **57**, 131(1979)
15. Charles, J. : *Method in enzymology*, vol. **8**, Acamemic Press, New York, 644(1966)
16. Minoru, Y., Keij, M., Tomoko, A., Akikazu, A., Takaaki, F., Masayuki, S., and Minoru, Y. : Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* A52., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **32**, 25(1986)
17. Daizo, K., Motofumi, N., Toru, M., Shigeru, K. and Akio, I. : Purification and properties of β -N-acetyl-D-glucosaminidase from alimentary canal of the silkworm, *Bombyx mori.*, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2357(1988)
18. Kaoru, T., Masanao, N., Shojiro, I., Kenji, Y. and Tatsurokuro, T. : Induction and purification of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Arthrobacter protophormiae* grown in ovalbumin., *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3107(1989)

(1992년 10월 8일 수리)