

Aeromonas salmonicida YA7-625가 생산하는 Chitobiase의 순수분리와 특성

이강표* · 김동섭 · 윤성식** · 오두환

연세대학교 식품공학과, *제일제당 건강식품 연구소, **연세대학교 낙농학과

초록 : 키틴 분해 효소활성이 높은 균주로 분리동정한 *Aeromonas salmonicida* YA7-625의 chitobiase를 ammonium sulfate 침전, affinity adsorption, DEAE-cellulose chromatography, hydroxylapatite chromatography, gel filtration 과정을 통해 수율 47.2% 및 정제도 31.5로 분리, 정제 하였다. 정제된 chitobiase는 pH 6.0, 40°C에서 최대의 활성을 나타내었고 분자량은 15,000 daltons로 추정되었다. 금속이온과 저해제들의 효과를 검토결과 효소의 활성에는 cystein, glutamic acid, aspartic acid, serine, tryptophan 및 tyrosine 잔기 등이 관여하는 것으로 유추되었다(1993년 5월 10일 접수, 1993년 6월 28일 수리).

키틴은 N-acetyl-D-glucosamine의 β -1,4 중합체¹⁾로서 연간 10⁹톤 정도가 해양 무척추동물, 곤충, 곰팡이 등에 의해 생합성되며, 섬유소 다음으로 풍부한 생물자원이 다.

키틴을 이용하고자 하는 연구는 미국, 일본 등지에서 활발하게 진행되고 있으며, 키틴을 보다 유용한 물질로 전환시킬 수 있는 방법으로서 키틴 분해효소를 이용한 키틴의 가수분해에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다. 이러한 키틴 분해효소는 *Klebsiella*,²⁾ *Vibrio*,^{3,4)} *Aeromonas*,⁵⁾ *Serratia*,^{6,7)} *Pseudomonas*,⁷⁾ *Clostridium*,³⁾ *Bacillus*, *Chromobacterium*^{6,8-11)} 등과 같은 세균에서 주로 생산되고 동물,¹²⁾ 식물¹³⁾ 및 다른 미생물^{6,14-19)}에서도 발견되고 있다. 이러한 키틴 분해효소에 대해서는 국내에서도 많은 연구가 진행되어 *Serratia*,²⁰⁻²²⁾ *Streptomyces*²³⁾ 등이 생산하는 키틴 분해효소의 특성과 유전자 클로닝 등이 보고되고 있다.

키틴이 효소에 의해 분해되어 최종생성물인 N-acetyl glucosamine까지 되는 과정은 chitinase와 chitobiase의 공동작용으로 이루어진다고 알려져 있다.²⁴⁻²⁶⁾ 즉 키틴은 chitinase에 의해 N,N'-diacetyl chitobiose로 가수분해되고 이 N,N'-diacetyl chitobiose에 chitobiase가 작용하여 최종생성물인 N-acetyl glucosamine을 생성하게 된다. 따라서 키틴을 가수분해하기 위해서는 chitinase와 함께 chitobiase의 작용이 필요하게 된다.

본 연구는 키틴분해 세균인 *Aeromonas salmonicida*

YA7-625^{27,28)}의 chitinase 최적 생산조건 및 물리적 성질의 검토에 대한 보고에 이어, *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitobiase의 생산조건, 분리정제 및 효소적 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구는 토양에서 분리된 균주 중 키틴분해 활성이 높은 것으로 Oh^{27,28)} 등에 의해 보고된 *Aeromonas salmonicida* YA7-625를 실험 균주로 사용하였다.

효소 활성 측정

p-nitrophenyl-N-acetyl-D-glucosamine(5 mM) 용액 0.2 ml와 phosphate buffer(0.2 M, pH 7.0) 0.7 ml에 효소액 0.1 ml를 가하고 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 Na₂CO₃(0.25 M) 용액 2 ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 이 반응액의 흡광도를 420 nm에서 측정하여 chitobiase의 활성을 결정하였으며, chitobiase 1 unit는 1분 동안 1 μ mole의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

효소의 분리 및 정제

배양액을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액에 60% 포화농도가 되게 ammonium sulfate를 4°

C에서 가해 하룻밤 방치하였다. 그 후 8,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 조효소를 얻었다. 이를 소량의 phosphate buffer(0.2 M, pH 7.0)에 녹인 뒤 0°C에서 1시간 동안 colloidal chitin에 흡착시킨 후²⁹⁻³²⁾ 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻었다.

그 후 chitobiase를 citrate-phosphate buffer(0.02 M, pH 6.5)로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(2×10 cm)에 흡착시킨 후 0.5 M NaCl로 gradient elution하여 효소단백질을 용출하여 투석하였고, 투석된 조효소액은 hydroxylapatite column chromatography, gel filtration을 통해 정제하였다.

효소의 분자량 측정

효소 단백질의 분자량은 HPLC용 microPak TSK gel type 3,000 SW column을 사용하여 측정하였다. 표준단백질 marker로는 carbonic anhydrase(Mw. 29,000), bovine serum albumin(Mw. 66,000), alcohol anhydrase(Mw. 150,000), apoferritin(Mw. 443,000), blue dextran(Mw. 1,000,000)을 사용하였으며 용출시간과 분자량과의 상호관계로부터 분자량을 구하였다.

결과 및 고찰

Chitobiase 최적 생산조건의 결정

Aeromonas salmonicida YA7-625로부터 키틴 분해효소를 생산하기 위한 최적 배지조성^{27,28)}에서 chitobiase 생산을 위한 colloidal chitin과 tryptone의 농도를 중심합성계획³⁵⁾에 따라 분석하였다. Computer를 사용하여 회귀분석하고 최대치를 갖는 변수들의 값을 계산한 결과 colloidal chitin 1.57%, tryptone 3.44%일 때 chitobiase 생산값이 4.7 units/ml의 최적 생산조건을 나타내었다

(Fig. 1).

따라서 *Aeromonas salmonicida* YA7-625를 colloidal chitin 1.57%, tryptone 3.44%, MgSO₄·7H₂O 0.15%, K₂HPO₄ 0.15%(pH 7.5)의 배지조성으로 27°C에서 48시간 동안 배양했을 때 최대의 chitobiase를 얻을 수 있었다.

효소의 분리와 정제

Aeromonas salmonicida YA7-625 배양액을 원심분리한 후 상등액에 60%의 ammonium sulfate로 포화시켜 원심분리하였다. Ammonium sulfate 침전물을 소량의 pho-

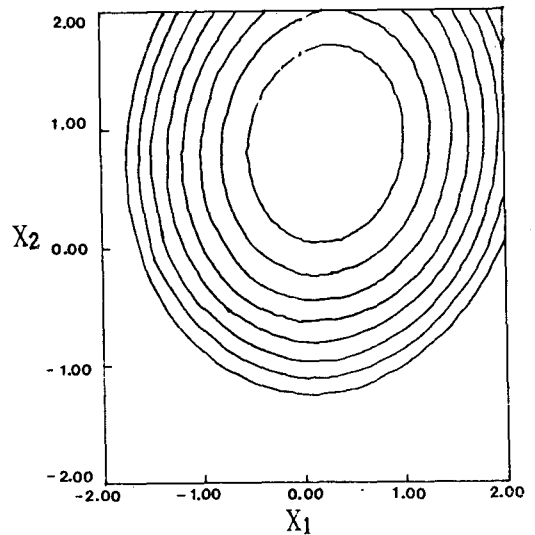


Fig. 1. Response surface plotting of the effect of colloidal chitin and tryptone on the production of chitobiase. X₁ and X₂ represent colloidal chitin and tryptone, respectively.

Table 1. Summary of purification procedures of chitobiase

Purification step	Total protein (mg/ml)	Total activity (units)	Sp. activity (units/mg)	Yield (%)	Fold
Culture broth	1,770.0	300.0	0.17	100.0	1.0
Ammonium sulfate precipitation	498.6	277.3	0.56	92.4	3.3
Chitin affinity adsorption	241.9	222.0	0.92	68.4	5.4
DEAE-cellulose chromatography	52.8	201.6	3.80	67.2	22.4
Hydroxylapatite chromatography	36.4	178.5	4.91	59.5	28.9
Sephadex G-200 gel filtration	26.4	141.6	5.36	47.2	31.5

sphate buffer(0.2 M, pH 7.0)에 녹인 다음 chitinase unit당 20~200 g(dry base)의 colloidal chitin을 첨가하여 0°C에서 1시간 동안 교반하여 chitinase를 흡착하였다 (흡착율 89%). 그 후 4,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 분리하고 흡착되지 않고 잔존(잔존율 93%)한 chitinase를 회수하였다.

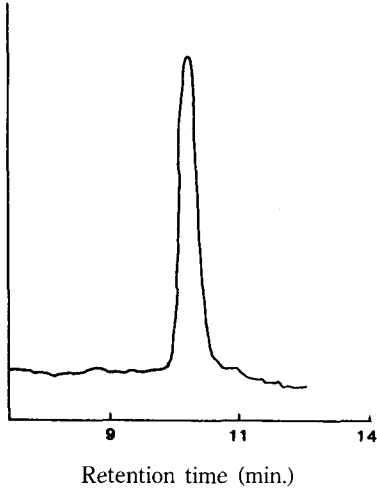


Fig. 2. Separation of chitinase by HPLC. Column, MicroPak gel type 3000 SW; Mobile phase, 67 mM K₂HPO₄+0.1 M KCl; Detector, UV (280 nm)

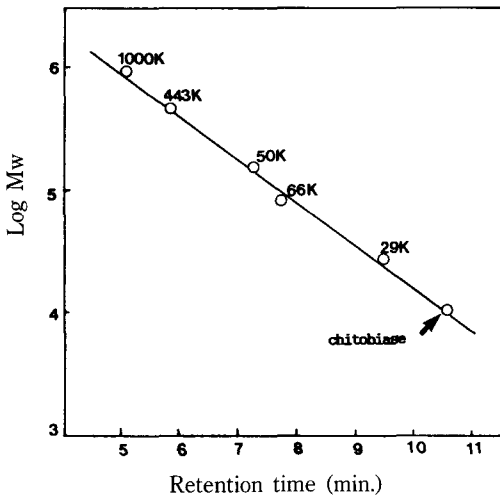


Fig. 3. Molecular weight determination of chitinase by HPLC.

Bule dextran (Mw. 1,000,000), apoferritin (Mw. 443,000), alcohol anhydrase (Mw. 150,000), bovine serum albumin (Mw. 66,000) and carbonic anhydrase (29,000) were used for size marker proteins.

Chitinase의 정제

Chitin affinity adsorption에서 분리된 chitinase 분리액을 DEAE-cellulose column(2~20 cm)에 통과시켜 0.01 M citrate-phosphate buffer(pH 6.5)로 충분히 세척한 후 0.0~0.5 M NaCl gradient를 걸어주어 용출하였다. 이 때 chitinase 활성을 나타내는 부위를 모아 hydroxylapatite column chromatography와 gel filtration을 행한 결과 총단백질 26.4 mg, 수율 47.2%, 비활성 5.36 units/mg이었으며 정제도는 31.5배이었다(Table 1).

효소의 물리화학적 성질

1) 효소의 분자량—정제한 chitinase를 MicroPak type 3000 SW column을 이용하여 HPLC를 행한 결과 (Fig. 2) 불순단백질이 없는 단일 peak로 나타났으며, 같은 column을 이용하여 분자량을 알고 있는 표준시료의 용출시간과 비교한 결과 Fig. 3과 같은 직선관계를 얻었으며 이로부터 chitinase의 분자량은 15,000 daltons로 추정되었다.

2) 효소 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향—Chitinase 반응에 대한 최적 pH를 알아보기 위해 0.2 M citrate-phosphate buffer(pH 3.0~6.0), 0.2 M Na-phosphate buffer(pH 6.0~8.0), 0.2 M tris-NaOH buffer(pH 8.0~9.0), 0.2 M glycine-NaOH buffer(pH 9.0~11.0)를 사용하여 각 pH별로 반응액을 만든 다음 효소액을 가해 40°C에서 60분간 반응시킨 후 효소의 활성을 측정하였다. Chitinase의 최적 pH는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 6.0으로서 *Aeromonas*³³⁾의 최적 pH 7.0과는 유사하였으나 *Aspergillus*³⁴⁾의 4.4, *Streptomyces*¹⁰⁾의 4.7에 비해서는 높

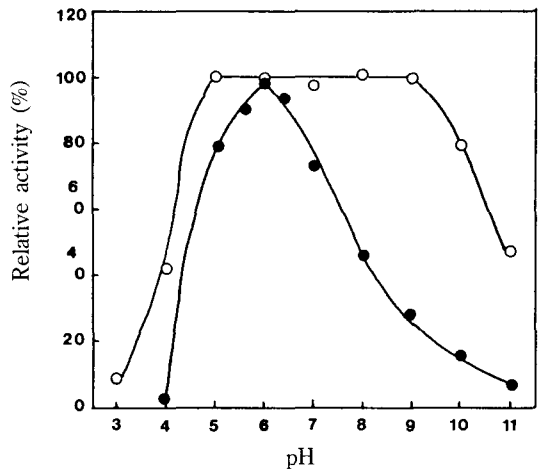


Fig. 4. Effect of pH on the stability and activity of chitinase.

●: Activity, ○: Stability

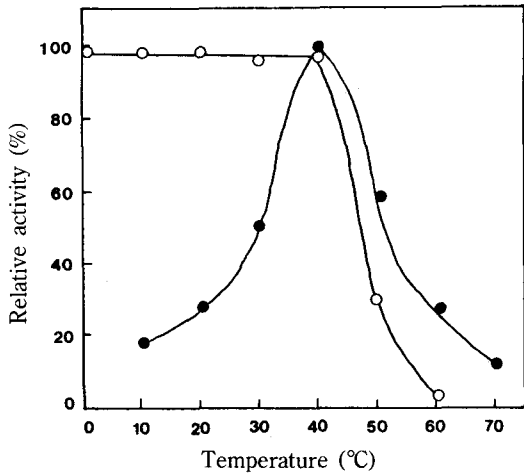


Fig. 5. Effect of temperature on the stability and activity of chitobiase.

●: Activity, ○: Stability

은 결과를 보였다.

한편 chitobiase에 대한 pH 안정성을 검토한 결과는 chitinase에서와 같이 pH 5.0~9.0사이에서 안정성을 보여주었다.

3) 효소 활성 및 열안정성에 미치는 온도의 영향- Chitobiase의 최적 작용온도를 알아보기 위해 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 및 70°C의 각 온도에서 효소 활성을 측정하여 본 결과 Fig.5에서와 같이 최적온도는 40°C이었으며, 40°C까지 열안정성을 가지고 있었으나 50°C에서 30% 정도 잔존활성을 나타내었으며 60°C에서는 거의 실패되었다. 이는 최적온도가 50°C이고 45°C까지 안정성을 보유하고 있는 *Aeromonas hydrophila*³³⁾에 비해 낮음을 알 수 있었다.

Chitobiase의 활성중심

Chitobiase는 단백질 -SH에 작용하는 Hg와 Ag, 그리고 -SH기 저해제로 알려진 sodium dodecylsulfate(SDS), sodium azide 및 para-chloromercury benzoate(p-CMB)에 의하여 저해를 받았으며 이들 저해현상은 β-mercaptoethanol의 환원력에 의하여 역제를 받았으나 EDTA에 의해서 활성이 회복되지 않았으므로 활성중심에는 cysteine 잔기가 있는 것으로 생각되어졌다.

Serine의 -OH에 특이적으로 작용하는 phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)에 의하여 저해를 받았으며 tryptophan 저해제인 N-bromosuccinimide에도 저해를 받았고, cysteine, histidine, tyrosine 및 tryptophan에 작용하는 iodine에 의해서 저해를 받았다(Table 2).

이상의 결과를 종합하면 chitobiase 활성중심에는 cys-

Table 2. Effect of chemicals on the chitobiase activity

Chemicals (1 mM)	Relative activity (%)
None	100.0
HgCl ₂	7.8
AgNO ₃	0.0
β-mercaptoethanol	101.2
Na-thiosulfate	68.8
EDTA	101.6
SDS	23.4
Na-azide	45.3
Na-citrate	79.7
PMSF	42.2
Iodine	0.0
p-CMB	58.4
Hydroxylamine	46.2
N-bromosuccinimide	11.5

teine, serine, tyrosine, tryptophan, histidine, aspartic acid 및 glutamic acid 등이 관여하는 것으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 연세대학교 학술연구비에 의해 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Minke, R. and Blackwell, J.: J. Mol. Biol., 120 : 167 (1978)
2. Clarke, P. H. and Tracey, M. V. : Gen. Microbiol., 14 : 150(1956)
3. Jeuniaux, C.: Arch. Int. Physiol. Biochem., 67 : 597 (1959)
4. Oranusi, N. A. and Trinci, A. P.: J. Microbiol., 43 : 17 (1985)
5. Takahashi, M. and Sasaki, H.: Nippon Nogeikagaku Kaishi, 56 : 1227(1986)
6. Yabuki M., Takayama, K. Ando, A. and Fujii, T. Tech. Bull. Faculty Haticulture, Chiba University, NO. 34 : 21(1984)
7. Reynolds, D. M.: J. Gen. Microbiol., 11 : 150(1954)
8. Charpentier, M. and Percheron, F.: Int. J. Biochem., 15 : 289(1983)
9. Skujins, J. J. and Potgieter, H. H. : Arch. Biochem. Biophys., 111 : 358(1965)
10. Pirieva, D. A. and Chigaleichik, A. G.: Microbiology, 46 : 661(1977)

11. Tjunova, N. A.: Microbiology, 52 : 723(1983)
12. Hou, H. H. and Jong, S. C.: J. Ferment. Technol., 63 : 189(1985)
13. Monaghan, R. L. and Eveleigh, D. E.: Nature New Biol., 245 : 78(1973)
14. Vessey, J. C. and Pegg, G. F.: Trans. Brh. Mycol. Soc., 60 : 133(1973)
15. Elango, N., Correa, J. U. and Cabib, E.: J. Biol. Chem., 257 : 1398(1982)
16. Zarain, H. A. and Arroyo, B. A.: J. Gen. Microbiol., 129 : 3319(1983)
17. Humphreys, A. M. and Gooday, G. W.: J. Gen. Microbiol., 130 : 1359(1984)
18. Smith, R.: J. Invertebr. Pathol., 42 : 319(1983)
19. Tracey, M. V.: Biochem. J., 61 : 574(1955)
20. Chang, K. I., Kang, S. O. and Shin, Y. C.: Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20 : 511(1992)
21. Chang, K. I., Kim, K. S. Cho, M. J. Lee, S. Y. and Shin, Y. C.: Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 20 : 129(1992)
22. Lee, S. Y., Gal, S. W. Hwang, J. R. Yoon, H. W. Shin, Y. C. and Cho, M. J.: J. Microbiol. Biotechnol., 2 : 209 (1992)
23. Lee, S. M.: Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21 : 6 (1993)
24. Reisert, P. S.: Mycologia, 64 : 288(1972)
25. Means G. E. and Feeny, R. E.: Chemical Modification of proteins, Holden-Day Inc.(1971)
26. Whitaker J. R.: 'Principles of Enzymology for the Food Sciences', Marcel Dekker, Inc., New York (1972)
27. Lee K. P., C. N. Kim, C. N., Yu, J. H. and Oh, D. H.: Kor. J. Microbiol. Biotech. 18 : 599(1990)
28. Lee K. P., Choi, S. J., Moon, S. O. and Oh, D. H.: Kor. J. Microbiol. Biotech., 20 : 68(1992)
29. Yabuki, M. and Mizushina, K.: J. Gen. Appl. Microbiol., 32 : 25(1986)
30. Roberts, R. L. and Cabib, E.: Anal. Biochem., 127 : 402(1982)
31. Jeuniaux, C.: Methods in Enzymology, 8 : 644(1966)
32. Jeuniaux, C.: Arch. Internat. Physiol. Biochem., 67 : 597(1959)
33. Yabuki, M. and Tsujisaka, Y.: Agric. Biol. Chem., 43 : 2607(1989)
34. Jones, C. J. and Kosman, D. J.: J. Biol. Chem., 255 : 11861(1980)
35. Box G. E. P. and Wilson, K. P.: J. Roy. Stat. Soc., 1 : 1313(1951)

Studies on chitobiase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625

Kang-Pyo Lee*, Dong-Seob Kim, Sung-Sik Yoon and Doo-Hwan Oh (Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, *Food and R & D Center, Che-II Sugar Company, Seoul 152-050, Korea, **Department of Dairy Science, Yonsei University, Wonju 228-840, Korea)

Abstract : Chitobiase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625 was purified from culture broth through ammonium sulfate precipitation, chitin affinity adsorption, hydroxylapatite column chromatography and gel filtration, with 47.2% yield and 31.5 fold purity. The molecular weight of purified chitobiase was 15,000 daltons, and the chitobiase shows maximum activity at the condition of at 40°C and pH 6.0. The effects of various metal ions and inhibitors show that cysteine, glutamic acid, serine, tryptophan, and tyrosine residues seem to be concerned in chitobiase activity.