

Bacillus licheniformis KFB-C14가 생산하는 내열성 Chitinase의 정제 및 특성

홍범식 · 윤호근 · 신동훈 · 조홍연^{1*}

고려대학교 생명공학원, ¹고려대학교 생명공학원 및 연세대학교 생물산업소재연구소

Purification and Characterization of Thermostable Chitinase from *Bacillus licheniformis* KFB-C14. Bum-Shik Hong, Ho-Geun Yoon, Dong-Hoon Shin and Hong-Yon Cho^{1*}. Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea - Chitinase (EC 3.2.1.14) from culture fluid of *Bacillus licheniformis* KFB-C14 was purified 66-folds to homogeneity in overall yield of 21% by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Toyopearl, Butyl-Toyopearl and TSK-Gel HW-55F column chromatography. The enzyme protein had a molecular weight of about 86,000 and was composed of one subunit. The enzyme was significantly stable not only at high temperature but also on treatment with organic solvents and protein denaturants such as SDS, urea and guanidine·HCl. The optimum temperature and pH for reaction was 60°C and 6.0, respectively. The enzyme activity was inhibited by only Mn²⁺ ion, but not inhibited by EDTA, *N*-ethylmaleimide and *p*CMB. The enzyme had high activity with colloidal chitin (V_{max} : 421) and commercial chitin (V_{max} : 480), but not with typical substrates of exo type chitinase. The thermostable chitinase had an useful reactivity for producing functional chitooligosaccharide, showing the production of (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂, and (GlcNAc)₃ as major product.

Chitooligosaccharide는 GlcNAc(*N*-acetyl-D-glucosamine) 2~8개가 β-1,4 결합한 올리고당으로 구성당이 당유도체인 점과 기존의 올리고당에 비해 다양한 생리활성을 나타내는 점에서 식품·의약품 중간원료소재로 주목을 받고 있다(1). Chitin 올리고당의 산분해에 의한 제법은 부분가수분해 조건에 따라 여러 종류의 올리고머와 부산물이 생성되기 때문에 일정 크기를 갖는 목적 올리고당의 생산 및 분리정제가 어렵고, (GlcNAc)₅ 이상의 올리고당 수율이 낮은 결점을 가지고 있다(2-4). 근년에 이르러 미생물로부터 chitin을 일정 크기로 가수분해하는 endochitinase(EC 3.2.1.14)들(5)과 당 전이활성을 갖는 chitinase들(6-8)이 분리됨에 따라 효소법에 의한 chitin 올리고당의 제법이 시도되고 있다.

전보(9)에서 저자들은 chitin 올리고당의 효소적 합성에 있어 공업적으로 유용성이 높고 당 전이 반응계에 적용이 용이한 내열성 chitinase 생산균주를 자연계의 고온환경으로부터 분리하고 효소생산과 관련된 균주의 배양특성을 보고한 바 있다. 분리균주 *Bacillus licheniformis* KFB-C14가 생산하는 이 효소는 colloidal chitin으로부터 반응산물로 (GlcNAc)₁, (GlcNAc)₂와 미량의 (GlcNAc)₃를 생성하였다. Chitin 올리고당의 생산을 위한 효소합성계의 검토와 설계를 위해, 일차적으로 이들의 반응성이 두가지 이상의 효소들에 의한 활성일 가능성과 하나의 효소가 갖는 부반응성 또는 전이활성

일 가능성에 대한 명확한 규명이 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 분리균주가 생산하는 내열성 chitinase를 전기영동적으로 균일하게 정제한 후 정제 효소의 반응성과 함께 일부 효소단백질의 구조적, 촉매활성적 성질을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

내열성 chitinase의 생산용 균주는 전보(9)에서 보고한 바 있는 자연계의 고온환경으로부터 분리, 동정된 호열성 세균 *Bacillus licheniformis* KFB-C14를 사용하였다.

Colloidal chitin의 조제 및 기질용 chitin

효소생산용 배지의 탄소원과 유도제로 사용한 colloidal chitin은 Lockwood(10) 방법을 변형하여 전보와 같이 조제하였으며 효소반응계의 chitin은 Sigma Co. (St. Louis, MO)의 기질용 chitin(purified powder from crab shells)을 사용하였다.

효소생산 조건

내열성 chitinase 생산균주인 *Bacillus licheniformis* KFB-C14를 전보(9)에서 최적화된 효소생산조건에 따라 1.2% colloidal chitin, 0.15% K₂HPO₄, 0.05% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄·7H₂O 및 0.1% yeast extract가 함유된 효소생산용 배지(pH 6.5) 100 ml을 500 ml baffle flask에

*Corresponding author.

Key words: Thermostable chitinase, *Bacillus licheniformis* KFB-C14, chitooligosaccharide

넣고 효소생산용 배지 중 colloidal chitin을 glycerol로 대체한 배지에서 활성화시킨 전배양액 1%(v/v)를 접종한 후 배양온도 55°C, 150 rpm에서 40시간 회전진탕 배양하였다.

효소활성 측정 및 단백질 정량

1.0% Chitin 용액 250 μ l, 1.0 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 50 μ l, 효소액 및 물로 구성된 1,000 μ l의 효소반응계를 55°C water bath에서 30분 동안 진탕반응시킨 후 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리하여 얻은 상등액내 환원당의 양을 Miller의 방법(11)을 변형한 DNS법으로 정량하여 효소활성을 측정하였다.

효소활성단위는 상기의 표준반응계에서 1시간에 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

단백질은 표준물질로서 bovine serum albumin을 사용, Lowry 등(12)의 방법에 의해 정량하였다.

효소의 정제

조효소액의 조제 상기의 배양액을 원심분리(14,000 \times g, 30분)하여 얻은 상등액에 대표적인 단백분해효소 저해제인 phenylmethylsulfonyl fluoride와 1-tosylamido-2-phenylethylchloromethyl ketone을 각각 0.1 mM과 0.05 mM이 되게 첨가한 후 조효소액으로 하였다.

Ammonium sulfate fractionation 조효소액을 ice bath상에서 서서히 교반하면서 유안 분말을 포화도 30% 농도까지 첨가하고, 30분 방치한 후 원심분리(14,000 \times g, 10분)한 상등액에 동일한 방법으로 유안을 첨가, 포화 70% 농도에서 1시간 방치하고 원심분리하였다. 원심분리에 의해 침전한 효소단백질에 10 mM 인산염 완충용액을 최소량 가하여 용해시킨 후 동일 완충용액으로 투석하였다.

DEAE-Toyopearl column chromatography 투석한 효소액을 10 mM phosphate buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 DEAE-Toyopearl 650M(Toyo Soda Manf., Tokyo) column(1.8 \times 30 cm)에 흡착시키고 동일한 완충용액으로 세척한 후 효소단백질을 0~0.3 M KCl 직선농도 구배로 용출시키고 활성부분을 모아 유안분말(70% 포화)로 침전시킨 다음 인산염 완충용액을 가하여 포화도 약 30%의 유안 효소액을 조제하였다.

Butyl-Toyopearl column chromatography 30% 포화유안 효소액을 30% 포화유안 완충용액으로 평형화시킨 Butyl-Toyopearl 650M(Toyo Soda Manf., Tokyo) column(1.6 \times 30 cm)에 주입한 후 30~0% 포화유안 직선농도 구배를 사용하여 효소를 용출시킨 다음 활성분획을 모아 Amicon ultrafiltration membrane을 사용하여 농축, 인산염 완충용액에서 투석하였다.

TSK-Gel filtration 농축한 효소액을 50 mM KCl이 함유된 인산염 완충용액으로 평형화시킨 TSK-Gel HW-55F(Toyo Soda Manf., Tokyo) column(1.5 \times 70 cm)에 약 2 ml씩 분주하고 동일 완충용액을 사용하여 10 ml/hr의 유속으로 목적 효소단백질을 용출시킨 다음 10 mM 인산염 완충용액으로 투석, 농축하여 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다.

효소의 분자량 및 pI 측정

정제된 효소단백질의 분자량은 상기에 기술한 TSK-Gel permeation chromatography를 이용하여 측정하였으며 표준단백질(Boehringer Mannheim, Germany)로 Cytochrome C(12.5 kDa), Chymotrypsinogen A(25 kDa), Hen egg albumin(45 kDa), Bovine serum albumin(68 kDa), Aldolase(158 kDa), Catalase(240 kDa), Ferritin(450 kDa)을 사용하였다. 정제효소단백질의 pI는 Phastsystem(Pharmacia Co.)과 Phast Gel IEF media(pI 3~9)를 이용하여 측정하였으며 표준단백질로 Cytochrome C(9.6), Lentil lectin(7.8, 8.0, 8.2), Human hemoglobin A(7.1), Equine myoglobin(7.0), Human carbonic anhydrase(6.5), Bovine carbonic anhydrase(6.0), β -Lactoglobulin B(5.1), Phycocyanin(4.65)를 사용하였다.

SDS polyacrylamide gel 전기영동 및 효소 sub-unit의 분자량 측정

Subunit의 분자량 측정 및 구조해석을 위한 sodium dodecyl sulfate(SDS)/10% polyacrylamide gel 전기영동은 King과 Laemmli 법(13)에 준하였다. 표준단백질(Boehringer Mannheim, Germany)은 Triose phosphate(26.6 kDa), Aldolase(39.2 kDa), Glutamate dehydrogenase(55.6 kDa), Fructose-6-phosphate kinase(85.2 kDa), β -Galactosidase(116.4 kDa), α -Macroglobulin(170 kDa)을 분자량 marker로서 사용하였다. Native polyacrylamide gel 전기영동은 Davis 법(14)에 준하였다.

효소단백질의 N-말단 아미노산 배열 분석

10 mM 인산염 완충용액으로 투석한 약 0.1 nmole의 정제효소단백질을 gas-liquid phase protein sequencer(Applied Biosystems Model 470A)로 Edman 분해시킨 후 phenylthiohydantoin(PTH) 아미노산 유도체를 분리 PTH analyzer(Applied Biosystems Model 120A)를 이용하여 아미노산 배열을 분석하였다.

Chitooligosaccharide의 HPLC 분석

효소반응에 의한 chitin 분해물을 HPLC의 YMC-pack polyamine II column(YMC Co.)을 사용하여 acetonitrile과 물(75 : 25)로 용출시키고 RI detector로 분석하

였다. 표준시료는 N-acetyl-D-glucosamine, chitobiose (이상 Sigma Co.), chitotriose, chitotetraose, chitopentaose, chitohexaose(이상 Seikagaku Co., Tokyo)를 사용하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

전보(9)에서 검토한 비활성이 높도록 최적화한 배지 21에 Bacillus licheniformis KFB-C14를 배양하여 얻은 조효소액으로부터 Table 1의 정제단계에 따라 수율 21%, 정제도 66배로 내열성 chitinase를 전기영동적으로 균일하게 정제하였다. 조효소액 중의 chitinase 단백질은 예상했던 것과 같이 native polyacrylamide 젤 전기영동상에 main band를 나타냄으로써 용이하게 정제되었으며 고온의 생육환경에서 분비된 내열성효소로서 정제과정 중 실활됨이 없이 비교적 높은 수율로 정제할 수 있었다. 정제 효소의 비활성(489 units/mg)은 Aeromonas(15), Aspergillus(16), Streptomyces(17)보다 높았으며 Mucor(18), Saccharomyces(5)보다는 낮은 값을 나타내었다.

정제효소는 gel permeation liquid chromatography의 용출패턴상에 단백질 peak와 활성 peak가 대칭적으로 일치하였으며 native polyacrylamide gel, denatured SDS-polyacrylamide gel(Fig. 1) 및 등전점 전기영동에서 모두 단일 band를 보임으로써 순도 높은 단일 단백질임을 알 수 있었다.

효소의 분자량, subunit 구조 및 pI

SDS polyacrylamide 젤 전기영동을 이용하여 표준 단백질로부터 구한 chitinase의 분자량은 약 86,000±2,000이었으며(Fig. 1-A), TSK-Gel Toyopearl column chromatography를 이용하여 구한 분자량(Fig. 1-B)은 SDS polyacrylamide 젤 전기영동으로부터 구한 분자량 값과 일치함으로써 본 효소단백질의 subunit 구조는 단일 polypeptide 사슬에 의해 이루어진 monomer임을 알 수 있었다. 현재까지 보고된 미생물이 생산하는 chitinase의 분자량은 Aeromonas 속들의 105,000~110,000 (19), Vibrio 속들의 60,000~63,000(20), Serratia 속들

의 50,000~58,000(21), Streptomyces와 Mucor 속들의 30,000~38,000(17, 18), Bacillus licheniformis X-7u의 chitinase I 89,000, II 76,000, III 66,000, IV 59,000(7) 등이 밝혀져 있으며 subunit 구조는 식물과 미생물 기원의 모든 효소가 monomer로 보고되어 있다.

Phastsystem(Pharmacia Co.)과 Phast Gel IEF media(pI 3~9)를 이용하여 표준단백질과 비교 측정된 본 효소의 pI는 9.4로 본 효소는 염기성 아미노산이 산성 아미노산의 함량보다 높은 염기성 단백질일 것으로 추정되었다.

N-말단 아미노산 배열

Edman 분해에 의해 결정된 정제효소 단백질의 N-말단 아미노산 서열은 N-Ser-Arg-Gly-His-Asn⁵-Tyr-Ala-Lys-Lys-Gly¹⁰-Tyr-Thr-Leu-Ser-Pro¹⁵-Met-Ile-로 밝혀

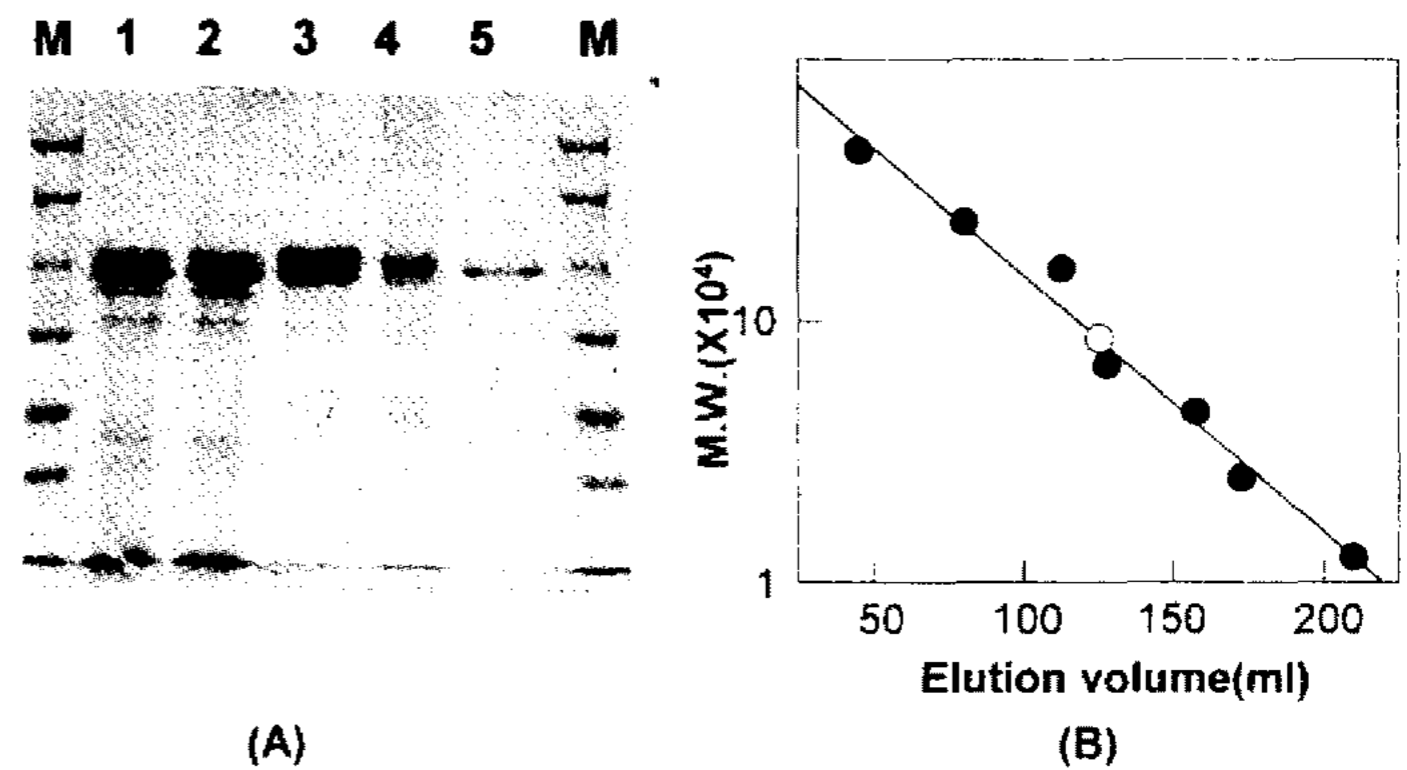


Fig. 1. SDS-PAGE pattern (A) and molecular weight determination (B) of purified chitinase from Bacillus licheniformis KFB-C14.

Lane M, Size marker; 1, Crude enzyme; 2, Ammonium sulfate fractionation; 3, DEAE-Toyopearl 650M; 4, Butyl-Toyopearl 650M; 5, TSK-Gel HW-55F. The bands of protein standards in order of decreasing molecular weight; α-Macroglobulin, 170,000; β-Galactosidase, 116,400; Fructose-6-phosphate-kinase, 85,200; Glutamate dehydrogenase, 55,600; Aldolase, 39,200; Triose phosphate, 26,000. The protein standards (●) for determination of molecular weight by gel permeation chromatography were: Ferritin, 450,000; Catalase, 240,000; Aldolase, 158,000; Albumin (bovine serum albumin), 68,000; Albumin (hen egg), 45,000; Chymotrypsinogen, 25,000; Cytochrome C, 12,500 and the purified chitinase (○) was shown.

Table 1. Purification of thermostable chitinase from Bacillus licheniformis KFB-C14

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity (units) | Specific activity (units/mg) | Yield (%) | Purification folds |
|--------------------------------|--------------------|------------------------|------------------------------|-----------|--------------------|
| Crude enzyme | 989 | 7,350 | 7.43 | 100 | — |
| Ammonium sulfate (30~70%) | 249 | 6,030 | 24.2 | 82 | 3.0 |
| DEAE-Toyopearl chromatography | 30.2 | 3,380 | 112 | 46 | 15 |
| Butyl-Toyopearl chromatography | 8.48 | 2,060 | 243 | 28 | 33 |
| TSK-Gel HW-55F gel filtration | 3.15 | 1,540 | 489 | 21 | 66 |

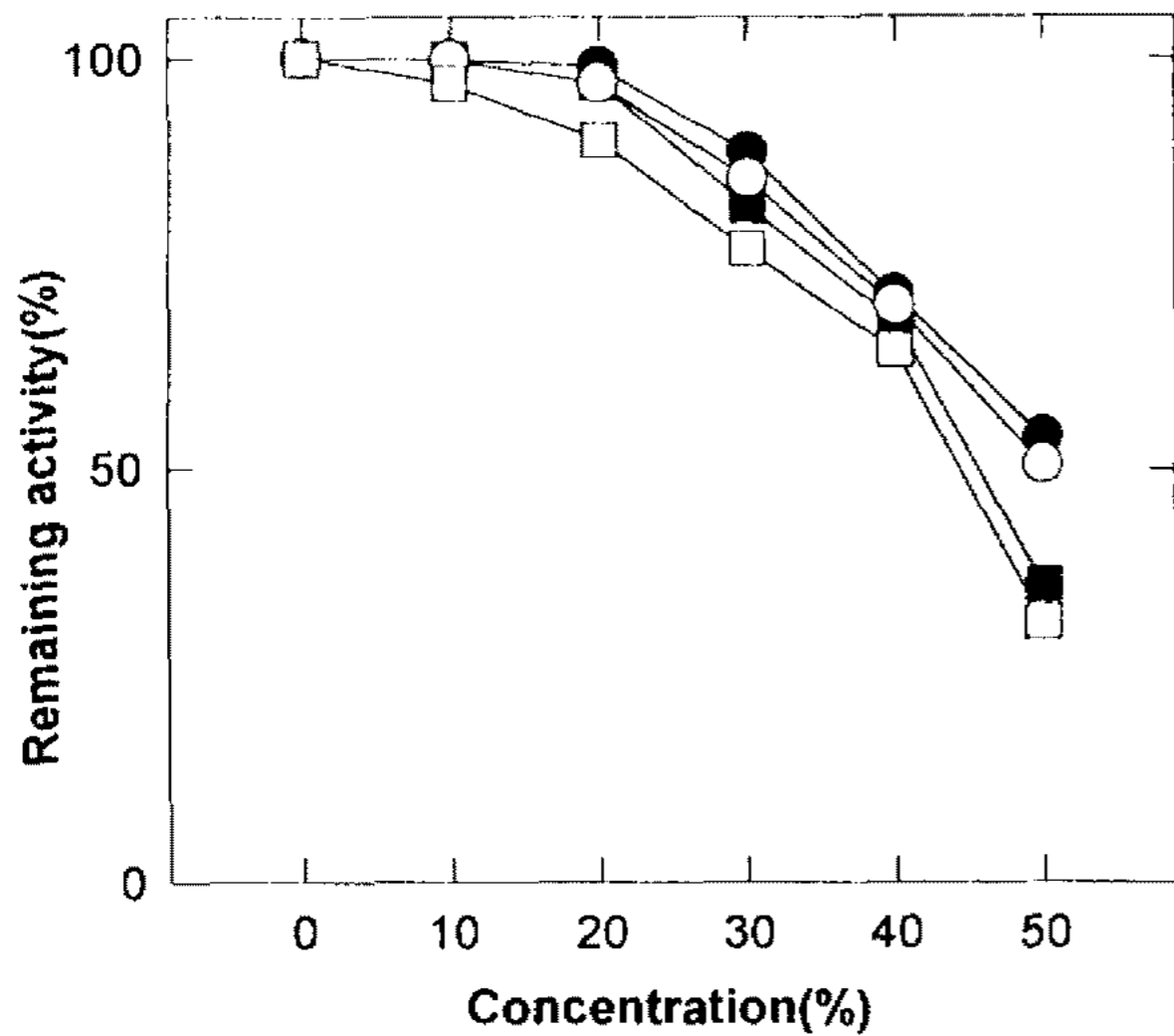


Fig. 2. Effect of ethanol and ethylacetate on stability of thermostable chitinase.

The enzyme (0.5 mg/ml) was incubated in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing ethanol (○; 37°C, □; 55°C) or ethylacetate (●; 37°C, ■; 55°C) for 20 min, and then the remaining activity was assayed after ultrafiltration with Centricon-10 (Amicon Co.).

졌으며 이 서열의 구성아미노산 조성에 있어 특이한 현상은 관찰되지 않았다. Edman 분해의 각 cycle에서 이들 아미노산들은 뚜렷한 하나의 주 PTH 유도체 peak를 나타냄으로써 본 효소단백질은 단일의 polypeptide로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 현재까지 보고된 다른 기원의 chitinase의 N-terminal 아미노산배열 또는 효소유전자의 염기배열과의 상동성을 분석한 결과 주목되는 유사성은 발견하지 못하였다.

효소의 안정성

본 연구의 목적인 생체조절성 chitin 올리고머를 생산함에 있어 가수분해 반응 이외에 역합성 반응과 당전이 반응에 의한 올리고머의 효소합성시 가장 중요한 요소인 유기용매계 내에서의 효소 안정성을 검토하였다. 유기용매로 ethanol과 ethyl acetate를 선택하여 37°C와 55°C에서 20분간 처리한 후 잔존활성을 측정하는 결과 (Fig. 2), 50%의 농도에서는 잔존활성이 50% 이하를 나타내었지만 20%의 농도에서는 온도와 유기용매에 관계없이 안정함을 보임으로써 유기용매계내에서 chitin 올리고머의 효소 적합성이 가능함을 제시해 주었다. 효소의 공업적 유용성을 알아보기 위해 대표적 단백질 변성제인 urea와 guanidine·HCl을 사용하여 효소단백질의 안정성을 검토한 결과 4 M urea, 2 M guanidine·HCl 처리에 의해 85%, 8 M urea, 4 M guanidine·HCl 처리에 의해서도 50% 정도의 잔존활성을 유지함으로써 효소단백질의 구조가 매우 안정함을 알 수 있었다(Fig. 3). Fig. 4는 본 효소 특성중의 하나인 효소단백질의 열안정성을 검토한 결과로 80°C에서 30분과 10분 처리

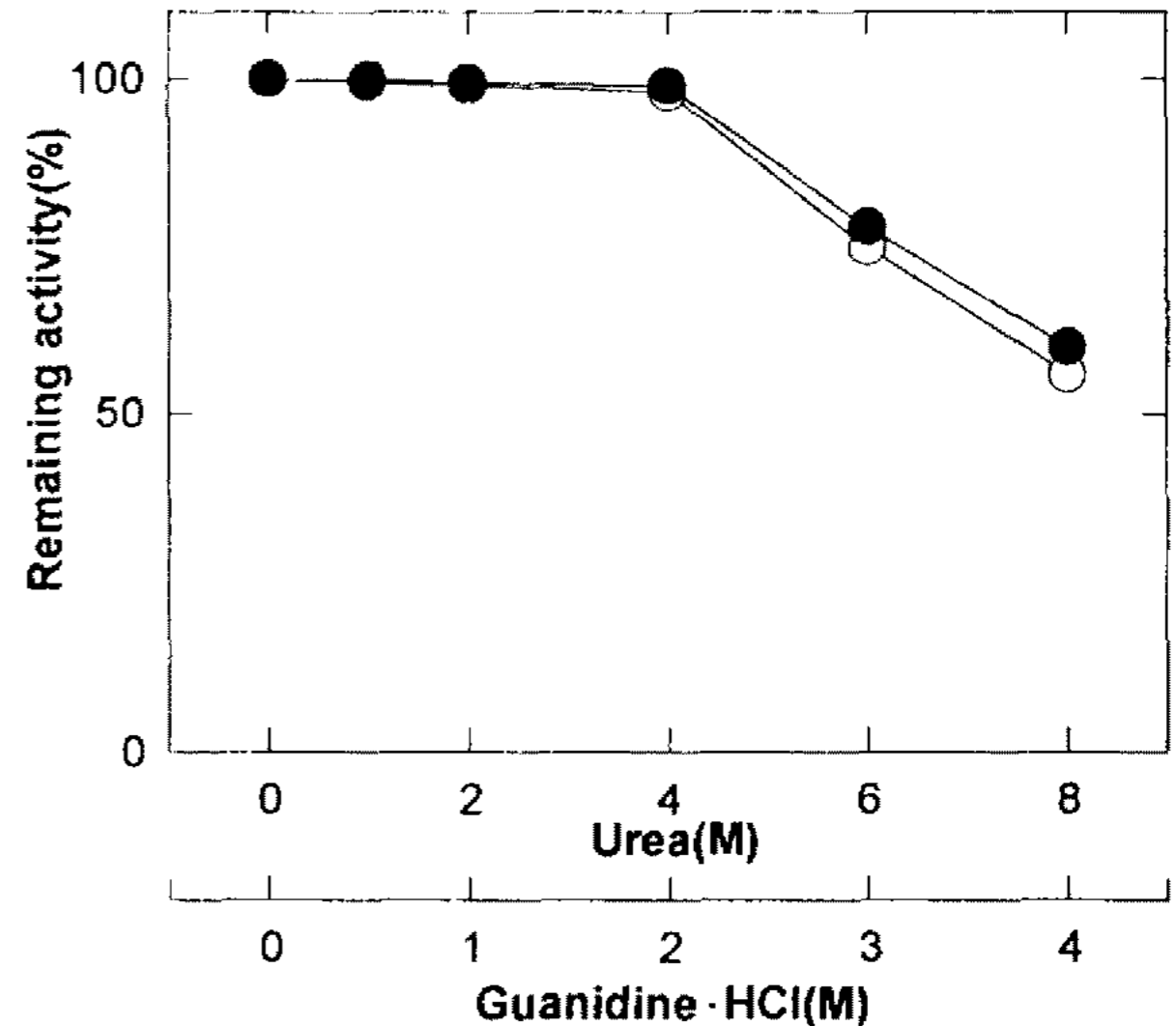


Fig. 3. Effect of urea and guanidine·HCl on stability of thermostable chitinase.

The enzyme (0.5 mg/ml) was incubated in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing urea (●) and guanidine·HCl (○) at 37°C for 20 min, and then the remaining activity was assayed after ultrafiltration with Centricon-10 (Amicon Co.).

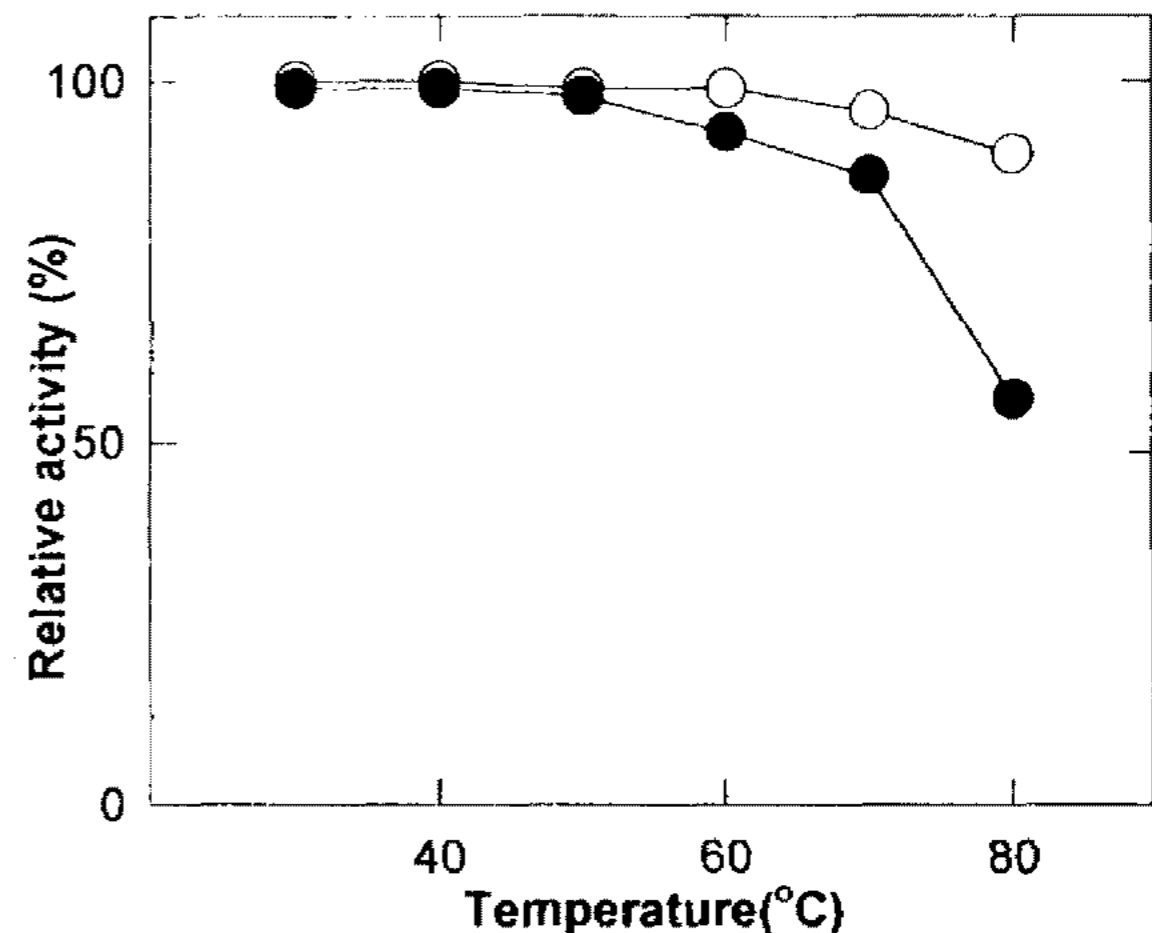


Fig. 4. Thermostability of chitinase.

The enzyme (0.5 mg/ml) was incubated in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) at various temperature for 10 min (○) and 30 min (●), and the remaining activity was measured.

에 의해서 각각 56%와 75% 이상의 잔존활성을 나타내었다. 한편 효소의 pH 안정성은 pH 4 이하에서는 활성이 감소하는 경향을 보였지만 pH 5~10 사이에서 90% 이상의 잔존활성을 유지함으로써 산·알칼리에도 비교적 안정한 단백질이었다.

효소의 촉매활성적 특성

표준효소반응계에서 최적 pH는 6.0(acetate 완충용액) 이었고 50 mM acetate 완충용액(pH 6.0)을 사용한 표준효소반응계는 반응온도 60°C에서 가장 높은 활성을

Table 2. Effect of metal ions, reducing agents and chemicals on thermostable chitinase activity

| Chemicals (1 mM) | Relative activity (%) |
|--------------------------------------|-----------------------|
| None | 100 |
| HgCl ₂ | 89.4 |
| CaCl ₂ | 97.4 |
| MnCl ₂ | 63.7 |
| Pb(CH ₃ COO) ₂ | 98.9 |
| NiCl ₂ | 93.1 |
| FeSO ₄ | 96.1 |
| ZnCl ₂ | 95.9 |
| CoCl ₂ | 99.7 |
| CuSO ₄ | 90.0 |
| MgSO ₄ | 96.7 |
| Na-thiosulfate | 96.3 |
| Na-sulfite | 91.7 |
| Na-citrate | 90.1 |
| Cysteine | 95.4 |
| Ascorbic acid | 100 |
| β-Mercaptoethanol | 96.2 |
| EDTA | 90.1 |
| Iodoacetate | 91.8 |
| N-Ethylmaleimide | 91.4 |
| pCMB | 94.0 |
| Sodium azide | 99.4 |

The enzyme was pre-incubated in 50 mM potassium phosphate buffer containing the various compounds at 55°C for 5 min and enzyme activity was measured under the standard assay condition. Abbreviation: EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; pCMB, p-chloromercuribenzoic acid.

나타내었다. 각종 금속이온들에 의한 효소활성 변화를 검토한 결과 1.0 mM의 농도에서 Hg²⁺와 Cu²⁺는 10%, Mn²⁺는 37%의 활성저해를 나타내었으나, 그 외 효소활성의 증감에 영향을 미치는 금속이온은 관찰되지 않았다. 한편 일부 환원제와 각종 화합물들이 정제효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 환원제들과 킬레이트제인 EDTA, -SH기의 특이적 저해제인 pCMB, N-ethylmaleimide, iodoacetate 등에 의해서도 90% 이상의 잔존활성을 나타냄으로써 본 효소는 금속 또는 thiol계 효소에 속하지 않는 것으로 판명되었다(Table 2).

효소의 기질 특이성

Chitin, chitin 유도체, chitooligosaccharide 유도체 등을 사용하여 효소의 기질 특이성을 검토한 결과 chitin(Sigma Co.)과 colloidal chitin에 대해서는 반응성이 높았으나 exo형 chitinase의 대표적 기질인 p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-glucopyranoside, N,N'-diacetylchitobiose, N,N,N'-triacetylchitotriose에는 전혀

Table 3. Substrate specificity of thermostable chitinase from Bacillus licheniformis KFB-C14

| Substrate | Relative activity (%) | V _{max} (μmol/hr/mg) | Km (mg/ml) |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------------|------------|
| Chitin (Sigma Co.) | 100 | 480 | 2.0 |
| Colloidal chitin | 89.0 | 421 | 3.3 |
| Chitosan | 0 | 0 | 0 |
| Glycolchitosan | 0 | 0 | 0 |
| N,N,N'-triacetylchitotriose | 0 | 0 | 0 |
| N,N'-diacetylchitobiose | 0 | 0 | 0 |
| pNPGlcNAc | 0 | 0 | 0 |

The enzyme activity was measured under the standard assay condition. The Km and V_{max} were calculated from double-reciprocal plots of reaction rates against substrate concentrations. Abbreviation: pNPGlcNAc, p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-glucopyranoside.

반응을 보이지 않음으로써(Table 3) Bacillus licheniformis KFB-C14가 생산하는 thermostable chitinase는 endo형 chitinase(EC 3.2.1.14)임을 알 수 있었다. Lineweaver-Burk plot에 의해 구한 Km치는 2.0 mg/ml로 Aeromonas hydrophilia chitinase의 2.8(19), Candida albicans의 3.9(22), Saccharomyces cerevisiae의 4.4(5), Stomoxys carcitrans의 33.0(23) 등과 비교할 때 Bacillus licheniformis KFB-C14가 생산하는 thermostable chitinase는 기질 chitin에 대하여 높은 친화력을 보였다.

Chitooligosaccharide의 생산활성

정제효소의 가수분해 활성과 당전이 활성에 의한 chitin 올리고당의 생성여부를 검토하기 위해 표준반응계보다 높은 농도의 기질과 효소를 사용하여 55°C에서 48시간 동안 반응시키면서 효소반응산물을 분석하였다(Fig. 5). 반응초기부터 생성된 주 chitin 올리고당은 (GlcNAc)₂로 반응시간 경과에 따라 증가하였고 (GlcNAc)₃는 24시간 전후에서 생성된 후 증가하는 경향을 나타내었다. 이 결과들로부터 본 효소의 주 반응성이 (GlcNAc)₂의 생성에 관여하는 가수분해활성임을 알 수 있었으며 24시간 이후 나타나는 (GlcNAc)₃의 증가현상은 (GlcNAc)₁과 (GlcNAc)₂ 간의 당전이 활성에 기인하는 것으로 추정되었으나 향후 chitin 올리고당의 생산계 검토와 함께 본 효소의 명확한 반응성의 규명이 요구되고 있다.

요 약

Bacillus licheniformis KFB-C14가 생산하는 내열성 chitinase를 30~70% ammonium sulfate fractionation,

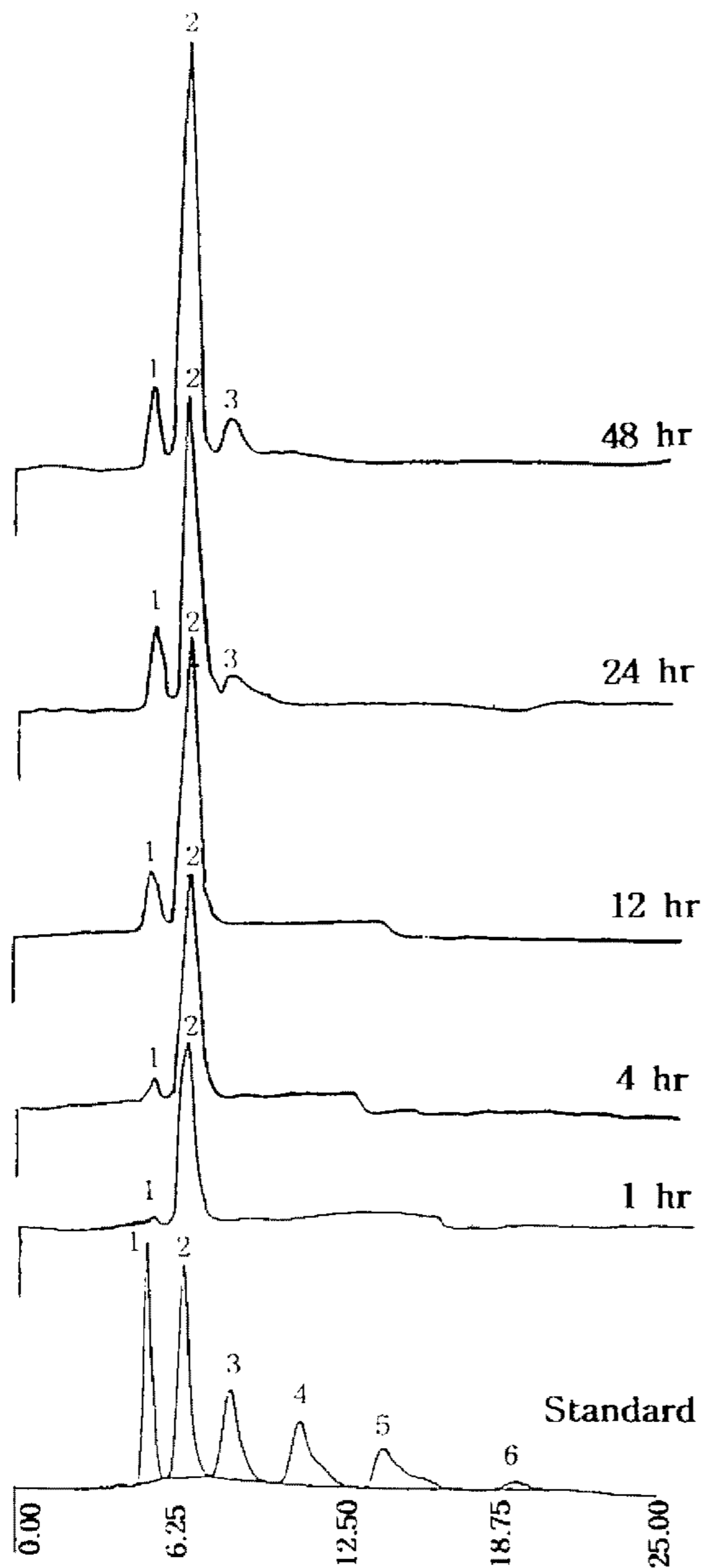


Fig. 5. Changes of chitooligosaccharide profile produced by purified thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* KFB-C14.

Reaction was performed at 55°C, pH 6.0 with 5% colloidal chitin and purified chitinase of 4.0 unit for 48 hr. Standard solution was composed of 1, N-acetyl-D-glucosamine; 2, chitobiose; 3, chitotriose; 4, chitotetraose; 5, chitopentaose and 6, chitohexaose.

DEAE-Toyopearl 650M, Butyl-Toyopearl 650M, TSK-Gel Toyopearl HW-55F에 의해 정제도 66배, 수율 21%로 전기영동적으로 균일하게 정제하였다. 정제 단백질은 gel permeation chromatography에 의해 86,000±2,000의 분자량을 나타내었으며, SDS 전기영동에 의해 밝혀진 본 효소의 subunit 구조는 monomer였다. 효소 단백질의 안정성을 검토한 결과 80°C에서 30분 열처리에 의해 56%, 37°C에서 20분간 40% ethanol과 ethyl acetate, 단백질 변성제 등의 처리시에도 50% 이상의

잔존활성을 나타냄으로써 공업적으로 유용성이 높은 안정한 단백질로 판명되었다. 효소반응의 최적 pH와 온도는 pH 6.0과 60°C이었고 Mn^{2+} 이온에 의해 효소활성이 저해되었으나 EDTA, N-ethylmaleimide, p-chloromercuribenzoate 등에 의한 활성감소는 관찰되지 않음으로써 금속효소 또는 thiol계 효소에 속하지 않음을 알 수 있었다. 본 효소는 colloidal chitin, 시판용 chitin에는 반응성이 높았으나 exo형 chitinase의 대표적인 기질인 p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-glucopyranoside, N,N'-diacetylchitobiose에는 전혀 반응성을 보이지 않는 전형적인 endo형의 chitinase였다. 본 효소는 colloidal chitin으로부터 주로 (GlcNAc)₂를, 반응시간 경과에 따라 (GlcNAc)₁과 (GlcNAc)₃을 생성하는 반응성을 보였다.

감사의 말

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 연구비 지원(과제번호 94-K3-04, 07-01-06-3)에 의해 수행된 결과입니다.

참고문헌

- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* **38**: 85.
- 坂井和男. 1987. 키틴·키토산オリゴ糖の開発と現状. 키틴·키토산의開發と應用. Pp. 111-134. 工業技術會.
- Rupley, J.A. 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecularweight substrates obtained by controlled fragmentation of chitin. *J. Chem. Soc.* 2218-2227.
- Hirono, S., S. Tsuneyasu and Y. Konodo. 1981. Heterogeneous distribution of amino group in partially N-acetylated derivatives of chitosan. *Agri. Biol. Chem.* **45**: 1335-1339.
- 키틴, 키토산 研究會編. 1992. 키틴, 키토산의應用. Pp. 80-88. 技報堂出版, 東京.
- Usui, T., K. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai and Y. Ishido. 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **923**: 302-309.
- Takaynagi, T., K. Ajisaka, Y. Takiguchi and K. Shimahara. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochim. Biophys. Acta.* **1078**: 404-410.
- 唯水泰市, 林 洋一. 1987. *Trichoderma reesei*의生産する 키틴나-제의分離とその轉移作用. 農化大會 講演要旨集. 651.
- 윤호근, 신동훈, 홍범식, 조홍연. 1996. 내열성 Chitinase 생산균주의 분리 및 효소생산 특성. *산업미생물학회지* **24**: 560-566.
- Hsu, S.C. and L. Lockwood. 1975. Powdered chitin Agar as a selective medium for enumeration of *Actinomyces* in water soil. *Appl. Microbiol.* **29**: 422-426.

11. Miller, L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-431.
12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Fan and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-271.
13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
14. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II. Method and application of human serum protein. *Ann. New. York. Acad. Sci.* **121**: 404-410.
15. Ueda, M. and M. Arai. 1992. Purification and some properties of chitinase from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 460-464.
16. Christopher, S.J. and D.J. Kosman. 1980. Purification, properties, kinetics, and mechanism of β -N-acetylglucosaminidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* **255**: 11861-11869.
17. Saburo, H., Y. Yochitaka, F. Yoko, M. Tomohiro and I. Tokuji. 1989. Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* **105**: 484-489.
18. Mario, P.R. and L.R. Everardo. 1989. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 211-218.
19. Yabuki, M. and K. Mizushina. 1986. Purification and characterization of chitinases and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* A-52. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 25-33.
20. Othaka, A., M. Mitsutomi and Y. Uchida. 1979. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. *J. Ferment. Technol.* **57**: 169-177.
21. Rowena, L.R. and E. Cabib. 1982. *Serratia marcescens* chitinase: One-step purification use for the determination of chitin. *Anal. Biochem.* **127**: 402-412.
22. David, J.A., K. Dickinson, V. Keer and C.A. Hitchcock. 1989. Chitinase activity from *Candida albicans* and its inhibition by allosamidin. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 1417-1421.
23. Chen, A.C., R.T. Mayer and J.R. Deloach. 1982. Purification and characterization of chitinase from the stable fly, stomoxys-carcitrans. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 314-321.
24. Jeong, E.T. and Y.H. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitooligosaccharides production, purification of chitinase and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 187-196.

(Received 4 September 1996)