

Serratia marcescens JM에 의한 Chitinase의 정제와 특성

李相煥 · 俞養卿

세종대학교 자연과학대학 화학과
(1995. 10. 29 접수)

Purification and Some Properties of Chitinase from *Serratia marcescens* JM

Sang-Hwan Lee and Euy-Kyung Yu

Department of Chemistry, Sejong University, Seoul 133-747, Korea

(Received October 29, 1995)

요 약. Chitinase를 생성하는 세균인 *Serratia marcescens* JM을 해안 갯벌 시료로부터 분리하여, ammonium sulfate precipitation, affinity adsorption, hydroxylapatite와 Sephadex G-200 column chromatography를 통하여 정제하였다. 정제된 chitinase는 7.1% 회수율과 42.2의 정제도를 나타내었으며, 전기영동시 단일밴드를 얻을 수 있었고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량은 59,000으로 나타났다. 정제된 chitinase의 K_m 과 V_{max} 는 5.17 mg/mL와 39.8 unit/mL로 나타났다. Chitinase의 최적활성 pH와 온도는 7과 50 °C였고 최적안정 pH는 7.0이며 50 °C 이하에서는 안정하였다. Cu^{2+} , Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 는 효소활성을 증가시켰으나 Hg^{2+} 와 I_2 는 효소활성을 억제시켰다. 또한 cysteine은 효소활성을 증가시키나 EDTA, MIA, PCMB 및 SDS는 효소활성을 억제하였다. 해수 음이온 중 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ 는 효소활성을 약간 증가시켰으나 Na^+ 이온은 1 mM 이상농도에서 활성이 억제 되었다. 본 논문에서 정제된 chitinase는 여러가지 특이점이 있는 *Serratia* 효소였다.

ABSTRACT. A chitinase-producing bacterium, *Serratia marcescens* JM, was isolated from a seashore muds. A chitinase was purified by ammonium sulfate precipitation, affinity adsorption, hydroxylapatite and sephadex G-200 column chromatography. The chitinase obtained from *Serratia marcescens* JM was purified 42.2 folds with the overall yield of 7.1%. The purified chitinase showed a single band on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the enzyme was 59,000 and the apparent kinetic parameters K_m and V_{max} for the purified chitinase were 5.17 mg/mL and 39.8 unit/mL, respectively. The optimum pH and temperature of the purified chitinase were 7.0 and 50 °C, respectively and the purified enzyme was stable on pH 7.0 up to 50 °C. The enzyme were activated by Cu^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} and inhibited by Hg^{2+} respectively. In addition, Cysteine increased the chitinase activity and EDTA, MIA, PCMB and SDS inhibited enzyme activities. Major cations, Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ and Na^+ present in seawater slightly stimulated the chitinase activity.

서 론

Chitin은 지구상에 풍부하게 존재하는 biomass로서 해양 무척추 동물, 곤충, 곰팡이 등에 의해서 매년 1×10^9 톤 정도가 생합성되고 있으며 절족류 등 하등동물의 껍질에 20~50%, 세포벽에 45%까지 존재하고 있으나 계와 새우 껍질만이 산업적으로 이용되고 있다.^{1,2} Chitin은 β -D-glucose의 C-2 hyd-

roxy기가 acetyl amino기로 치환된 N-acetyl-D-glucosamine이 β -1,4 결합에 의해 구성된 화합물이며 분자량이 100만 이상되는 천연 고분자 물질이다.³ 자연계에는 3종류의 chitin이 있으며 이중 α -chitin은 자연계에서 가장 풍부하게 존재하고, α -chitin 보다 견고성이 떨어지나 물분자의 침투가 용이하며 같은 방향으로 일정하게 배열되어 있는 β -chitin, γ -

chitin은 3개의 chitin이 가운데 chitin를 중심으로 양쪽에 위치하며 chitin이 반대 방향으로 나열되어 있는 것이다. 대부분 자연계에 존재하는 α -chitin은 cellulose와 같은 결정성을 나타내는 구조를 갖고 있어 매우 안정하며 물에도 거의 팽윤되지 않기 때문에 가공이 어려워 chitin 자체보다는 chitin 분해 미생물인 chitinase가 여러 방면에 다양한 용도로 사용되고 있다.⁴

Chitin이 효소에 의해 분해되어 최종 생성물인 *N*-acetyl-D-glucosamine으로 되는 과정은 chitinase와 chitobiase의 공동 작용에 의해 이루어진다고 알려져 있으며, 이 효소들은 동물, 식물 및 미생물 등에 널리 분포되어 있는 것으로 알려지고 있다.^{3,6} Chitin의 분리 방법에는 여러 가지 방법이 있으나, 산업적인 대량 생산 공정에서는 산과 알칼리로 chitin를 분리하는 방법이 가장 경제적인 것으로 알려져 있다.⁷ 현재 세균에서 얻고 있는 chitinase를 산업적으로 이용하기 위해서는 먼저 chitinase의 생산비용을 낮추어야 하며, 균주 탐색과 균주에 대한 유전자 조작에 의한 생산성 향상 등의 연구를 통한 효율적인 전처리 과정을 개발하여야 한다.⁸⁻¹⁰

이와 같이 chitin은 산업적으로 많은 분야에 이용될 수 있는 것으로 기대되고 있으나, 동물의 종류 등 재료의 출처나 추출 방법에 따라 그 성질에 차이를 보이기 때문에 이에 관한 많은 연구가 있어 왔다. 따라서 chitinase를 생산하는 미생물을 이용하여 chitinase 생산에 관련한 연구를 수행하기 위해서는 산업적으로 다양한 응용성과 chitinase 생산 비용을 낮추는 공정과 chitinase 생성에 영향을 미치는 미생물의 여러 가지 생육특성과 chitinase 생성에 관계되는 유전자를 조사한 후 유전자 조작을 통하여 발현한 이들 미생물을 이용하여 chitinase 생산을 대량으로 유도하여 chitinase activity에 관한 기초 연구 자료로 활용하여 chitinase를 산업적으로 응용하려는 연구를 수행하고자 한다.¹¹⁻¹³ 따라서 본 연구에서는 미생물로부터 강력한 chitin 분해 효소를 생산하기 위해 해안 갯벌 토양에서 분리하여 동정한 chitinase 생성 균주로부터 chitinase를 분리, 정제한 뒤 효소의 물리 화학적 특성을 검토하여 효소활성에 미치는 여러가지 영향을 조사하고자 한다. 또한 분리 정제된 효소의 금속 이온 및 reagents에 관한 영향과

해수의 주요 염기인 CaCl_2 , MgCl_2 , KCl , NaCl 등의 농도에 따른 정제 효소활성의 생화학적인 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료. Chitinase 생산에 사용한 시약으로 purified powder from crab shell과 *N*-acetyl-D-glucosamine은 Sigma사 제품을 사용하였다. 이 외에 사용한 모든 시약은 Junsei사와 Difco사의 일급 및 특급 시약을 사용하였다.

균주 배양. Chitinase 생성 균주의 분리와 배양에 사용한 분리용 배지의 조성은 중류수 1L에 정제 chitin(purified powder chitin from crab shell, Sigma) 1.2 g, yeast extract 0.5 g, trytone 1.0 g, NaCl 1.0 g를 녹였으며, pH는 8.0으로 조절하였다. 한천 배지는 분리용 배지에 Bacto agar(Difco)를 1.5%(w/v) 농도로 첨가하여 사용하였다.^{14,15} 분리 균주의 보관을 위한 배지는 LB 배지를 사용하였다. LB 배지의 조성은 중류수 1L에 yeast extract 5.0 g, trytone 10 g, NaCl 10 g를 녹여 사용하였다. 균의 증식에 따른 여러 가지 균의 성장은 30°C, 150 rpm에서 진탕 배양하면서 각각의 배양액을 취하여 분광 광도계(Hewlett packard, HP 8452 Å UV)를 사용하여 배양액의 흡광도로 나타내었다.

Colloidal chitin의 제조. Chitin은 수소 결합에 의해 단단한 구조를 가지고 있기 때문에 산이나 다른 효소의 작용에 의해 쉽게 분해되지 않는다. 그러므로 chitin 입자가 *Serratia* 등의 미생물에 이용되기 위해서는 colloidal chitin를 제조하여 탄소원으로 이용하는 것이 보다 효과적이다. 그러므로 colloidal chitin를 제조하기 위해서는 먼저 crude chitin 100 g를 HCl 2L에 가하여 4°C에서 48시간 교반하여 진공 펌프를 이용하여 glass wool filter에 여과하였다. 이때 여액은 4°C 찬물에 교반하여 백색의 colloidal chitin이 생성되면 원심분리한 후 5 N-NaOH로 찬물로 중화하여 pH를 7로 조절하여 증류수로 수회 세척하고 난 후 원심 분리하여 얻어진 침전물을 40°C에서 24시간 건조 후 colloidal chitin으로 사용하였다.^{16,17}

Chitinase 생성 측정. 점종균주를 colloidal chi-

tin이 포함된 배지에 접종한 후 반응시간의 경과에 따른 chitinase 생성을 조사하였다. 배양액 16 mL를 3,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 colloidal chitin을 제거하고 원심분리한 후 얻은 상등액 1.5 mL를 15,000 rpm으로 15분간 다시 원심분리하여 얻어진 상등액을 chitinase 생성에 이용하였고, harvesting된 균체는 Lowry 방법에 따른 단백질 정량에 사용하였다.¹⁸ Chitinase 생성은 Miller 방법을 변형하여 사용하였다.^{19,20} 즉 상등액 300 μ L에 0.5% phosphoric acid가 포함된 colloidal chitin이 500 μ L와 DNS(dinitrosalicylic acid) 용액 750 μ L를 30 °C에서 1시간 진탕배양한 후 100 °C 수조에서 10분간 가열하고 이 반응액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 550 nm 흡광도에서 상등액의 환원당을 DNS 방법으로 정량하여 chitinase 생성은 *N*-acetyl-D-glucosamine (NAG)에 의해 작성한 표준곡선과 비교하여 조사하였다. Sodium sulfite는 산화를 방지하기 위하여 chitinase 생성 측정 직전에 첨가하여 사용하였고, *N*-acetyl-D-glucosamine의 농도가 1 mg/mL 이상 일 경우에는 표준곡선이 직선에서 벗어나므로 조효소용액을 첨가하여 환원당을 정량하였다.

균체량 측정. 균체량은 배양액 1.6 mL를 취하여 3,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 colloidal chitin을 제거하였다. 여기서 얻은 상등액을 다시 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액은 chitinase 생성에 관련된 연구에 사용하였고, 아래에 harvesting된 균체는 0.5 N-NaOH 0.5 mL를 가하고 100 °C water bath에서 10분간 유지하면서 세포를 분해시켰다. 여기서 0.5 N-NaOH 0.5 mL를 가하여 중화한 후 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리한 후 상등액의 단백질량을 bovine serum albumin(BSA)을 표준시료로 사용하여 Lowry 방법으로 측정하였다.¹⁸ Column chromatography에 의하여 순화된 단백질 정량은 UV spectrophotometer를 사용하여 280 nm 흡광도에서 측정하였다.²¹

효소의 분리 및 정제. *Serratia marcescens* JM이 생성하는 chitinase를 정제하기 위하여 균주를 30 °C에서 24시간 배양한 후 균체를 원심분리하여 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 2회 세척한 뒤 5 mM MgCl₂를 함유한 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 현탁시켜 60 μ m에서 5분간 초음파 파쇄시켰

다. 파쇄된 균체 현탁액을 15,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거하고 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액의 chitinase를 침전시키기 위하여 ammonium sulfate를 첨가하여 55~70 % 사이의 포화농도에서 chitinase를 분획하였다. Ammonium sulfate 침전에 의해 얻은 효소용액을 chitinase unit당 10~100 μ g(dry wet.)이 되도록 colloidal chitin을 첨가하여 4 °C에서 2시간 동안 교반시키면서 흡착시켰다. Chitinase가 흡착된 colloidal chitin을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 침전된 colloidal chitin을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 5.6)에 세척한 뒤 30 °C에서 4시간 탈착시켜 chitinase를 회수하였다. Affinity adsorption에 의해 분리된 chitinase는 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 미리 평형시킨 hydroxylapatite column(3.5 \times 20 cm)에 충전하여 chromatography하였다. 이때 비흡착 단백질을 제거시킨 다음 흡착 단백질 부분은 0~0.5 M NaCl로 직선농도 구배법으로 용출시키고 20 mL/hr의 용출속도로 각 분획당 4 mL씩 분획하였다. Hydroxylapatite에서 chitinase 활성이 높은 분획만 모은 효소용액을 sephadex G-200 column(3.6 \times 150 cm)에 충전한 뒤 평형시킨 다음 gel filtration을 수행하였으며 30 mL/hr의 용출속도로 각 분획당 3 mL씩 분획하였다.^{22~24}

SDS-polyacrylamide gel 전기영동. 정제된 chitinase의 분자량은 Laemmli의 방법을 이용하여 결정하였다.²⁵ SDS-PAGE gel은 10% polyacrylamide를 사용하였고, stacking gel에서 100 V, separating gel에서 200 V의 전압으로 3시간 동안 수행한 후 coomassie brilliant blue R-250으로 10분간 염색한 다음 methanol : glacial acetate acid : H₂O를 1 : 1 : 8로 혼합한 용액으로 탈색시켰다.¹⁰ 분자량 측정을 위한 표준단백질은 β -galactosidase(116,000 Da), phospholylase(97,400 Da), bovine serum albumin(68,000 Da), ovalbumin(45,000 Da), carbonic anhydrase(29,000 Da), β -lactoglobulin(18,400 Da), lysozyme(14,300 Da)를 사용하였다.

효소의 기질 친화력. 분리 정제된 chitinase의 기질에 대한 친화력을 측정하기 위하여 정제된 chitinase와 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)을 colloidal chitin에 가하여 기질의 최종 농도가 0.5~50 mg/

mL로 조절한 다음 각각의 농도에 대해 40°C에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하였다.²⁶

결과 및 고찰

Chitinase 효소의 부분 정제. *Serratia marcescens* JM이 생산하는 chitinase는 세포벽 외부로 분비하는 단백질이기 때문에 성장된 배양액으로부터 chitinase를 얻기 위해서는 일반적인 효소분리 방법으로는 효과적으로 정제하기가 어렵기 때문에 Jeuniaux²²는 *Streptomyces*가 생산하는 chitinase의 정제시 affinity adsorption 방법을 이용하여 최초로 chitinase를 효과적으로 정제하였다. 따라서 본 연구에서는 chitinase를 정제하기 위하여 ammonium sulfate 침전, colloidal chitin에 의한 affinity adsorption, hydroxylapatite column chromatography, sephadex G-200 gel filtration를 하여 *Serratia marcescens* JM으로부터 chitinase를 정제하였다. 전체적인 chitinase 효소정제에 대한 과정은 Table 1에 요약하였다. Chitinase를 분리, 정제하기 위하여 *Serratia marcescens* JM을 colloidal chitin이 포함된 배지에 배양하여 원심분리한 균체를 초음파 파쇄시킨 후 상등액을 55~77% 농도로 ammonium sulfate 침전시킨 결과 약 3.2배 정제되었다. Ammonium sulfate 침전에 의해 얻은 효소액을 colloidal chitin에 첨가하여 affinity adsorption한 결과 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 40~100 µg 사이의 colloidal chitin 농도에서 약 93% 정도 chitinase 흡착율을 나타내었다. 이는 Jeuniaux²²나 Roberts와 Cabib¹⁶가 보고한 colloidal chitin를 이용한 chitinase의 affinity adsorption과 유사함을 보였다. 또한 chitinase가 흡착된 colloidal chitin를 원심분리한 후 chitinase를 회수하여 탈착시킨 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 약 73% chitinase를 회

수하였다. 이는 Yabuki와 Mizushima¹¹ 등의 chitinase 탈착을 보고와 유사하였다. Affinity adsorption에 의해 분리된 chitinase를 hydroxylapatite column으로 chromatography하고 0~0.5 M NaCl로 직선농도 구배한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 나타낸 바와 같이 chitinase는 분획 #60~#84 사이에서 정제되었다. 여기서 얻어진 chitinase 분획을 sephadex G-200 column에 주입한 결과 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 분획 #44~#72 사이에서 순수한 chitinase가 최종 분리되었고 chitinase 활성 부위와 단백질 부분이 일치하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 정제된 chitinase에서 나타난 정제도는 약 42.2이었으며 회수율은 약 7.1%로 나타났다. Roberts와 Cabib¹⁶는 *Streptomyces*의 chitinase의 경우 약 5.9배의 정제도와 약 27.4% 회수율을 얻었고, Jeuniaux²²는 약 9.3배의 정제도와 30%의 회수율을 얻었다는 보고와 유사한 결과였다.

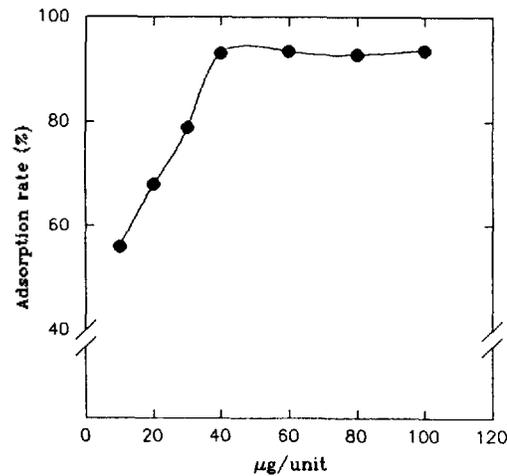


Fig. 1. Effects of colloidal chitin concentration on the adsorption rate of chitinase.

Table 1. Summary of purification procedure of chitinase

Purification step	Total volume (mL)	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	120	530.3	956.1	1.80	1.0	100.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	53	96.2	551.7	5.73	3.18	57.7
Affinity adsorption	29	23.8	251.6	10.6	5.89	26.3
Hydroxylapatite	18	2.4	89.5	37.29	20.7	9.36
Sephadex G-200	13	0.9	68.3	75.89	42.16	7.14

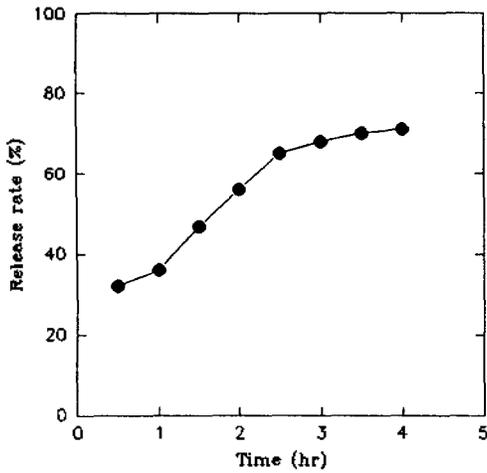


Fig. 2. Release rate after affinity adsorption.

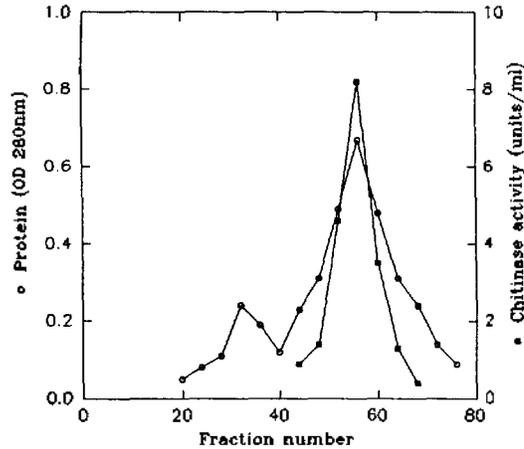


Fig. 4. Column chromatography of chitinase on Sephadex G-200.

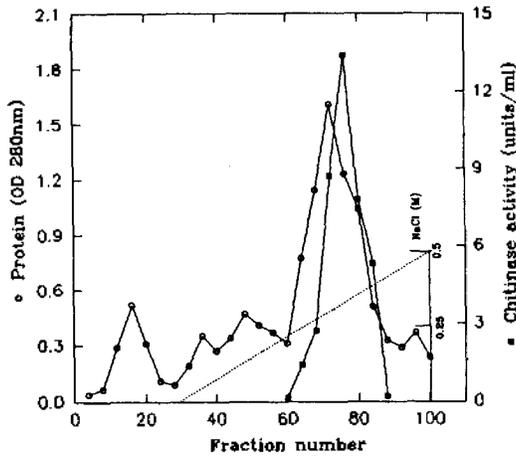


Fig. 3. Column chromatography of chitinase on hydroxylapatite.

정제된 chitinase의 분자량. Sephadex G-200에 의해 최종적으로 정제된 chitinase를 SDS-PAGE를 수행하여 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 단일 밴드를 확인할 수 있었으며 표준 단백질 시료와 비교한 결과 약 59,000 dalton으로 추정할 수 있었다. 이 결과를 표준시료 용출시간과 비교한 결과 Fig. 6과 같이 이동거리와 Log 사이에 직선관계를 얻을 수 있어 이의 결과로부터 본 연구에서 사용한 *Serratia marcescens* JM가 생성하는 chitinase는 분자량이 약 59,000 dalton으로 확인하였다. 정제된 chitinase의 분자량에 관한 지금까지의 보고에 의하면 *Serratia*의 경우에는 20,000-120,000 dalton 사이이고 *Streptomyces*는 약



Fig. 5. SDS-PAGE of chitinase and molecular markers. Lane A: purified chitinase. Lane B: molecular size markers.

30,000 dalton의 분자량임을 보고하고 있다.^{8,17,21} 따라서 본 연구에서 분리한 chitinase의 분자량은 *Serratia*의 분자량과 유사함을 보여주었다.

효소의 기질 친화력. 정제된 chitinase와 colloidal chitin을 반응시켜 효소활성을 측정한 결과 colloidal chitin 농도가 정제 효소의 반응속도에 미치는 영향을 Lineweaver-Burk²⁶하여 Fig. 7에 나타내었다.

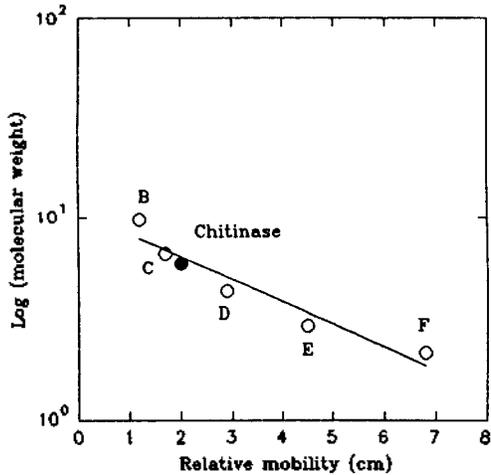


Fig. 6. Determination of the molecular weight of chitinase by SDS-PAGE. B: 97 kDa, C: 68 kDa, D: 45 kDa, E: 29 kDa, F: 18 kDa.

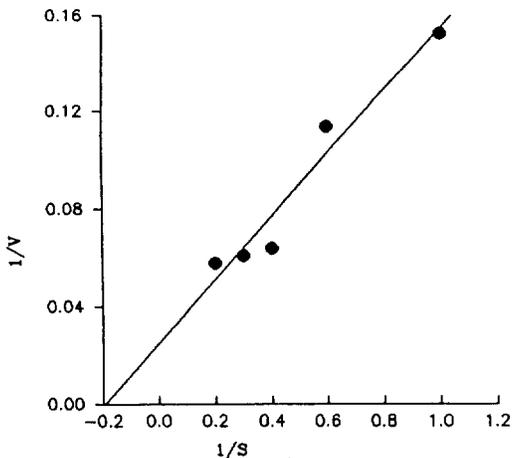


Fig. 7. Lineweaver-Burk plots for the determination of K_m and V_{max} value of chitinase.

Fig. 7에 나타난 결과로부터 K_m 값과 V_{max} 는 각각 5.17 mg/mL과 39.8 unit/mL이었다. 위의 결과는 *Aeromonas hydrophila*에 의한 colloidal chitin에 대한 K_m 값이 2.8 mg/mL이라는 Yabuki와 Mizushima¹¹의 보고와 비교할 때 *Serratia marcescens* JM이 생산하는 chitinase가 친화력이 낮음을 알 수 있었다.

Chitinase 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향. Chitinase에 대한 효소활성이 최적 pH에 미치는 영향을 알아보기 위해 50 mM Tris-HCl buffer(pH 3~8)와 50 mM Tris-NaOH buffer(pH 9~10)를 사용

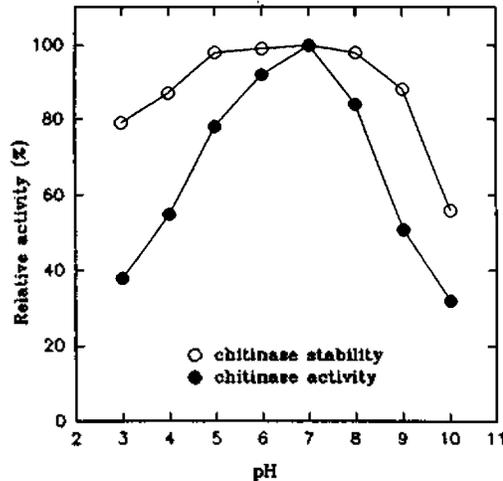


Fig. 8. Effects of pH on the activity and stability of chitinase.

하여 pH를 3~10 사이로 반응액을 만든 다음 효소액을 가해 40 °C에서 2시간 동안 반응시킨 후 chitinase 활성을 측정하여 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8에 나타낸 바와 같이 chitinase 활성은 pH가 증가함에 효소활성이 증가하다가 pH 7 이후는 활성이 급격히 감소하였고 최대 효소활성은 pH 7.0에서 나타났다. Monreal와 Reese¹⁴ 및 Roberts와 Cabib¹⁶는 *Serratia marcescens*의 chitinase의 최대 활성 pH가 6.4라고 보고했고 Ohtakara¹⁵ 등은 *Vibrio*가 생산하는 chitinase의 최대 활성 pH를 6~8 사이라고 보고했으며, Yabuki와 Mizushima¹¹는 *Aeromonas hydrophila*의 최대 활성 pH를 5.2, 그리고 Jeuniaux²²는 *Streptomyces*가 생산하는 chitinase 최대 활성 pH를 5.2~6.5 사이라고 보고하였다. 이러한 연구 결과들을 비교해 볼 때 *Serratia marcescens* JM이 생산하는 chitinase는 같은 속인 *Serratia*의 최대 활성 pH와 거의 유사한 pH를 나타내고 있다. 또한 *Serratia marcescens* JM의 chitinase의 pH 안정성을 검토하기 위해 pH를 3~10 사이로 제조한 완충액에 효소용액을 가해 40 °C에서 2시간 동안 방치한 다음 효소의 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 9에서와 같이 pH 5~8 사이에서 최대 안정성을 보여주었다. 이러한 결과는 Lundblad¹²가 bovine serum에 존재하는 chitinase의 안정성이 pH 3.0~6.5라는 보고와 유사하였다.

Chitinase 활성 및 열안정성에 미치는 온도의 영향. Chitinase의 최적 작용 온도를 알아보기 위해

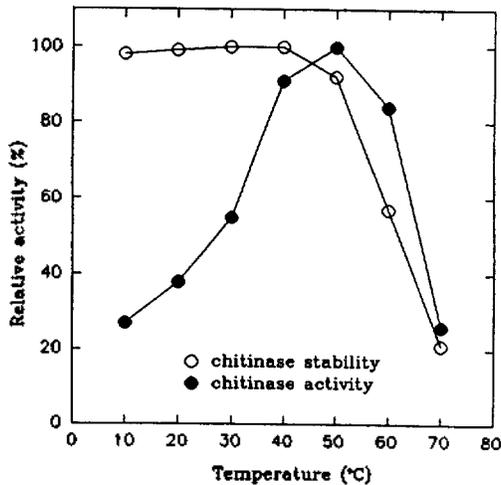


Fig. 9. Effects of temperature on the activity and stability of chitinase.

10~70°C 사이에서 각 온도에서 효소활성을 측정하여 본 결과 Fig. 9에서와 같이 온도가 증가함에 따라 효소활성이 증가하다가 50°C에서 가장 높은 활성을 보여주었으며 60°C에서 83%의 활성을 보이다가 그 이상의 온도에서는 급격히 감소되었다. 한편 chitinase의 열 안정성을 검토하기 위해 10~70°C 사이의 온도에서 각각 2시간 동안 열처리를 한 다음 잔존활성을 측정한 결과 40°C까지는 안정성을 유지하였으나 60°C 이상에서는 효소활성이 거의 실패되는 것으로 나타났다. 이는 Monreal와 Reese¹⁴가 보고한 *Serratia marcescens*의 효소활성 최적온도가 50°C와 일치하고 Yabuki와 Mizushima¹¹가 보고한 *Aeromonas hydrophila*의 최대온도 55°C와 유사하였다. 온도에 대한 효소활성을 Arrhenius plot하여 활성화 에너지를 측정한 결과 Fig. 10에 나타낸 바와 같이 chitinase 활성화에너지는 41.3 kJ/mol이었다.²³

각종 금속 이온에 대한 chitinase의 영향. Chitinase 효소에 대한 여러가지 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속 이온을 5mM이 되게 정제된 효소액에 첨가하여 상온에서 2시간 동안 방치한 다음 정제 효소에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 2에 나타내었다. *Serratia marcescens* JM이 생산하는 Chitinase는 Cu²⁺는 8%, Ca²⁺는 13%, Mg²⁺는 26% 정도의 근소한 활성 증대를 보였으며, Ag²⁺는 15%, Co²⁺는 13%, Fe²⁺는 10%, Zn²⁺은 9%의 저해효과를

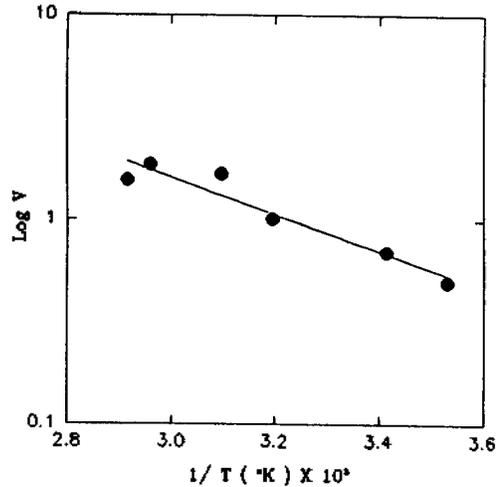


Fig. 10. Arrhenius plot of the effect of temperature on chitinase.

Table 2. Effect of various metal ions on the chitinase activity

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
Ag ²⁺	5	85
Co ²⁺	5	82
Cu ²⁺	5	108
Fe ²⁺	5	90
Hg ²⁺	5	33
Zn ²⁺	5	91
I ₂	5	0
Ca ²⁺	5	113
Mg ²⁺	5	126

나타내었고, Hg²⁺는 63% 정도 큰 저해현상을 보였고, I₂는 100%의 완전저해를 나타내었다. Hg²⁺와 Ag²⁺는 단백질의 sulfhydryl(SH)기에 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 또한 단백질 자체를 Hg²⁺로 cross link시킴으로서 불활성화된 dimer로 변형시키는 것으로도 보고되고 있다.¹³

Thiol 화합물인 cysteine의 chitinase의 영향. Chitinase 효소활성 중심에 thiol 화합물인 cysteine의 농도를 증가하여 chitinase 효소활성에 미치는 영향을 검토한 결과 cysteine 농도가 5mM 농도에서 효소의 활성이 3% 증가하였다. 이는 thiol 화합물인 cysteine이 chitinase의 촉매제로 작용함을

보여주고 있고 최대활성을 위해서는 thiol 화합물이 요구된다는 보고와 일치하고 있다.¹⁵

Chitinase의 reagents의 영향. 효소활성에 미치는 reagents의 영향을 검토하기 위하여 chitinase 효소액에 각각의 저해제를 최종 농도가 5 mM되게 첨가하여 효소의 활성을 측정하여 Table 3에 나타내었다. Table 3에 나타낸 바와 같이 정제된 chitinase는 EDTA, MIA, PCMB에는 효소활성을 저해하는 작용을 하였다. 또한 단백질 변성제인 SDS도 chitinase에 영향을 미치면서 활성저해 작용을 나타내었다.^{13,15}

Chitinase 활성에 미치는 해수 양이온 영향. 50

Table 3. Effect of some reagents on the chitinase activity

Reagent	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None		100
PCMB (<i>p</i> -chloromercuribenzoate)	5	21
MIA (monoiodoacetic acid)	5	87
SDS (sodium dodecylsulphate)	5	97
EDTA (ethylenediaminetetraacetate)	5	91
Cystein	5	103

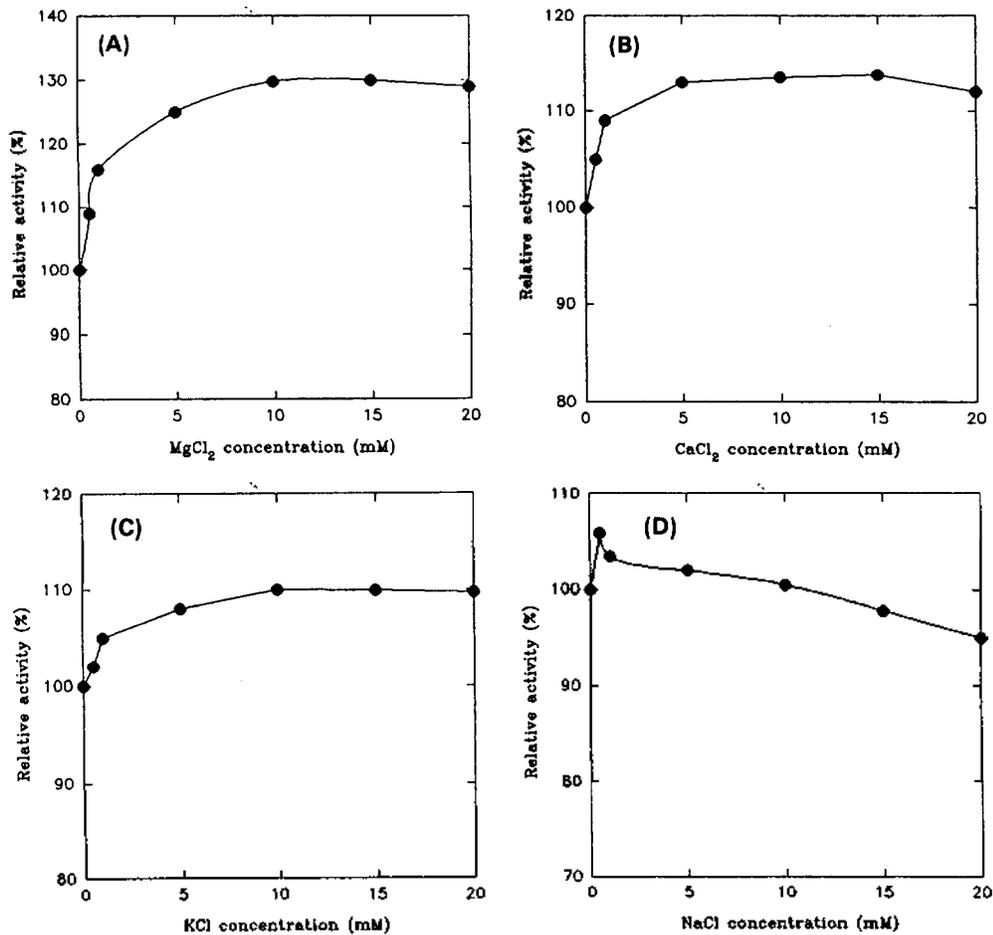


Fig. 11. (A) Effect of MgCl₂ concentration in seawater from the chitinase activity. (B) Effect of CaCl₂ concentration in seawater from the chitinase activity. (C) Effect of KCl concentration in seawater from the chitinase activity. (D) Effect of NaCl concentration in seawater from the chitinase activity.

mM Tris-HCl buffer(7.2)에 정제된 chitinase와 해수 양이온을 혼합하여 chitinase 활성에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 11의 (A), (B), (C) 및 (D)에 나타내었다. 정제된 chitinase에 해수 양이온을 첨가하지 않았을 때를 기준으로 하여 상대적인 chitinase 활성을 측정하였다. 해수 양이온중 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ 이 chitinase 활성에 영향을 미쳤으며, 그 중 Mg^{2+} 이온은 10~20 mM 농도 사이에는 1.3배, Ca^{2+} 이온은 5~20 mM 농도 사이 1.12배, K^+ 이온은 10~20 mM 농도 사이에 1.1배로 chitinase 활성을 증가하였으나, Na^+ 이온은 1 mM에서 1.05배로 활성을 증가하다가 이후 농도가 증가함에 따라 활성을 억제하는 작용을 하였다. 따라서 본 연구에서 분리 정제한 chitinase는 해수중 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ 양이온에 효소 활성의 영향을 받았다. 이의 결과는 Wright와 Sumucker²⁰는 해수의 굴에서 정제한 chitinase가 해수 양이온중 Mg^{2+} 에는 효소 활성의 강한 억제제로 작용하였으나, Na^+ 에는 약한 억제제로 작용하였고, Ca^{2+} 에는 효소 활성을 증가시킨다는 보고와 차이가 있었다. 또한 Qua²⁴ 등은 해양 *Pseudomonas* sp.로 부터 분리 정제한 protease는 Mg^{2+} , Co^{2+} , Ca^{+} 이 chitinase 활성에 영향을 미침을 보고하였다. 이들 결과는 본 연구에서 분리 정제한 chitinase가 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ 양이온의 chitinase 활성에 영향을 미치는 것과 유사하였다.

인 용 문 헌

- Muzzarelli, R. A. A. *Chitin*; Pergamon Press: New York, 1977.
- Austin, P. R.; Brine, C. J.; Castle, J. E.; Zikakis, J. P. *Science* **1981**, *212*, 749.
- Zakikas, J. P. *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*; Academic Press: London, 1984.
- Deshpande, M. V. *J. Sci. Indus. Res.* **1986**, *45*, 273.
- Dixon, M.; Webb, E. C. *Enzymes*; Longman: New York, 1979.
- Wortman, A. T.; Somerville, C. C.; Colwell, R. R. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *52*, 142.
- Davies, D. H.; Hayes, E. R. *Meth. Enzymol.* **1988**, *161*, 442.
- Schlumbaum, A.; Mauch, F.; Vogeh, U.; Boller, T. *Nature* **1986**, *324*, 365.
- Bromke, B. J.; Hammel, J. M. *Can. J. Microbiol.* **1979**, *25*, 47.
- Joshi, S.; Kozlowski, M.; Richens, S.; Comberbach, D. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 289.
- Yabuki, M.; Mizushima, K. *J. Gen. App. Microbiol.* **1986**, *32*, 23.
- Lundblad, G. *J. Biochem.* **1979**, *100*, 455.
- John, P. C. C.; Syrett, P. J. *Biochem. J.* **1967**, *105*, 409.
- Monreal, J.; Reese, E. T. *Can. J. Microbiol.* **1968**, *15*, 689.
- Ohtakara, A.; Mitsutomi, M.; Uchida, Y. *J. Ferment. Technol.* **1979**, *57*, 169.
- Roberts, R. L.; Cabib, E. *Anal. Biochem.* **1982**, *127*, 402.
- McCormack, J.; Thomas, J. J.; Maria, G. T.; Michael, P. C. *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 677.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N.; Farr, A. L.; Randall, R. J. *J. Bio. Chem.* **1951**, *193*, 265.
- Miller, G. L. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426.
- Wright, D. A.; Smucker, R. A. *Crassostrea Virginia. Comp. Biochem. Physiol. A.* **1986**, *84*, 495.
- Jones, J. D. G.; Grady, K. L.; Suslow, T. V.; Bedbrook, J. R. *EMBO. J.* **1986**, *5*, 467.
- Jeuniaux, C. *Compr. Biochem.* **1971**, *26C*, 595.
- Hendy, L.; Gallagher, J.; Winters, A.; Hackett, T. J.; Michale, L.; Michale, A. P. *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 673.
- Qua, D. V.; Shimidu, U.; Taga, N. *Can. J. Microbiol.* **1981**, *27*, 505.
- Laemmli, U. K. *Nature* **1970**, *227*, 680.
- Lineweaver, H.; Burk, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 658.