

특집 : 효소의 산업적 이용기술(II)

키틴과 키토산으로부터 D-Glucosamine과 N-Acetyl-β-D-Glucosamine 생산을 위한 효소제의 개발

최연진 · 신용철

경상대학교 생명과학부 및 유전공학연구소

1. 기술개발 배경

개, 새우, 크릴 등 갑각류 껍질로부터 생산되는 키틴과 키틴의 탈아세틸화로 얻어지는 키토산은 중요한 천연자원으로서 그 응용성이 점차 증가되고 있다. 그 중에서 키틴을 12N HCl, 80°C 조건으로 완전가수분해하여 생산되는 D-glucosamine (DGA)은 퇴행성 관절염(osteoarthritis)에 효과가 뛰어난 것으로 밝혀져 치료 및 예방용 약품으로 개발되었으며, 또한 항염증, 심장보호, 간장보호, 물질동화촉진 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(1, 2, 3). 오늘날 DGA는 염산염이나 황산염 형태로 약품 및 건강보조식품의 원료로서 미국, 일본, EU, 한국 등 세계 각국에서 사용되고 있다. 일반적으로 DGA는 키틴을 산가수분해한 후 황산탄으로 정제하고, 여과한 후 최종적으로 진공 건조하여 D-glucosamine · HCl 형태로 생산된다. 이 이외에도 키틴을 산가수분해시킨 후 DGA를 수차례 결정화시켜 얻는 방법도 있고, 1차로 결정화된 DGA를 에탄올과 물(pH 2~3)로 수차례 세척하여 생산하는 방법도 있다. 이러한 산분해방법은 가수분해 동안에 건조중량의 5%에 달하는 불순물이 생성되기 때문에 고품질의 DGA를 얻기 위해서는 철저한 정제공정이 필요하다. 따라서 산분해공정으로 생산되는 DGA의 수율은 40~70%로 낮은 편이다(4). 정제된 DGA · HCl 형태는 일본에서 약 4,500엔/kg으로 거래되고 있다.

최근 DGA 보다 제조방법은 어렵지만 DGA의 아세틸화 형태인 N-acetyl glucosamine(NAG)가 생산되고 있다. 체내로 흡수된 DGA는 glucosamine-6-phosphate를 거쳐 NAG로 전환되어 이용된다. 또한 체내에서 DGA보다 NAG가 훨씬 빨리 접막세포에서 이용되는 것으로 밝혀졌다. NAG는 생체내 결합 조직이나 tendon, cartilage 등의 glycoprotein(mucopolysaccharide)을 만드는 주요성분이다. NAG를 포함하는 glycoprotein은 세포와 세포사이를 연결하는 결합물질로서 조직이나 기관의 완전한 유지에 필수적이다. 특히 NAG는 소화관의 점막을 구성하는 주요성분으로서 소화관 궤양치료를 도움을 주는 것으로 알려졌다(5). 이러한 사실로 볼 때 NAG는 DGA보다 개량된 생물신소재로서 그 효용가치가 높을 것으로 생각된다. NAG는

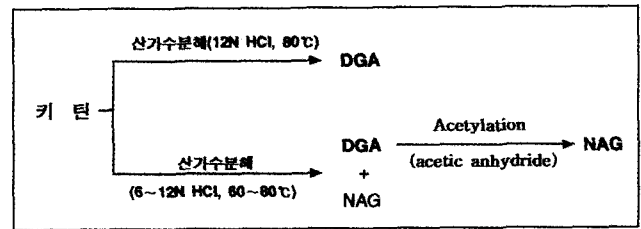


그림 1. 산분해 공정에 의한 D-glucosamine(DGA)과 N-acetyl-β-D-glucosamine (NAG)의 제조.

키틴을 6~12N HCl, 60~80°C 조건으로 가수분해하여 생산하고 있다(그림 1). 이 가수분해 과정에서 키틴이 단당으로 쪼개지고 동시에 탈아세틸화가 일어나 DGA와 NAG가 동시에 생겨난다. 가수분해 조건에 따라서 DGA와 NAG의 상대적인 비율이 달라질 수 있다. 그러나 탈아세틸화를 줄이기 위해서 산의 농도와 온도를 낮추게 되면 키틴으로부터 얻어지는 NAG의 효율이 낮아지는 문제점이 있다. 현재 세계적으로 NAG를 산가수분해 공정으로 제조하는 회사가 한 군데 있으며, 이 회사의 경우 키틴을 산가수분해시킨 다음 DGA를 NAG로부터 분리해낸 후 화학적으로 아세틸화시켜 NAG를 만드는 것으로 알려졌다. NAG의 정확한 원료가격은 알 수 없으나 시중에 유통되는 NAG는 1kg에 약 500달러로서 우리 돈으로 환산하면 약 60만원에 해당된다. DGA가 kg당 5만원 선인 것과 비교할 때 NAG는 12배 이상 비싼 셈이다.

기존의 DGA와 NAG 제조공정은 고농도 산을 사용하는 공정으로서 장치의 부식, 작업의 위험, 불순물 제거를 위한 복잡한 정제공정의 필요, 많은 에너지 소모, 낮은 수율 등의 단점이 있다. 효소를 사용하여 DGA와 NAG를 생산하게 되면 이러한 단점을 극복할 수 있을 것이다(그림 2). 그러나 효소공정이 실제 산업적으로 사용될려면 산분해공정과 비교할 때 가격 경쟁성이 있어야 한다. 이러한 효소공정개발의 핵심은 DGA와 NAG 생산에 적합한 효소원을 개발하는 것과 개발된 효소를 값싸게 만드는 것으로 생각된다. 본 연구자들은 DGA와 NAG를 효소공정으로 생산하기 위한 효소개발 연구를 수행하였으며 그 결과를 소개하고자 한다.

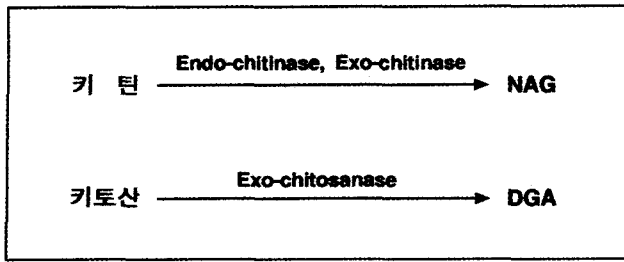


그림 2. 효소공정에 의한 D-glucosamine(DGA)과 N-acetyl-β-D-glucosamine.

2. Exo-chitosanase와 DGA 생산

키토산으로부터 DGA를 생산하는 미생물을 탐색한 결과 GM31이라는 균주를 분리하였다. GM31을 동정한 결과 기존의 발효식품 제조에 사용되는 균주이며 식품용 효소생산균으로 알려진 종이였다. GM31 균주는 세포배양액 중으로 exo-chitosanase(GM31-ECS)를 분리하였으며, 이 효소는 키토산을 분해하여 DGA를 유일한 산물로서 생산하였다. GM31 균주는 키토산 존재하에서만 GM31-ECS 효소를 생산하였으며, 발효 5일째 10~20U/ml의 효소가 생산되었다. 이 GM31-ECS의 분자량은 SDS-PAGE 결과 약 110kDa 이었으며 최적온도, 최적 pH는 각각 50°C, 4~5였다. GM31-ECS는 40°C에서 4일까지 안정하였다. 키토산을 40°C, pH 4.0 조건에서 키토산 g 당 10U의 GM31-ECS로 가수분해하였을 때 반응 3일째 초기 키토산량의 80%에 해당하는 DGA가 생산되었다. 키토산 분해 과정에서 반응시간별로 시료를 채취하여 키토산 분해산물을 HPLC로 분석한 결과 DGA가 유일한 산물로 생산되었다(그림 3). 이러한 결과는 GM31-ECS가 DGA 생산에 적합한 효소이며 DGA의 효소적 생산 가능성을 보여 주었다. 앞으로 효소분해를 촉진시키기 위해서 endo-chitosanase와 병용하는 방법, 키토산중에 약 5%를 차지하는 NAG 잔기부분을 분해하기 위한 N-acetyl-β-D-glucosaminidase를 이용하는 방법, 효소를 재활용하는 방법 등이 모색되어야 할 것이다. 이와 동시에 GM31-ECS의 생산성을 높이기 위한 균주개량과 발효 최적화 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

3. N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase(NagA)와 NAG 생산

키토산으로 NAG를 생산하기 위해서는 endo-chitinase와 N-acetyl-β-D-glucosaminidase가 필요하다. 본 연구자들은 키토산 분해미생물의 탐색을 통해서 기존에 잘 알려진 *Serratia marcescens*, *S. liquefaciens*를 비롯하여 이들보다 endo-chitinase 활성이 강한 *Cellulomonas* sp. GM13 균주를 선발하였다. 분리한 *Serratia* 종에서 endo-chitinase의 효소적 특성과 유전자 생물산업

의 과잉발현에 관한 연구를 이미 완료한 바 있다(6, 7, 8). 이 endo-chitinase는 exo-형으로 키토산을 분해하여 NAG의 dimer[(NAG)₂]를 생산하였다. 이와 같이 세균의 세포배양액에서 발견되는 chitinase는(NAG)₂를 생성하는 endo-chitinase(exo-chitinase로 명명되기도 함)가 대부분이었다. 분리균주 GM13 균주의 endo-chitinase도 키토산으로부터(NAG)₂를 주로 생산하는 효소였다(9, 10). GM13 균주의 endo-chitinase 유전자 클로닝 과정에서 우연히 N-acetyl-β-D-glucosaminidase(NagA) 활성을 가진 유전자를 클로닝할 수 있었다. 이 NagA는 *Cellulomonas* sp. GM13 균주에서 세포밖으로 분비되지 않는 세포내 효소로 판명되었다. 대장균에서 과잉발현된 NagA를 순수분리하여 효소적 특성을 규명하였다. NagA는 54kDa의 분자량을 가지고 있었으며, 최적온도와 최적 pH가 각각 55°C, 6~7이었다. NagA는 40°C에서 2일간 안정하였으며, pH 7~9 범위에서 안정한 특성이 있었다. NagA의 기질특이성을 HPLC를 이용하여 분석한 결과(NAG)₂를 가장 잘 분해하였으며(NAG)₃, (NAG)₄, (NAG)₅, (NAG)₆에 대해서는(NAG)₂에 비해서 70~95% 수준의 활성을 보였다. NagA는 p-nitropheny-N-acetyl-β-D-glucosaminide 뿐만 아니라 p-nitropheny-N-acetyl-β-D-galactosaminide(23% 활성)을 분해하는 특성이 있어 N-acetyl-β-D-glucosaminidase 보다는 기질 특이성이 다소 넓은 N-acetyl-β-D-hexosaminidase로 분류할 수 있었다. Swollen chitin을 *Cellulomonas* sp. GM13 균주의 endo-chitinase(GM13-Chi65)와 NagA를 이용하여 가수분해한 결과 초기 키토산량의 85%를 NAG 형태로 생산 할 수 있었다(그림 3).

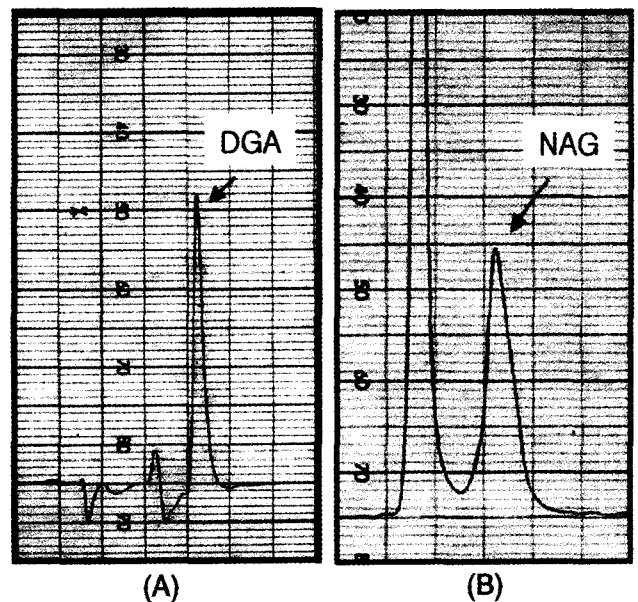


그림 3. 효소공정으로 생산된 D-glucosamine(A) 과 N-acetyl-β-D-glucosamine(B)의 HPLC 분석.

4. 결론과 전망

본 연구에서는 키틴과 키토산으로부터 효소를 사용하여 DGA와 NAG를 생산할 수 있었다. 이러한 효소공정에는 키틴과 키토산을 endo-type과 exo-type으로 적절히 분해할 수 있는 효소가 필요하였다. 분리균주 GM31로부터 생산된 exo-chitosanase는 키토산을 분해하여 DGA를 유일한 반응산물로 생산하였다. 앞으로 키토산 분해시 exo-chitosanase와 함께 endo-chitosanase를 사용하거나, 두 효소를 순차적으로 사용함으로써 DGA를 효과적으로 생산할 수 있을 것으로 생각된다. 공업적으로 생산되는 키토산의 경우 일부(5~10%)의 비탈아세틸화된 잔기를 가지고 있으므로 N-acetyl-β-D-glucosaminidase를 DGA 생산공정에 함께 사용함으로써 키토산의 분해속도와 DGA 수율을 더욱 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 DGA의 산업적 생산을 위해서는 GM31-ECS를 효과적으로 생산하는 방법의 개발이 필수적인 것으로 생각된다.

NAG는 키틴을 endo-chitinase와 N-acetyl-β-D-glucosaminidase를 사용하여 완전가수분해시키므로써 생산할 수 있었다. 이 경우 endo-chitinase로서는 본 연구자들이 개발한 *S. liquefaciens* endo-chitinase(58kDa)와 *Cellulomonas* sp. GM13 균주의 endo-chitinase(65kDa)가 효과적으로 사용될 수 있었다. 키틴을 endo-chitinase로 처리하는 경우 대부분(NAG)₂의 이당류 형태가 생산되었으며, NAG를 생산하기 위해서는 N-acetyl-β-D-glucosaminidase가 필요하였다. NAG 생산에 *Cellulomonas* sp. GM13 균주의 세포내 효소인 NagA가 적합하였다. NAG 생산에 필요한 endo-chitinase와 NagA를 재조합 미생물로부터 대량생산하는 연구가 진행중에 있다. 키틴으로부터 NAG를 경제적으로 생산하기 위해서는 키틴의 효과적인 전처리 방법이 개발되어야 할 것이다. 또한 앞으로 endo-chitinase와 N-acetyl-β-D-glucosaminidase의 효과적인 생산방법의 개발과 더불어 효소를 재사용하는 방법 등을 포함한 분해공정의 최적화가 이루어져야 할 것이다.

키틴은 지구상에서 셀룰로즈 다음으로 풍부한, 재생가능한 천연자원이므로 앞으로 키틴을 화학·생물공업에서 이용하고자 하는 연구가 많아질 것으로 생각된다. 현재 키틴으로부터 산분해공정을 통하여 생산되는 DGA와 NAG는 관절염 및 궤양의 치료와 예방을 목적으로 사용되고 있다. 최근에는 NAG를 중요한 의료용 올리고당의 합성원료로서 사용하는 연구가 보고되었다. 앞으로 재생가능한 자원에서 생산되는 DGA와

NAG는 화학·생물공업의 원료물질로서 다양한 목적으로 사용될 수 있을 것으로 생각된다. DGA와 NAG의 효소적 생산 기술은 조만간 실현될 것이며, 이러한 효소분해공정은 시계적 요구에 따라 자연스럽게 산분해공정을 대체해 나갈 것으로 판단된다.

5. 참고문헌

1. Delafuente J. C. 2000. Glucosamine in the treatment of osteoarthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* **26**: 1-11.
2. Gui X. Q., S. N. Gao, G. Giacobelli, L. Rovati, and I. Setnikar. 1998. Efficacy and safety of glucosamine sulfate versus Ibuprofen in patients with knee osteoarthritis. *Arzneim-Forsch./Drug Res.* **48**: 469-474.
3. Deal, C. L. and R. W. Moskowitz. 1999. Nutraceuticals as therapeutic agents in osteoarthritis. The role of glucosamine, chondroitin sulfate, and collagen hydrolysate. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* **25**: 379-395.
4. Novikov, V. Yu. and A. L. Ivanov. 1997. Synthesis of D(+)-Glucosamine hydrochloride. *Russian Journal of Applied Chemistry.* **70**: 1467-1470.
5. Breborowicz A., M. Kuzlan-Pawlaczyk, K. Tobis, J. Wisniewska, P. Tam, I. French, and G. Wu. 1998. The effect of N-acetylglucosamine as a substrate for in vitro synthesis of glycosaminoglycans by human peritoneal mesothelial cells and fibroblast. *Adv. Perit. Dial.* **14**: 31-35.
6. 장규일. 1992. Molecular cloning and expression of *Serratia marcescens* chitinase gene in *Escherichia coli*. 경상대학교 석사학위 논문.
7. 강송옥. 1994. Purification and characterization of chitinases from *Serratia liquefaciens* GM1403 isolate. 경상대학교 석사학위논문.
8. 하기정. 1996. Molecular cloning and nucleotide sequence of chitinase C59 gene from *Serratia liquefaciens* GM1403. 경상대학교 석사학위논문.
9. 최연진. 1997. Purification and chracterization of an Endo-chitinase from *Arthrobacter* sp. GM13. 경상대학교 석사학위논문.
10. 신용철 등. 1996. Chitinase and chitosanase for the production of oligosaccharides from chitin and chitosan. *Ann. RCNBMA.* **5**: 21-27.