

키틴/키토산 가수분해효소의 분류 및 특성

이 한 승*

신라대학교 의생명과학대학 바이오식품소재학과

Received August 1, 2008 / Accepted November 20, 2008

Classification and Characteristics of Chitin/Chitosan Hydrolases. Han-Seung Lee*. *Department of Bio-Food Materials, College of Medical and Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea* - Chitin and chitosan, which is deacetylated form of chitin, are one of the most abundant biomass on the earth. They showed various biological activities including antimicrobial activity, heavy metal chelating, immune system activation, and have very diverse applications in food, pharmaceutical, medicinal, and environmental industry. There have been reported many chitin/chitosan-hydrolyzing enzymes, their structures and genes from three domains, archaea, bacteria, and eukarya. Carbohydrate hydrolyzing enzymes are classified in CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) database according to their amino acid sequence similarity. Interestingly, chitinases and chitosanases are classified in various glycosyl hydrolase (GH) families, GH2, GH5, GH7, GH8, GH18, GH19, GH20, GH46, GH48, GH73, GH75, GH80, GH84, and GH85. Here, we review characteristics and structures of chitin/chitosan hydrolyzing enzymes according to glycosyl hydrolase families in order to provide information about gene mining.

Key words : Chitin, chitosan, chitinase, chitosanase, glycosyl hydrolase

서 론

키틴(chitin)은 β -D-glucose의 C-2 hydroxyl기가 acetyl amino기로 치환된 N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)이 (β 1 \rightarrow 4) 결합에 의해 구성된 고분자 화합물로서 지구상에 셀룰로스 다음으로 가장 많이 생산되는 바이오매스이다. 키틴은 매년 해양 무척추동물, 곤충, 곰팡이 등에 의해 1×10^9 톤 정도가 생합성되고 있으며 곰팡이의 세포벽, 절족류, 강장동물, 연체동물 및 선충류 등 하등동물 껍질, 균류와 조류 등 하등식물의 세포벽에 존재한다. 반면 자연계중에 일부 곰팡이의 세포벽 [70]에 존재하며 키틴의 탈아세틸화를 통해 만들어지는 키토산(chitosan)은 항균활성[1], 중금속 흡착능력[6], 면역증강효과[15], 바이오필름형성[5] 등 다양한 생리 기능성 때문에 의약품 원료 및 기능성 식품 등으로 많은 주목을 받아왔다.

이러한 키틴/키토산은 불용성 고분자물질이라는 특성 때문에 그 이용에 제약이 있으므로 가수분해하여 저분자화 시켜서 식품에 첨가[26]하거나 의약품 전구체[37] 등으로 활용하려는 노력이 계속 증가하고 있다. 아울러 키토산의 단량체인 글루코사민(Glucosamine, GlcN)이 퇴행성 관절염의 통증 완화제로서 전세계적으로 주목을 받고[66] 최근에는 키틴의 단량체인 GlcNAc 역시 유사한 효과가 있는 것으로 보고[53]됨에 따라 키틴/키토산의 가수분해물에 대한 관심[67]이 점점 높아져가고 있는 추세이다.

키틴/키토산의 가수분해는 황산이나 염산 등 강산을 이용

한 산가수분해를 많이 사용해 왔으나 환경에 대한 영향에 관심이 늘어남에 효소를 이용한 가수분해가 더욱 주목을 받게 되어[57] chitinase (키틴분해효소)와 chitosanase (키토산분해효소)에 대한 다양한 연구가 수행되었다[18]. 특히 최근에는 인간에게도 키틴분해효소가 존재[14]하며 갑각류 알리지 반응에 대한 방어작용으로 사용된다는 연구가 보고됨에 따라[49] 과학적인 관심이 더욱 증가되고 있는 실정이다.

산업적으로 응용가능한 키틴/키토산 가수분해 효소를 찾기 위하여 많은 연구자들이 새로운 미생물들을 스크리닝하고 그 유전자를 탐색하는데 많은 노력을 기울여왔다. 하지만 최근에는 whole genome sequencing을 통한 유전체 데이터베이스들이 만들어지면서 새로운 유전자를 *in silico*에서 찾고 이를 단백질공학을 통해 개량하는 기술들이 개발되고 있다.

따라서 본 총설에서는 당가수분해효소들을 그 유전자 및 단백질의 1차구조에 따라 분류해놓은 데이터베이스인 CAZy (<http://www.cazy.org/>)의 glycosyl hydrolase (GH) family에 따라 지금까지 보고된 키틴분해효소와 키토산분해효소의 종류 및 그 특성을 분류하고 최근의 연구를 중심으로 그 특징들을 정리해 보고자 한다.

키틴분해효소 및 관련 효소들

전통적으로 키틴분해효소는 모두 GH family 18 (GH18)와 GH family 19 (GH19)에 속하며 GH18 키틴분해효소는 retaining [52], GH19 키틴분해효소는 inverting [43] 메커니즘을 갖는다는 것이 알려져 왔다. 그러나 최근에는 기존의 것들과는 상동성이 다른 GH48에 속하는 키틴분해효소가 보고되었고

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-6308, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : hanslee@silla.ac.kr

[17], 키틴을 분해하진 못하지만 글리칸(glycan)의 N,N'-diacetylchitobiosyl 단위를 가수분해하는 endo-N-acetylglucosaminidase (EC. 3.2.1.96)에 관한 연구도 진행되고 있다.

Glycosyl Hydrolase Family 18, 19 chitinase

현재까지 CAZy 데이터베이스에 분류된 GH18 및 GH19 효소들은 몇가지 예외를 빼놓고 모두 키틴분해효소다. 몇가지 예외는 *Streptomyces plicatus* [47], *Flavobacterium* sp. [58], *Elizabethkingia meningoseptica* [61]의 endo-N-acetylglucosaminidase들로 모두 GH18에 속하며 N-glycan에 존재하는 GlcNAc 사이의 (β1→4) 결합을 가수분해하는 효소인데 기질의 작용부위는 키틴과 동일하다.

GH18 키틴분해효소는 세균(bacteria), 고세균(archaea), 진핵생물(eukarya)의 세가지 domain 및 바이러스에서 모두 발견되었으나 GH19 키틴분해효소는 처음에 주로 고등 식물에서만 보고되었기 때문에 식물 특유의 키틴분해효소로 여겨지다가[2], 세균인 *Streptomyces griseus* HUT 6037에서 최초로 발견되었으며[43] 그 이후부터 다양한 세균과 바이러스에서도 발견되었다[29]. 하지만 아직까지 고세균에서 보고된 GH19 키틴분해효소는 단 한 종도 없다. 현재(2008년 7월)까지 CAZy 데이터베이스에 분류된 고세균 유래의 GH18 키틴분해효소 유전자는 10종, 세균 유래의 유전자는 1252종, 진핵생물의 유전자는 948종, 바이러스 유래의 유전자는 52종 등이며 GH19의 경우는 세균 유래가 207종, 진핵생물 유래가 509종, 바이러스 유래가 22종에 이른다.

앞서 말한 대로 키틴분해효소가 기질에 작용하는 메커니즘을 크게 두가지로 나눌 수 있는데 GH18 키틴분해효소는 retaining, GH19 키틴분해효소는 inverting 메커니즘[3,11]을 통해 당쇄 결합을 분해하는 것으로 밝혀졌다. Retaining과 in-

verting 방식 모두 두 개의 음이온성 아미노산이 반응에 관여하는데 retaining 방식은 하나의 음이온성 아미노산이 친핵체(nucleophile)로 작용하고 다른 하나의 음이온성 아미노산(주로 Glu)이 산/염기로 작용하여 가수 분해 후 anomeric form이 유지되는 방식이다. 반대로 inverting 방식은 두 개의 음이온성 아미노산이 모두 산/염기로 작용하여 가수분해 후 anomeric form이 변하는 방식이다(Table 1).

이러한 활성 메커니즘과 더불어 GH18과 GH19를 가르는 또다른 큰 특징은 바로 단백질의 catalytic domain의 3차 구조이다. GH18의 경우는 다른 glycosidase superfamily에서 나타나는 TIM-barrel fold를 갖고 있다. TIM barrel fold는 하나의 barrel 형 구조에 β/α motif가 8개 존재하는 (β/α)₈ 구조를 뜻하는데 glycosyl hydrolase 이외의 다른 단백질들에도 많이 존재하는 구조이다. 반면 현재까지 세균인 *Streptomyces coelicolor* A3(2) [24], *Streptomyces griseus* HUT 6037 [30]와 진핵생물인 *Brassica juncea* [65], *Canavalia ensiformis* [23], *Hordeum vulgare* [55], *Oryza sativa* (PDB id 2DKV, unpublished) 등 5개 단백질에서만 catalytic domain의 3차 구조가 밝혀졌고 GH19의 경우는 명확하게 특징을 지을 수 있는 공통구조가 없이 다양한 것이 특징인데 식물의 GH19 키틴분해효소들은 활성 부위가 넓고 깊은 틈(cleft)에 존재하는 α-helix가 많은 구조를 갖고 있다(Fig. 1).

Glycosyl hydrolase는 작용 방식에 따라 endo형과 exo형으로도 분류한다. 키틴분해효소 역시 endo형과 exo형으로 나뉘는데 exo형은 비환원말단으로부터 GlcNAc를 몇 단위씩 잘라내느냐에 따라 다음의 세가지 분류로 나뉘게 된다. 첫째는 비환원말단으로부터 GlcNAc를 하나씩 잘라내는 N-acetyl-β-glucosaminidase, 두번째는 이당류인 chitobiose 단위로 잘라내는 chitobiosidase [33], 세번째는 삼당류 단위로 잘라내는

Table 1. Glycosyl hydrolase families related by chitin/chitosan hydrolysis

Family	Activity	3D structure	Mechanisms	Source*	Clan
GH2	Cellulase/exochitinase	(β/α) ₈	Retaining	A, B, E	GH-A
GH5	Cellulase/Chitinase	(β/α) ₈	Retaining	A, B, E	GH-A
GH7	Cellulase/Chitinase	β-jelly roll	Retaining	E	GH-B
GH8	Cellulase/Chitinase	(α/α) ₆	Inverting	B	GH-M
GH18	Chitinase	(β/α) ₈	Retaining	A, B, E	GH-K
GH19	Chitinase	Variable	Inverting	B, E	None
GH20	N-acetyl-β-glucosaminidase/Chitobiase	(β/α) ₈	Retaining	A, B, E	GH-K
GH46	Chitinase	α+β	Inverting	B	GH-I
GH48	Cellulase/Chitinase	(α/α) ₆	Inverting	B, E	GH-M
GH73	Endo-N-acetylglucosaminidase	N.D.**	N.D	B	None
GH75	Chitinase	N.D	Inverting	B, E	None
GH80	Chitinase	N.D	Inverting	B	GH-I
GH84	β-N-acetylglucosaminidase	(β/α) ₈	Retaining	A, B, E	None
GH85	Endo-N-acetylglucosaminidase	N.D	Retaining	B, E	GH-K

* A, archaea; B, bacteria; E, eukarya

** N.D., not determined

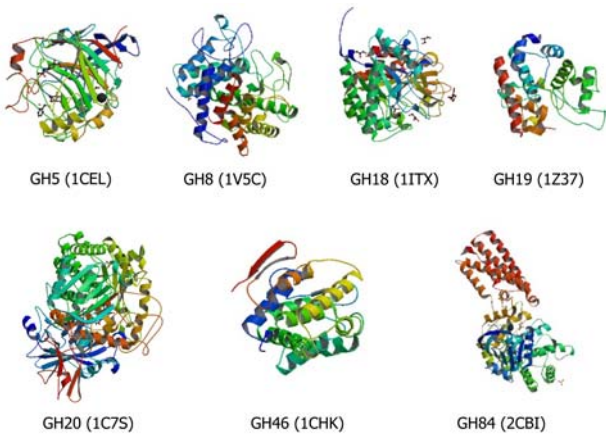


Fig. 1. Structures of the main fold of the catalytic domain in various glycosyl hydrolase families. All figures were adopted from PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>). Each PDB id is in the parenthesis.

chitotriosidase [50]이다. 이들 중 chitobiosidase 및 chitotriosidase는 모두 GH18에 속한다. 하지만 N-acetyl-β-glucosaminidase는 chitobiase라고도 불리는데 GH18이나 GH19의 효소를 이용하여 키틴을 분해하면 chitobiose 이상의 올리고당이 만들어지는 것이 일반적이고 키틴을 단당인 GlcNAc로 분해하기 위해서는 N-acetyl-β-glucosaminidase를 이용하는 것이 효과적이다

N-acetyl-β-glucosaminidase (chitobiase)

생체내에서 주로 당단백질이나 당지질의 glycan 분해에 관여하는 효소로서 비환원 말단에 존재하는 GlcNAc를 제거하는 반응을 하는 exo형 효소를 N-acetyl-β-glucosaminidase (EC 3.2.1.52)라고 한다. N-acetyl-β-glucosaminidase는 좀 더 큰 카테고리인 β-N-acetyl-D-hexosaminidase의 한 종류인데 [41] N-acetyl-β-glucosaminidase들 중에는 키틴이 endochitinase에 의해 분해된 산물인 chitobiose를 단당인 GlcNAc로 분해하는 chitobiase 활성을 나타내는 것들이 상당 수 존재한다[28,45,62].

거의 모든 chitobiase는 GH20에 속하는 효소들이며 특히 당단백질이 많은 진핵생물인 곰팡이 및 식물 유래의 효소들에서 많이 발견되었으나 세균에서도 chitobiase들이 보고되었는데 *Aeromonas hydrophila* [31], *Arthrobacter* sp. TAD20 [36], *Serratia marcescens* 2170 [63] 등이 대표적이다. 몇몇 GH20의 효소들의 3차구조가 보고되었는데[32,35,39,45], GH18 키틴분해효소와 마찬가지로 (β/α)₈ TIM-barrel fold를 나타내고 있다. 흥미롭게도 이러한 chitobiase의 3차구조는 사람의 hexosaminidase인 HexA [35]와 HexB [38]와도 구조적으로 유사한데 사람의 Hex 단백질들은 GM2-ganglioside 말단의 N-acetyl-D-galactoseamine을 잘라내는 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

GH20에 속하지 않는 chitobiase는 β-glucosidase family인 GH3에 속하는 chitobiase가 *Alteromonas* sp. Strain O-7에서 보고된 경우가 유일하다[64]. 또한 주로 O-glycan의 당쇄분해 효소 family인 GH84에 속하는 효소들에서도 β-N-acetylglucosaminidase 활성이 보고되었으나[46] chitobiase활성은 보고된 적이 없다. GH84은 주로 glycosaminoglycan (GAG)의 말단을 가수분해하는 효소로서 β-N-acetyl-D-glucosaminidase 이외에도 hyaluronidase 등도 함께 포함하고 있다.

Endo-N-acetylglucosaminidases

Endo-N-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.96)는 키틴분해효소와 마찬가지로 효소가 작용하는 기질의 부위가 GlcNAc 사이의(β1→4) 결합이다. 하지만 이 효소는 키틴을 분해하는 경우는 드물고 주로 당단백질의 N-glycan에 존재하는 GlcNAc 사이를 가수분해 GH85로 분류된다[16]. N-glycosylation은 단백질의 Asn 잔기에 GlcNAc 두 분자가 (β1→4) 결합으로 연결되고 그 다음으로 mannose 및 다른 당류들이 다양하게 연결된 복합다당(complex carbohydrates)으로 구성되어 있다(Fig. 2). 따라서 endo-N-acetylglucosaminidase는 이런 복합다당의 분해에 작용하는 효소[16,22]로서 post-translational modification의 중요한 역할을 담당하지만 키틴의 분해에는 관여하지 않는다. 현재까지 GH85의 단백질의 3차구조는 밝혀진 바가 없다.

Glycosyl hydrolase family 73에 분류된 효소들은 대부분 세포벽 성분인 펩티도글리칸을 분해하는 효소들인데 이들 중 *Bacillus subtilis* [48], *Lactococcus lactis* [56], *Enterococcus hirae* [12], *Staphylococcus warneri* M [68] 유래의 세포벽분해효소의 경우에 endo-N-acetylglucosaminidase 활성을 보인다는 보고

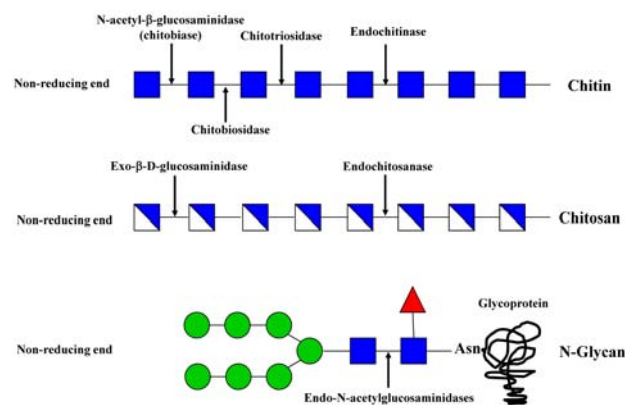


Fig. 2. Mode of actions of chitin/chitosan hydrolases. Arrow indicates the position of hydrolysis. All symbols of sugars are followed by symbol and text nomenclature for representation of glycan structure by nomenclature committee consortium for functional glycomics. (Blue square, GlcNAc; blue squares divided diagonally, GlcN; green circle, mannose; red triangle, fucose)

가 있다. 아마도 이 경우는 펩티도글리칸이 GlcNAc와 N-acetylmuraminic acid로 구성이 되어있기 때문에 펩티도글리칸의 구성물질인 GlcNAc 잔기를 인식해서 효소 활성을 보이는 경우가 있는 것으로 추정된다.

GH48 chitinase

GH48 family에 속하는 효소들은 대부분 cellulase 계열로 알려져 왔으며 cellulase L type으로 분류되었지만 최근에 키틴분해효소 활성을 나타내고 cellulase 활성이 없는 단백질인 APAP I이 딱정벌레류인 *Gastrophysa atrocyanea* 보고되었다 [17]. APAP (active phase-associated proteins)는 I과 II가 발견되었는데 APAP I은 GH48로 분류되는 유일한 키틴분해효소이지만 다른 곤충들의 키틴분해효소와 아미노산 서열 상동성이 없다.

키틴산분해효소 및 관련 효소들

글루코사민의 중합체인 키틴산을 분해하는 키틴산분해효소 역시 다양한 glycosyl hydrolase family에 걸쳐 존재하지만 키틴분해효소가 주로 키틴만을 특이적으로 분해하는 것과 달리, 키틴산분해효소의 경우는 키틴산만을 특징적으로 분해하는 키틴산분해효소들(GH46, GH75, GH80)이 있는가 하면 cellulose 등 유사한 구조의 넓은 기질 특이성을 보이는 키틴산분해효소들(bifunctional chitosanases)이 있다는 것이 중요한 차이점이다.

GH46 키틴산분해효소

전통적으로 키틴산분해효소(EC 3.2.1.132)는 GH46으로 여겨져 왔다. GH46으로 분류된 모든 효소들은 예외 없이 inverting 모드의 키틴산분해효소고 모두 세균 유래이며 고세균이나 진핵생물 유래는 아직까지 보고된 것이 없다. 이 중에서 가장 많은 연구가 이루어진 효소가 바로 *Streptomyces* sp. N174의 키틴산분해효소(CSN)이다[19,21,25,40]. 이 효소는 항곰팡이 활성을 가지고 있으며 GH46 단백질 중에 최초로 3차 구조가 규명되었는데 그 구조가 lysozyme과 유사한 ($\alpha+\beta$) fold인 것으로 밝혀졌다. GH46 키틴산분해효소 가운데 3차 구조가 밝혀진 다른 하나는 *Bacillus circulans* MH-K1 유래의 키틴산분해효소인데[51] 이 두 효소 모두 2개의 도메인으로 구성되어 있고 도메인 사이에 활성부위 cleft가 존재하는 구조를 나타내었다. 하지만 이 두 효소의 작용 방식에는 차이가 있는데 *Streptomyces* sp. N174의 CSN은 가수분해 후 산물의 비환원 말단이 반드시 GlcN이지만 *B. circulans* MH-K1 키틴산분해효소는 가수분해 산물의 비환원 말단에 GlcN 또는 GlcNAc 모두 존재할 수 있었다[51].

키틴산 올리고당의 다양한 기능성이 주목을 받음에 따라 효소를 이용한 키틴산 올리고당의 생산에 많은 관심이 모아지

고 있으며 특히 이당류가 적고 hexamer인 (GlcN)₆이 많은 올리고당의 생산에 사용가능한 효소들이 주목 받고 있다. GH46 키틴산분해효소는 최종산물에 키틴산 이당류와 삼당류를 상대적으로 많이 포함하고 있기 때문에 올리고당 생산에 약간의 단점을 가지고 있다고 여겨지며 따라서 최근에는 GH8 키틴산분해효소가 주목을 받고 있다[34].

GH75와 GH80 키틴산분해효소

비교적 최근에 밝혀진 키틴산분해효소 family가 두 종류 더 있는데 GH75와 GH80이다. GH75의 경우는 몇몇 세균(모두 *Streptomyces*) 유래가 있지만 주로 진핵생물, 그 중에서도 특히 곰팡이 유래의 효소가 대부분인 반면[7,8], GH80의 효소들은 현재까지 모두 세균 유래의 키틴산분해효소다[54,69]. GH75와 GH80 키틴산분해효소들 중에 단백질의 3차 구조가 규명된 것은 아직 없으며 모두 inverting mode로 작용한다. GH80의 경우는 GH46과 중요 아미노산 잔기에서는 약간의 상동성을 보였으나 GH75의 경우는 상동성을 보이지 않는다. GH75 키틴산분해효소의 대표적인 효소인 *Aspergillus fumigatus* CSN의 경우는 *Streptomyces* sp. N174의 CSN과 유사하게 가수분해산물의 비환원 말단이 반드시 GlcN인 특징을 보였다[8].

Bifunctional chitosanases

원래 glycosyl hydrolase family 8 (GH8)은 cellulase family D로서 분류되어 왔으나 최근에는 키틴산분해효소, xylanase, licheninase (EC 3.2.1.73) 등 ($\beta 1\rightarrow 4$) 결합당을 가수분해하는 다양한 효소 활성들이 보고되고 있다[4,34,71]. 특징적인 것은 대부분의 GH8 키틴산분해효소는 cellulase 활성도 동시에 갖고 있다는 것으로서 cellulose와 키틴산의 구조가 2번 탄소의 hydroxyl기와 amine 기의 차이 밖에 없다는 점에서 유사한 활성을 동시에 갖는 것이 아닌가 하는 추측을 낳고 있다.

GH8 키틴산분해효소들은 키틴산 올리고당의 생성에 좀 더 나은 특성을 갖는 것으로 여겨지는데 이는 키틴산을 분해한 최종산물에 이당류의 함량이 적고 삼당류와 사당류가 상대적으로 많아 조금 더 크기가 큰 올리고당을 만드는데 유리하기 때문이다[9,34]. 물론 이와 같은 반응은 효소 대 기질의 비율 및 반응 조건에 따라 키틴산 분해물의 크기를 조절하는 것이 가능하지만 효소의 자체 특성을 감안해 보면 GH8 키틴산분해효소가 키틴산 올리고당의 제조에 조금 더 유리할 것으로 여겨진다.

GH8과 마찬가지로 cellulase family인 GH5의 단백질 중에서도 키틴산분해효소 활성이 있는 bifunctional chitosanase들이 *Myxobacter* sp. AL-1 [44], *Bacillus licheniformis* [13], *Streptomyces griseus* HUT 6037 [59] 등의 세균들에서 보고되었다. 그 중 *S. griseus* HUT 6037의 ChtII의 경우는 독특하게도 transglycosylation 활성을 나타내었고 키틴산 분해 최종산물

로 사당류 이상을 주로 생산하여 GH8과 유사한 경향을 보였다[59]. 또한 cellulase C family인 GH7에서도 cellulase와 키토산분해효소 활성을 동시에 보이는 효소가 최근에 보고되었는데 특징적인 것은 이들은 모두 진핵생물인 곰팡이 유래 (*Trichoderma reesei*, *Aspergillus aculeatus*)이며 cellobiohydrolase 활성을 동시에 갖고 있었다[42].

GH2 exo- β -D-glucosaminidases

상기의 대부분 효소들은 모두 endo-type의 키토산분해효소임에 비해 비환원말단에서부터 글루코사민을 한 분자씩 가수분해하는 exo-type의 키토산분해효소들도 보고되고 있는데 이 효소를 exo- β -D-glucosaminidase 라고 한다. 현재까지 보고된 exo- β -D-glucosaminidase들은 주로 곰팡이 유래의 효소들 [20,27]이지만 그램 양성세균인 *Amycolatopsis orientalis* subsp. *orientalis*에서도 보고되고 있다[10]. 이들 효소는 모두 GH2에 속하는 특징을 가지고 있어서 GH2에 속하는 효소 중에서 exo-chitosanase 활성을 갖는 효소들이 존재할 가능성이 높다고 하겠다.

Exo- β -D-glucosaminidase이 효소는 최근에 산업적으로 주목을 받고 있는데 그 이유는 키토산에서 직접 글루코사민 (GlcN)을 생산할 수 있다는 것이다. 최근 퇴행성 관절염 통증 완화제로서 글루코사민이 다양한 주목을 받으면서 산처리물 대신하는 청정기술로서 효소적인 방법으로 글루코사민을 생산하기 위한 노력들을 기울이고 있는데 가장 바람직한 대안이 바로 exo- β -D-glucosaminidase를 이용하여 키토산에서 단번에 글루코사민을 만드는 방법이기 때문이다.

요 약

키틴과 그 탈아세틸화된 형태인 키토산은 지구 상에 가장 풍부하게 존재하는 바이오매스의 하나이다. 키틴과 키토산은 항균활성, 면역증강, 중금속 흡착 등 다양한 생리활성을 보이고 있으며 식품, 의약품, 환경산업 등에서 다양하게 응용되고 있다. 이러한 키틴/키토산을 가수분해하는 효소들과 그 3차구조, 유전자들이 세균, 고세균, 진핵생물 등 모든 생물종에서 보고되어 왔다. 탄수화물을 가수분해하는 효소들은 그 아미노산 서열에 따라 CAZy (Carbohydrate Active Enzymes) 데이터베이스에 분류되었는데 흥미롭게도 최근까지 키틴가수분해효소와 키토산가수분해효소들은 14개의 glycosyl hydrolase (GH) family들로 분류되어 있다(GH2, GH5, GH7, GH8, GH18, GH19, GH20, GH46, GH48, GH73, GH75, GH80, GH84, GH85). 본 총설에서는 새로운 유전자원을 찾기위한 한편으로서 최근에 새롭게 분류된 glycosyl hydrolase family의 분류법에 따라 각각의 GH family에 속하는 키틴/키토산 가수분해효소의 종류 및 구조, 그리고 그 효소적 특징에 대하여 논하고자 한다.

References

- Anas, A., S. Paul, N. S. Jayaprakash, R. Philip and I. S. Bright Singh. 2005. Antimicrobial activity of chitosan against vibrios from freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* larval rearing systems. *Dis. Aquat. Organ.* **67**, 177-179.
- Beintema, J. J. 1994. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. *FEBS Lett.* **350**, 159-163.
- Brameld, K. A. and W. A. Goddard, 3rd. 1998. The role of enzyme distortion in the single displacement mechanism of family 19 chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 4276-4281.
- Bueno, A., C. R. Vazquez de Aldana, J. Correa and F. del Rey. 1990. Nucleotide sequence of a 1,3-1,4- β -glucanase-encoding gene in *Bacillus circulans* WL-12. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4248.
- Cao, Z. and Y. Sun. 2008. Chitosan-based rechargeable long-term antimicrobial and biofilm-controlling systems. *J. Biomed. Mater. Res. A*. (pub ahead of print)
- Cardenas, G., P. Orlando and T. Edelio. 2001. Synthesis and applications of chitosan mercaptanes as heavy metal retention agent. *Int. J. Biol. Macromol.* **28**, 167-174.
- Chen, Y. Y., C. Y. Cheng, T. L. Haung and Y. K. Li. 2005. A chitosanase from *Paecilomyces lilacinus* with binding affinity for specific chito-oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **41**, 145-150.
- Cheng, C. Y., C. H. Chang, Y. J. Wu and Y. K. Li. 2006. Exploration of glycosyl hydrolase family 75, a chitosanase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Biol. Chem.* **281**, 3137-3144.
- Choi, Y. J., E. J. Kim, Z. Piao, Y. C. Yun and Y. C. Shin. 2004. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4522-4531.
- Cote, N., A. Fleury, E. Dumont-Blanchette, T. Fukamizo, M. Mitsutomi and R. Brzezinski. 2006. Two exo- β -D-glucosaminidases/exochitinases from actinomycetes define a new subfamily within family 2 of glycoside hydrolases. *Biochem. J.* **394**, 675-686.
- Dahiya, N., R. Tewari and G. S. Hoondal. 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes, a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 773-782.
- Eckert, C., S. Magnet and S. Mesnage. 2007. The *Enterococcus hirae* Mur-2 enzyme displays N-acetylglucosaminidase activity. *FEBS Lett.* **581**, 693-696.
- Ekowati, C., P. Hariyadi, A. B. Witarto, J. K. Hwang and M. T. Suhartono. 2006. Biochemical Characteristics of Chitosanase From the Indonesian *Bacillus licheniformis* MB-2. *Mol. Biotechnol.* **33**, 93-102.
- Elias, J. A., R. J. Homer, Q. Hamid and C. G. Lee. 2005. Chitinases and chitinase-like proteins in T(H)2 inflammation and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 497-500.
- Feng, J., L. Zhao and Q. Yu. 2004. Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochem.*

- Biophys. Res. Commun.* **317**, 414-420.
16. Fujita, K., K. Kobayashi, A. Iwamatsu, M. Takeuchi, H. Kumagai and K. Yamamoto. 2004. Molecular cloning of *Mucor hiemalis* endo- β -N-acetylglucosaminidase and some properties of the recombinant enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **432**, 41-49.
 17. Fujita, K., K. Shimomura, K. Yamamoto, T. Yamashita and K. Suzuki. 2006. A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **345**, 502-507.
 18. Fukamizo, T. 2000. Chitinolytic enzymes, catalysis, substrate binding, and their application. *Curr. Protein Pept. Sci.* **1**, 105-124.
 19. Fukamizo, T. and R. Brzezinski. 1997. Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174, a comparative review of its structure and function. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 687-696.
 20. Fukamizo, T., A. Fleury, N. Cote, M. Mitsutomi and R. Brzezinski. 2006. Exo- β -D-glucosaminidase from *Amycolatopsis orientalis*, catalytic residues, sugar recognition specificity, kinetics, and synergism. *Glycobiology* **16**, 1064-1072.
 21. Fukamizo, T., Y. Honda, S. Goto, I. Boucher and R. Brzezinski. 1995. Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Biochem. J.* **311**, 377-383.
 22. Hagglund, P., R. Matthiesen, F. Elortza, P. Hojrup, P. Roepstorff, O. N. Jensen and J. Bunkenborg. 2007. An enzymatic deglycosylation scheme enabling identification of core fucosylated N-glycans and O-glycosylation site mapping of human plasma proteins. *J. Proteome Res.* **6**, 3021-3031.
 23. Hahn, M., M. Hennig, B. Schlesier and W. Hohne. 2000. Structure of jack bean chitinase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **56**, 1096-1099.
 24. Hoell, I. A., B. Dalhus, E. B. Heggset, S. I. Aspmo and V. G. Eijsink. 2006. Crystal structure and enzymatic properties of a bacterial family 19 chitinase reveal differences from plant enzymes. *FEBS J.* **273**, 4889-4900.
 25. Honda, Y., T. Fukamizo, I. Boucher and R. Brzezinski. 1997. Substrate binding to the inactive mutants of *Streptomyces* sp. N174 chitosanase, indirect evaluation from the thermal unfolding experiments. *FEBS Lett.* **411**, 346-350.
 26. Huang, R. L., Y. L. Yin, G. Y. Wu, Y. G. Zhang, T. J. Li, L. L. Li, M. X. Li, Z. R. Tang, J. Zhang, B. Wang, J. H. He and X. Z. Nie. 2005. Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. *Poult Sci.* **84**, 1383-1388.
 27. Ike, M., K. Isami, Y. Tanabe, M. Nogawa, W. Ogasawara, H. Okada and Y. Morikawa. 2006. Cloning and heterologous expression of the exo- β -D-glucosaminidase-encoding gene (gls93) from a filamentous fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 687-695.
 28. Jenkinson, H. F. and M. G. Shepherd. 1987. A mutant of *Candida albicans* deficient in β -N-acetylglucosaminidase (chitobiase). *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2097-2106.
 29. Kawase, T., A. Saito, T. Sato, R. Kanai, T. Fujii, N. Nikaidou, K. Miyashita and T. Watanabe. 2004. Distribution and phylogenetic analysis of family 19 chitinases in Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1135-1144.
 30. Kezuka, Y., M. Ohishi, Y. Itoh, J. Watanabe, M. Mitsutomi, T. Watanabe and T. Nonaka. 2006. Structural studies of a two-domain chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *J. Mol. Biol.* **358**, 472-484.
 31. Lan, X., X. Zhang, R. Kodaira, Z. Zhou and M. Shimosaka. 2008. Gene cloning, expression, and characterization of a second β -N-acetylglucosaminidase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 492-498.
 32. Langley, D. B., D. W. Harty, N. A. Jacques, N. Hunter, J. M. Guss and C. A. Collyer. 2008. Structure of N-acetyl- β -D-glucosaminidase(GcnA) from the endocarditis pathogen *Streptococcus gordonii* and its complex with the mechanism-based inhibitor NAG-thiazoline. *J. Mol. Biol.* **377**, 104-116.
 33. Lee, H. S., D. S. Han, S. J. Choi, S. W. Choi, D. S. Kim, D. H. Bai and J. H. Yu. 2000. Purification, characterization, and primary structure of a chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 397-405.
 34. Lee, H. S., J. S. Jang, S. K. Choi, D. W. Lee, E. J. Kim, H. C. Jung and J. G. Pan. 2007. Identification and expression of GH8 family chitosanases from several *Bacillus thuringiensis* subspecies. *FEMS Microbiol. Lett.* **277**, 133-141.
 35. Lemieux, M. J., B. L. Mark, M. M. Cherney, S. G. Withers, D. J. Mahuran and M. N. James. 2006. Crystallographic structure of human β -hexosaminidase A, interpretation of Tay-Sachs mutations and loss of GM2 ganglioside hydrolysis. *J. Mol. Biol.* **359**, 913-929.
 36. Lonhienne, T., J. Zoidakis, C. E. Vorgias, G. Feller, C. Gerday and V. Bouriotis. 2001. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic Antarctic bacterium. *J. Mol. Biol.* **310**, 291-297.
 37. Maeda, Y. and Y. Kimura. 2004. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. *J. Nutr.* **134**, 945-950.
 38. Mark, B. L., D. J. Mahuran, M. M. Cherney, D. Zhao, S. Knapp and M. N. James. 2003. Crystal structure of human β -hexosaminidase B, understanding the molecular basis of Sandhoff and Tay-Sachs disease. *J. Mol. Biol.* **327**, 1093-1109.
 39. Mark, B. L., D. J. Vocadlo, S. Knapp, B. L. Triggs-Raine, S. G. Withers and M. N. James. 2001. Crystallographic evidence for substrate-assisted catalysis in a bacterial β -hexosaminidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 10330-10337.
 40. Masson, J. Y., F. Denis and R. Brzezinski. 1994. Primary sequence of the chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174 and comparison with other endoglycosidases. *Gene* **140**, 103-107.
 41. Mayer, C., D. J. Vocadlo, M. Mah, K. Rupitz, D. Stoll, R. A. Warren and S. G. Withers. 2006. Characterization of a β -N-acetylhexosaminidase and a β -N-acetylglucosaminidase/ β -glucosidase from *Cellulomonas fimi*. *FEBS J.* **273**, 2929-2941.
 42. Nogawa, M., H. Takahashi, A. Kashiwagi, K. Ohshima, H. Okada and Y. Morikawa. 1998. Purification and character-

- ization of exo- β -d-glucosaminidase from a cellulolytic fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 890-895.
43. Ohno, T., S. Armand, T. Hata, N. Nikaidou, B. Henrissat, M. Mitsutomi and T. Watanabe. 1996. A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J. Bacteriol.* **178**, 5065-5070.
 44. Pedraza-Reyes, M. and F. Gutierrez-Corona. 1997. The bi-functional enzyme chitosanase-cellulase produced by the gram-negative microorganism *Mycobacter* sp. AL-1 is highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases. *Arch. Microbiol.* **168**, 321-327.
 45. Prag, G., Y. Papanikolaou, G. Tavlas, C. E. Vorgias, K. Petratos and A. B. Oppenheim. 2000. Structures of chitobiase mutants complexed with the substrate Di-N-acetyl-d-glucosamine, the catalytic role of the conserved acidic pair, aspartate 539 and glutamate 540. *J. Mol. Biol.* **300**, 611-617.
 46. Rao, F. V., H. C. Dorfmüller, F. Villa, M. Allwood, I. M. Eggleston and D. M. van Aalten. 2006. Structural insights into the mechanism and inhibition of eukaryotic O-GlcNAc hydrolysis. *EMBO J.* **25**, 1569-1578.
 47. Rao, V., T. Cui, C. Guan and P. Van Roey. 1999. Mutations of endo- β -N-acetylglucosaminidase H active site residue Asp130 and Glu132, activities and conformations. *Protein Sci.* **8**, 2338-2346.
 48. Rashid, M. H., M. Mori and J. Sekiguchi. 1995. Glucosaminidase of *Bacillus subtilis*, cloning, regulation, primary structure and biochemical characterization. *Microbiology* **141**, 2391-2404.
 49. Reese, T. A., H. E. Liang, A. M. Tager, A. D. Luster, N. Van Rooijen, D. Voehringer and R. M. Locksley. 2007. Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy. *Nature* **447**, 92-96.
 50. Renkema, G. H., R. G. Boot, A. O. Muijsers, W. E. Donker-Koopman and J. M. Aerts. 1995. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 2198-2202.
 51. Saito, J., A. Kita, Y. Higuchi, Y. Nagata, A. Ando and K. Miki. 1999. Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-Å resolution and its substrate recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* **274**, 30818-30825.
 52. Sasaki, C., A. Yokoyama, Y. Itoh, M. Hashimoto, T. Watanabe and T. Fukamizo. 2002. Comparative study of the reaction mechanism of family 18 chitinases from plants and microbes. *J. Biochem.* **131**, 557-564.
 53. Shikhman, A. R., K. Kuhn, N. Alaaeddine and M. Lotz. 2001. N-acetylglucosamine prevents IL-1 β -mediated activation of human chondrocytes. *J. Immunol.* **166**, 5155-5160.
 54. Shimosaka, M., Y. Fukumori, X. Y. Zhang, N. J. He, R. Kodaira and M. Okazaki. 2000. Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 354-360.
 55. Song, H. K. and S. W. Suh. 1996. Refined structure of the chitinase from barley seeds at 2.0 Å resolution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **52**, 289-298.
 56. Steen, A., G. Buist, G. J. Horsburgh, G. Venema, O. P. Kuipers, S. J. Foster and J. Kok. 2005. AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *FEBS J.* **272**, 2854-2868.
 57. Synowiecki, J. and N. A. Al-Khateeb. 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **43**, 145-171.
 58. Takegawa, K., B. Mikami, S. Iwahara, Y. Morita, K. Yamamoto and T. Tochikura. 1991. Complete amino acid sequence of endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Flavobacterium* sp. *Eur. J. Biochem.* **202**, 175-180.
 59. Tanabe, T., K. Morinaga, T. Fukamizo and M. Mitsutomi. 2003. Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 354-364.
 60. Tanaka, T., S. Fujiwara, S. Nishikori, T. Fukui, M. Takagi and T. Imanaka. 1999. A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 5338-5344.
 61. Tarentino, A. L., G. Quinones, L. M. Changchien and T. H. Plummer, Jr. 1993. Multiple endoglycosidase F activities expressed by *Flavobacterium meningosepticum* endoglycosidases F2 and F3. Molecular cloning, primary sequence, and enzyme expression. *J. Biol. Chem.* **268**, 9702-9708.
 62. Tews, I., R. Vincentelli and C. E. Vorgias. 1996. N-Acetylglucosaminidase (chitobiase) from *Serratia marcescens*, gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene* **170**, 63-67.
 63. Toratani, T., T. Shoji, T. Ikehara, K. Suzuki and T. Watanabe. 2008. The importance of chitobiase and N-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in N,N'-diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] utilization by *Serratia marcescens* 2, 170. *Microbiology* **154**, 1326-1332.
 64. Tsujibo, H., K. Fujimoto, H. Tanno, K. Miyamoto, C. Imada, Y. Okami and Y. Inamori. 1994. Gene sequence, purification and characterization of N-acetyl- β -glucosaminidase from a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Gene* **146**, 111-115.
 65. Ubhayasekera, W., C. M. Tang, S. W. Ho, G. Berglund, T. Bergfors, M. L. Chye and S. L. Mowbray. 2007. Crystal structures of a family 19 chitinase from *Brassica juncea* show flexibility of binding cleft loops. *FEBS J.* **274**, 3695-3703.
 66. van Blitterswijk, W. J., J. C. van de Nes and P. I. Wuisman. 2003. Glucosamine and chondroitin sulfate supplementation to treat symptomatic disc degeneration, biochemical rationale and case report. *BMC Complement Altern. Med.* **3**, 2.
 67. Wang, S. L., T. Y. Lin, Y. H. Yen, H. F. Liao and Y. J. Chen. 2006. Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr. Res.* **341**, 2507-2515.
 68. Yokoi, K. J., K. Sugahara, A. Iguchi, G. Nishitani, M. Ikeda, T. Shimada, N. Inagaki, A. Yamakawa, A. Taketo and K.

- Kodaira. 2008. Molecular properties of the putative autolysin Atl (WM) encoded by *Staphylococcus warneri* M, mutational and biochemical analyses of the amidase and glucosaminidase domains. *Gene* **416**, 66-76.
69. Yun, C., D. Amakata, Y. Matsuo, H. Matsuda and M. Kawamukai. 2005. New chitosan-degrading strains that produce chitosanases similar to ChoA of *Mitsuaria chitosanitabida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 5138-5144.
70. Zamani, A., L. Edebo, B. Sjostrom and M. J. Taherzadeh. 2007. Extraction and precipitation of chitosan from cell wall of zygomycetes fungi by dilute sulfuric acid. *Biomacromolecules* **8**, 3786-3790.
71. Zverlov, V., S. Mahr, K. Riedel and K. Bronnenmeier. 1998. Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (CelA) from the extreme thermophile '*Anaerocellum thermophilum*' with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains. *Microbiology* **144**, 457-465.