

Chitooligosaccharides 생산에 적합한 Chitinase를 분비하는 균주의 선별, Chitinase의 분리정제 및 반응특성

정의준 · 이용현*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Isolation of Microorganism Producing Chitinase for Chitooligosaccharides Production, Purification of Chitinase, and its Enzymatic Characteristics

Eui-Jun Jeong and Yong-Hyun Lee*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — In order to produce functional chitooligosaccharides, a strain excreting mainly endo-type chitinase suitable for chitooligosaccharides production was newly screened and identified as *Aspergillus fumigatus* JC-19. The chitinase excretion was repressed in nutrient rich medium but stimulated by colloidal chitin indicating that the chitinase is inducible type enzyme. Maximum secretion of the enzyme was observed at pH 7.0 and 37°C. The growth and chitinase production patterns of *Aspergillus fumigatus* JC-19 showed that the cell growth reached maximum after 4~5 days with final chitinase concentration of 0.46 unit per ml. Excreted chitinase was purified by ammonium sulfate precipitation, colloidal chitin adsorption, anion exchange chromatography, and gel filtration, respectively, and measured M.W of 50 KDa. The enzyme reaction carried out both by crude and purified chitinase showed that the purified chitinase accumulated more chitooligosaccharides of 1~6 degree of polymerization than that of crude chitinase.

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)이 β -1,4 결합으로 중합된 고분자물질로서, 게껍질의 70%, 곤충 껍질의 30~60%, 연체동물 건조 표피의 40% 내외를 이루고 있다(1-3). Chitin은 결정구조를 이루며 분자쇄의 배열에 따라 α , β 그리고 γ 형 chitin으로 나뉜다(3). Chitin과 그 유도체들은 의료, 식품, 농업, 의류, 폐수처리, 및 화장품과 같은 분야에 널리 이용되고 있다(1, 3).

Chitin과 chitosan 분해 관련 효소로는 chitin 및 chitodextrin의 N-acetyl- β -1,4-glucosamine 결합을 무작위로 절단하는 endo 형 chitinase, chitobiose를 단량체인 N-acetyl glucosamine으로 분해하는 N-acetyl glucosaminidase, 그리고 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 이당체인 diacetylchitobiose 또는 그 이상의 단위체로 절단하는 exo 형 chitinase 등 세종류가

알려져 있다. 이외에도 *N. orientalis*(4)와 *Bacillus* sp. (5) 등의 균주에서 분리한 chitinase가 당전이능을 지닌 것으로 알려져 있다.

Chitinolytic 효소는 동식물, 곤충, 어패류 등에 넓게 존재하며, 미생물로는 *Serratia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Streptomyces* 등과 같은 세균류와 *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* 등과 같은 곰팡이류에 존재하는 것으로 알려져 있다(6, 7). 또한 최근에는 chitinolytic 효소 관련 유전자에 관한 연구가 국내외를 통하여 활발히 진행되고 있으며, 현재까지 수십종의 유전자가 cloning 되었다(8).

Chitinase 분리 정제에 관한 연구는 국내외적으로 많이 보고되어 있으며(7, 9-11), chitin 및 colloidal chitin을 사용하여 chitinase을 흡착시켜 분리하는 affinity chromatography 법과 isoelectronic point를 이용하여 분리하는 이온 교환 수지 chromatography 방법이 주로 이용되고 있다.

최근 chitin의 가수분해 산물인 chitooligosaccharide는 혈중 콜레스테롤의 저하, 항암 작용, 상처 회복

Key words: *Aspergillus fumigatus* JC-19, chitinase, chitooligosaccharides, chitin, purification, colloidal chitin

*Corresponding author

촉진, 면역기능 증진, 항진균성, 항균성, 그리고 유산균 증식 촉진 등과 같은 각종 기능성이 알려져 앞으로 널리 이용될 것이 기대되며(12), chitin과 chitosan을 강산으로 처리하거나, 각종 chitinolytic 효소로 가수분해하여 생산할 수 있다.

Chitinase를 이용하는 효소 처리법은 분해산물의 중합도를 효율적으로 조절할 수 있어 기능성 chitooligosaccharide의 고순도 제조에 적합하다. 특히 chitinase, chitobiase, 그리고 chitosanase를 효소별로 분리정제하여 기질 특이적으로 반응시키고, 효소와 기질의 첨가 비율을 조절하여, 효소 반응 조건을 최적화할 경우 고순도의 chitooligosaccharide를 효율적으로 생산할 수 있게 된다. 따라서 chitin으로부터 chitooligosaccharide를 주로 절단하는 chitinase를 분리하는 균주의 확보가 요망된다.

본 연구에서는 기능성 chitooligosaccharide 생산에 적합한 chitinase를 분리하는 미생물을 선별하고 생산된 chitinase를 분리정제하여 그 특성을 살펴보기 위하여 자연계로부터 chitooligosaccharide 생산에 적합한 chitinase를 분리하는 균주를 새로이 분리하여 동정하였으며, 분리 균주의 효소 생산에 적합한 배양조건을 확립하였다. 또한 분리된 chitinase를 분리정제하고, 효소적 특성을 chitooligosaccharide 생산의 관점에서 검토하였다. 이는 효소법에 의한 chitooligosaccharides의 생산을 위한 기초 연구로서 그 활용이 기대된다.

재료 및 방법

선별 배지 및 Colloidal Chitin의 제조

사용 배지는 0.5%의 colloidal chitin을 함유하고 있는 mineral 배지로서 그 조성은 colloidal chitin 5.0 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l, KH_2PO_4 0.3 g/l, K_2HPO_4 0.7 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 mg/l, $ZnSO_4$ 0.001 mg/l, 그리고 $MnCl_2$ 0.001 mg/l 되도록 만들었고, pH 7.0이 되도록 조정하였다. 기질로 사용된 colloidal chitin은 Jeuniaux 등의 방법에 따라 제조하였다(13).

Chitinase 분리 균주의 선별

토양, 목피 그리고 하수등에서 채취한 시료를 살균 식염수에 적당량 희석하고 상등액을 분리배지에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. Colloidal chitin을 분해시켜 투명환을 형성하는 chitinase 분리 균주를 1차 선별하고, 이를 재배양하여 chitinase 분비능이 높은 균주 수 십종을 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주를 액체 배양하여 chitinase 활성을 측정하여 효소

활성이 가장 높고 효소 반응 생성물의 조성중 N-acetyl-D-glucosamine 중합도가 1~6 사이에 속하는 chitooligosaccharides를 많이 생산하는 균주를 최종 선별하였다.

균주의 동정

선별된 균주는 Introduction to Food-Borne Fungi (14), Compendium of Soil Fungi(15) 및 The Genus *Aspergillus*(16) 등에 제시된 방법에 따라 동정하였다.

균주의 배양 및 조효소액

상기 선별배지의 탄소원과 질소원의 종류, pH를 3에서 11, 그리고 배양온도를 0°C에서 60°C까지 변화시키면서 4일간 배양하여 효소생산에 적합한 배양조건을 검토하였다. 또한 2.5l fermenter(Korea Fermenter Co.)에서 통기량 1.0 vvm, 37°C, 300 rpm, 그리고 pH 7.0의 조건으로 6일간 배양하면서 균주의 생육과 chitinase 분비 양상을 검토하였다. 조효소액은 37°C에서 4일간 배양한 후 균체를 제거시킨 상등액에 sodium nitrate를 0.1% 농도로 첨가하여 냉장 보관하며 조효소액으로 사용하였다.

Chitinase의 분리 정제

먼저 조효소액중의 chitinase를 75% ammonium sulfate 처리 및 colloidal chitin에 대한 chitinase의 흡착을 이용하여 1차 분리하고, ultrafilter(Amicon Co.)로 농축시킨 후, 이를 DEAE-cellulose anion exchange chromatography column(2.9×30 cm)에 흡착시키고, 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 유속 30 ml/hr로 흘려 washing 하였다. 흡착된 효소는 NaCl 농도를 0에서 0.5 M로 점차 변화시키면서 용출시켰다. Ion exchange chromatography로 분획시킨 시료중 chitinase 활성을 갖는 시료를 ultrafilter로 농축하고 dialysis 한 후, Sephacryl S-100 HR(Pharmacia Co.) gel filtration column(1.5×75 cm)에 가하고 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 유속 30 ml/hr로 용출시켜 효소를 분획하였다.

단백질 정량 및 Chitinase 분자량 측정

단백질 정량은 280 nm에서의 흡광도 또는 Bradford 법(17)으로 측정하였으며, 분리된 chitinase의 확인 및 분자량은 10% polyacrylamide gel을 사용하여 Protein Method(18)에 제시된 방법에 따라 결정하였다. 이때 사용된 표준물질은 carbonic anhydrase (29 KDa), albumin egg(45 KDa), albumin bovine(66 KDa), phosphorylase B(97.4 KDa), β -galactosidase

(116 KDa), myosin(205 KDa)(Sigma Co.)이었다.

환원당 측정법에 의한 Chitinase 활성 측정

시료 1 ml을 colloidal chitin solution(5 mg/ml, dry base) 1 ml과 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml의 혼합액에 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시킨 후 가열하여 반응을 중지시키고, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액 중의 총 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 chitinase 활성을 결정하였으며, 효소 활성 1 unit는 1시간 동안 1 μ mol의 N-acetyl-D-glucosamine을 생성시키는 효소량으로 하였다.

Chitobiase 활성 측정

시료 0.1 ml을 0.005 M *p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine 0.2 ml과 0.05 M Tris-malate buffer(pH 7.0) 0.7 ml의 혼합액에 첨가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.25 M Na₂CO₃ 용액 2 ml을 첨가하여 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정함으로써 chitobiase의 활성을 결정하였으며, 효소 활성 1 unit는 상기의 반응에 의해 1분에 1 μ mol의 *p*-nitrophenol을 생성시키는 효소량으로 하였다(18).

HPLC를 이용한 Chitooligosaccharide의 분석

효소반응 생성물의 chitooligosaccharide 분석은 HPLC를 사용하였으며 Cosmosil 5NH₂ column(Nacalai Co.)을 사용하여, acetonitrile과 물(65 : 35)로 용출한 후 RI detector로 검정하였다. 표준 시료는 N-acetyl-D-glucosamine, chitobiose, chitotriose(이상 Sigma Co.), chitotetraose, chitopentaose, chitoheptaose(이상 Seikagaku Co.)를 사용하였다.

결과 및 고찰

Chitinase 분비균주의 선별 및 동정

균주의 선별 Colloidal chitin을 첨가한 선별 배지에서 투명환을 형성하는 chitinase 분비균주 수백주를 1차적으로 선별하고, 이들을 재배양하여 투명환이 큰 균주 수십종을 선별한 후, 액체배지에서 4일간 배양하여 배양액중의 chitinase 활성과 배양액을 colloidal chitin에 반응시킨 후 반응생성물을 HPLC로 분석하여 chitinase 활성이 높고, N-acetyl-D-glucosamine의 중합도가 1~6의 범위에 있는 chitooligosaccharides를 주로 생산하는 chitinase 분비 균주 1주를 최종 선별하였다.

균주의 동정 Fig. 1은 최종 분리균주에 의해 고체

분리배지상에 형성된 투명환의 모양과 최종 선별균주를 Czapek's agar 배지에서 30°C에서 2주간 block plate slide culture 한 후 위상차 현미경과 주사 전자현미경으로 관찰한 사진을 나타내고 있다. 또한 Fig. 1에서 관찰된 균주 특성을 균주 및 포자의 형태 그리고 포자 배열상태로 분류하여 Table 1에 나타내었다.

선별균주는 균사에 격막이 있고, conidiophore의 끝부분이 팽윤된 vesicle을 형성하고, 그 둘레에 한 층의 phialide가 있으며, phialide를 따라 20~24개에 이르는 긴 사슬의 conidia가 있음이 관찰되었다. 또한 포자 모양은 구형으로 크기는 1.94~2.42 μ m였고, 표면은 돌기나 가시 같은 구조가 없는 smooth type이었다.

또한 생리 및 생화학적 특성을 규명코저 Pridham과 Gottlieb의 방법에 따른 각종 당 이용성(19), 그리고 gelatin, casein, starch, 및 lipid 분해능, 질산염 환원력, urease 및 catalase 유무 등을 조사한 결과이다. 선별균주는 glucose, galactose, maltose, sucrose 등의 당들을 아주 잘 이용하였고, lactose를 제외한 arabinose, cellulose, inositol, mannitol, raffinose, rhamnose, sorbitol, xylose 등의 당들도 잘 이용함으로써 폭 넓은 당 이용성을 나타내었다. 또한 casein, starch 및 lipid 분해와 nitrate 환원능, urease 및 catalase test에 대해서 positive 반응을 나타내었다.

이러한 형태, 생리 및 생화학적 특성들로 미루어 보아 선별된 chitinase 분비 균주는 *Aspergillus fumigatus*와 유사한 특징을 보였으므로 균주를 *Aspergillus fumigatus* JC-19로 명명하였다.

Aspergillus fumigatus JC-19의 배양조건과 Chitinase 생산

탄소원과 질소원의 영향 Table 2는 *Aspergillus fumigatus* JC-19의 생육과 chitinase의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토코저 colloidal chitin이 0.5% 포함된 기본배지에 각종 탄소원을 농도가 1%(w/v) 되도록 보충 첨가하여 colloidal chitin만을 첨가한 경우와 chitinase 생산성을 비교한 결과이다. 또한 colloidal chitin을 첨가하지 않은 nutrient rich medium에서도 배양하여 비교하였다.

Colloidal chitin을 첨가하지 않은 복합배지에서는 chitinase 활성이 거의 없어 chitin에 의해서 유도되는 inducible 형의 효소임을 알 수 있었다. 이와 같은 chitinase의 유도생산은 Reynolds(20), Berger와 Reynolds(21)의 *Streptomyces griseus*, Skujins 등(22)의 *Streptomyces* sp. 2B, 그리고 Yabuki 등(18)의 *Aeromonas*

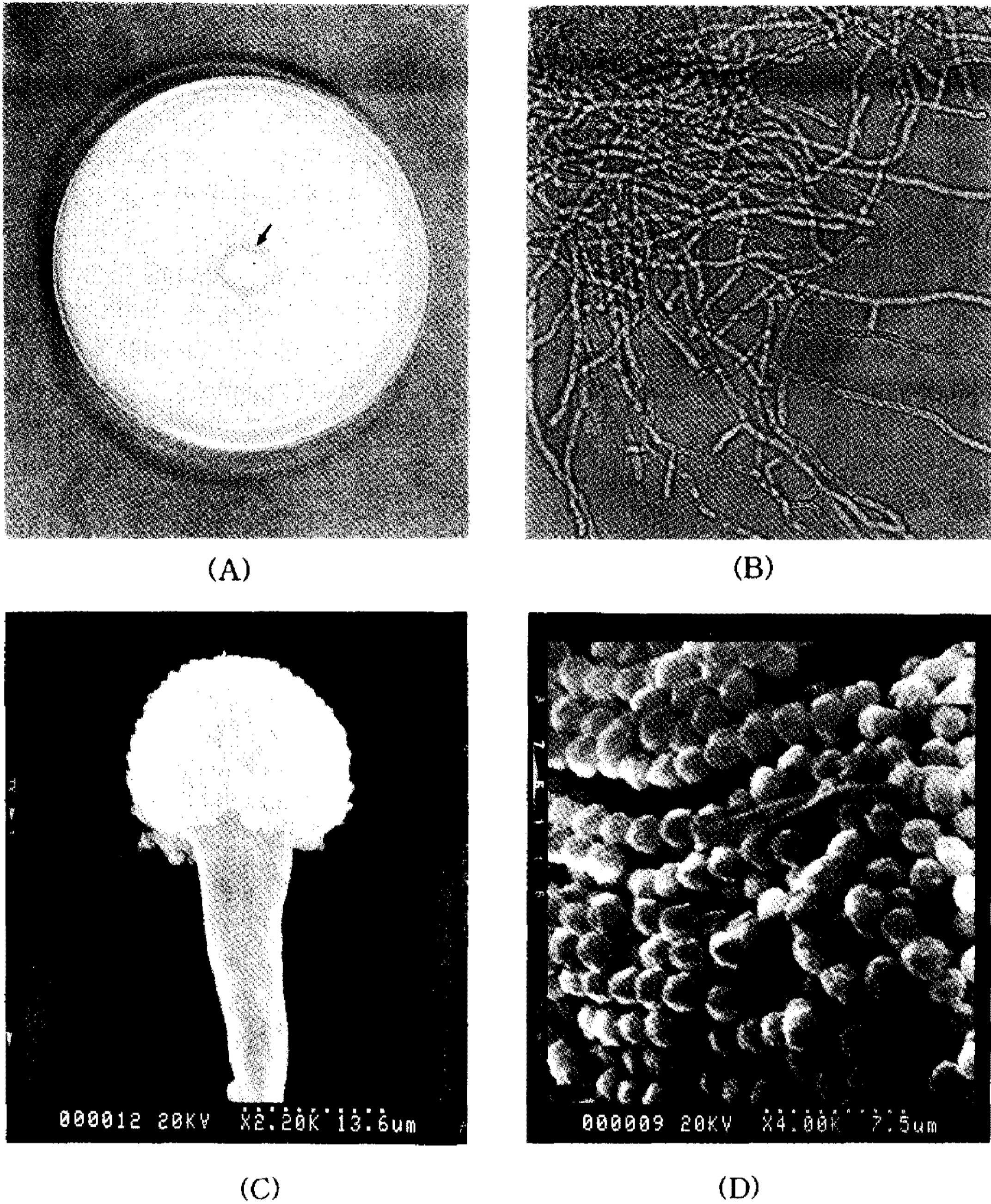


Fig. 1. Phase contrast and scanning electronmicroscopic photographs of selected strain JC-19. (A) Clear zone formed by chitinase (✓); Indicate clear zone, (B) Mycelia (×1,000), (C) Vesicle and phialides (×2,200), (D) Conidia chains (×4,000). Cultured at 30°C for 2 weeks on Czapek's agar.

*hydrophila*의 chitinase 생산에서 관찰된 바 있다.
 또한 탄소원의 보충첨가는 raffinose의 경우 효소 생산이 약간 증가하였을 뿐 그 외의 경우에는 모두 효소생산을 저해하였으며 chitinolytic 효소의 최종산물인 N-acetyl-D-glucosamine을 첨가한 경우에도 저해를 보여 효소생산이 34.7%로 감소되었는데 이는 최종 분해산물에 의한 feed back repression 현상에 의한 것으로 생각된다.
 또한 기본 배지에 각종 질소원들을 2%씩 첨가하여

37°C 에서 4일간 배양한 후 chitinase 생산에 미치는 영향을 살펴 본 결과는 Table 3과 같았으며, NaNO₃를 질소원으로 첨가했을 때 생성 효소의 역가가 46.2% 가량 증가되었을 뿐 그 외의 질소원들은 chitinase 생산을 저해하였음을 보아 질소원 역시 chitinase의 유도 및 발현에 중요한 저해 인자로 작용함을 알 수 있었다.
 초기 pH 및 배양온도 Fig. 2는 초기 배지의 pH와 온도의 영향을 검토코져 pH를 3에서 11까지, 배양온

Table 1. Morphological characteristics of the selected strain JC-19

Characteristics		
Colonies*	Color	Gray-green
	Reverse color	Pale
	Size	50 mm
	Texture	Smooth
	Growth	Rapidly spreading
	Conidial head	Color
	Shape	Columnar
Conidiophores	Color	Pale brown
	Marking	Thin, smooth
Vesicles	Color	Pale brown
	Shape	Spatulate
	Size	16.74 μ m
Phialides	Color	Pale brown
	Size	4.19 μ m
Conidia	Color	Gray-green
	Shape	Gray-green
	Size	1.94~2.42 μ m
	Marking	Smooth

*Growth at 30°C for 4 days on PDA agar.

도를 0°C 에서 60°C 로 변화시키면서 chitinase의 생산을 살펴 본 결과를 나타내고 있다. 최적 pH는 7.0의 중성균으로, pH 4이하와 8이상에서는 효소생산이 심한 저해를 받았으며, 배양온도는 37°C 일 때 가장 높은 효소 생산을 나타내었다.

Aspergillus fumigatus JC-19의 생육 및 Chitinase 분비 양상

Aspergillus fumigatus JC-19를 2.5l fermenter에서 colloidal chitin을 5 g/l 포함한 기본 mineral 배지를 이용하여 6일간 장기 배양하면서 배양시간에 따른 균주의 성장과 chitinase의 생산 양상을 살펴 본 결과는 Fig. 3과 같다. 배양조건은 온도 37°C, 공기 공급량 1.0 vvm, 교반 속도 300 rpm, 그리고 pH 7.0이었다.

Aspergillus fumigatus JC-19는 72에서 108시간 사이에 균체 성장이 가장 활발하였고, 96시간 때 최대치를 나타냈으며 그 이후에는 균체의 성장이 급속히 감소하였다. 한편 chitinase 생산은 초기 24시간까지는 미미하였고 그 후에는 균체생육과 유사한 양상으로 생성되었으며 최대 역가는 0.46 unit/ml으로 108 시간 후에 얻어졌으며, 그 이후부터는 효소 활성이 급속히 감소하였다.

Table 2. Effect of supplemental addition of various carbon sources on chitinase production of *Aspergillus fumigatus* JC-19

Carbon sources	Relative activity (%)
Control*	100.0
Arabinose	61.2
Fructose	18.0
Galactose	46.4
Glucose	55.9
Inositol	26.5
Lactose	5.0
Maltose	83.4
Raffinose	101.8
Rhamnose	7.1
Sorbitol	2.65
Starch	16.4
Sucrose	30.9
Xylose	30.0
N-acetyl-D-glucosamine	65.3
NR**	0.0

1% Carbon sources were added in basal medium containing 0.5% colloidal chitin, respectively, cultured at 37°C for 4 days. *Control: basal medium containing 0.5% colloidal chitin, **NR: nutrient rich medium without colloidal chitin

Table 3. Effect of supplemental addition of various nitrogen sources on chitinase production of *Aspergillus fumigatus* JC-19

Nitrogen sources	Relative activity (%)
Control*	100.0
NaNO ₃	146.2
NH ₄ Cl	89.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.7
Casein	0.0
Tryptone	0.0
Yeast extract	0.0
NH ₄ HCO ₃	2.1
NH ₄ H ₂ PO ₄	47.8
CH ₃ COONH ₄	0.0
Urea	35.4

2% Nitrogen sources were added in basal medium respectively, cultured at 37°C for 4 days. *Control: basal medium without any additional nitrogen source

Aspergillus fumigatus JC-19가 분비하는 Chitinase의 분리 정제

분리정제 *Aspergillus fumigatus* JC-19의 배양액을 75% ammonium sulfate로 침전시켜 조효소를 얻고, 농축 조효소액중의 chitinase를 colloidal chitin에 대한

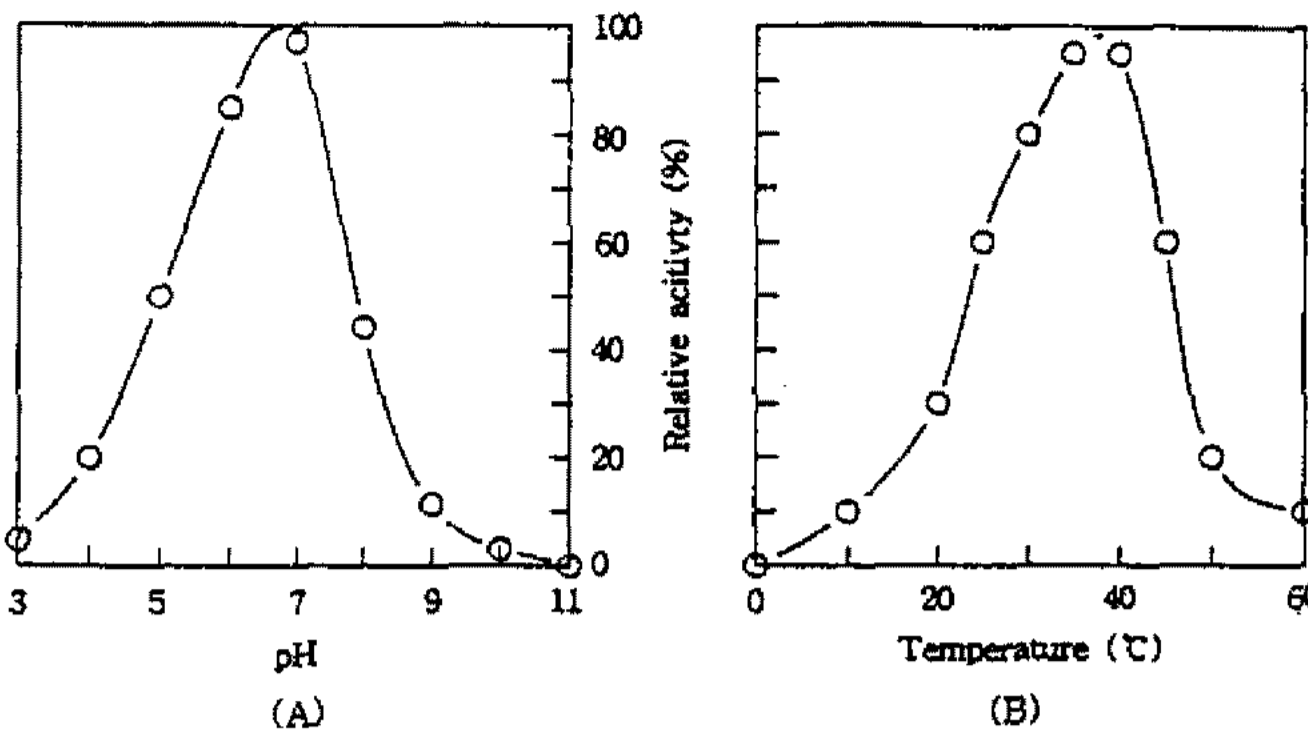


Fig. 2. Effect of initial pH (A) and cultivation temperature (B) on chitinase production of *Aspergillus fumigatus* JC-19.

Cultured at 37°C for 4 days in basal medium.

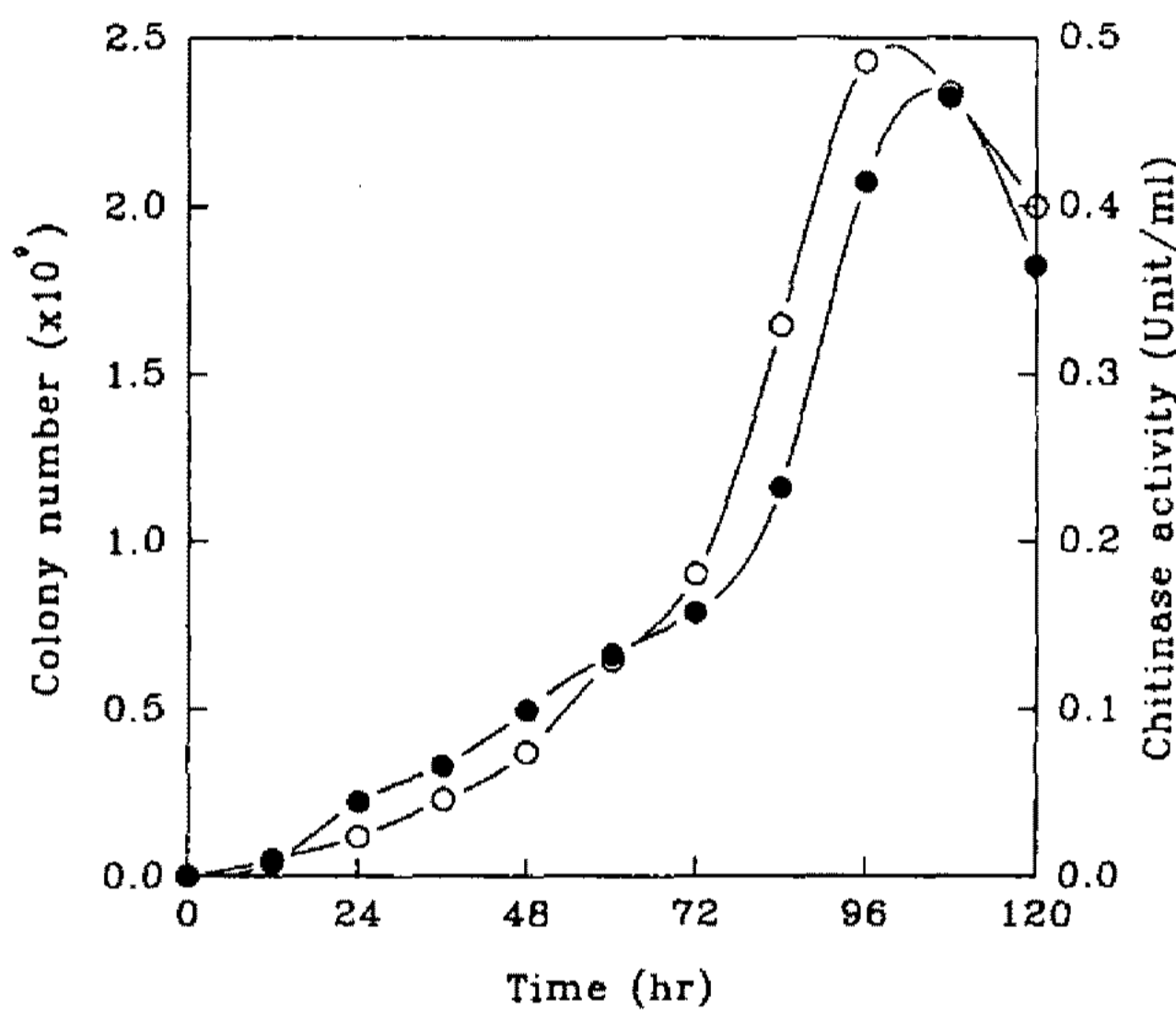


Fig. 3. Growth and chitinase production patterns of *Aspergillus fumigatus* JC-19 in fermenter culture.

Cultured at 37°C, pH 7.0 for 6 days in 2.5 l fermenter. ○: Cell growth, ●: Enzyme production

기질 친화성을 이용하여 흡착시켜 분리하였다. 흡착된 chitinase로 colloidal chitin을 완전 분해시켜 chitinase를 회수한 후, DEAE-cellulose anion exchange chromatography에 흡착시키고 NaCl의 농도 gradient를 이용하여 효소를 용출시켜 각 분획중의 단백질량과 chitinase 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

이들 중 chitinase 활성을 지닌 120~180 사이의 분획들을 모아서 ultrafilter로 농축한 후 dialysis 시켜 127.7 units/ml의 효소액 2 ml을 얻었다. 상기의 효소액을 Sephacryl S-100 HR column chromatography에 가한 후 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)로 용출시켜 분자량에 따라 분획하고, 각 분획중의 단백질량과 chitinase 및 chitobiase 활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. Chitobiase 활성은 분획 25에서 30사이에서,

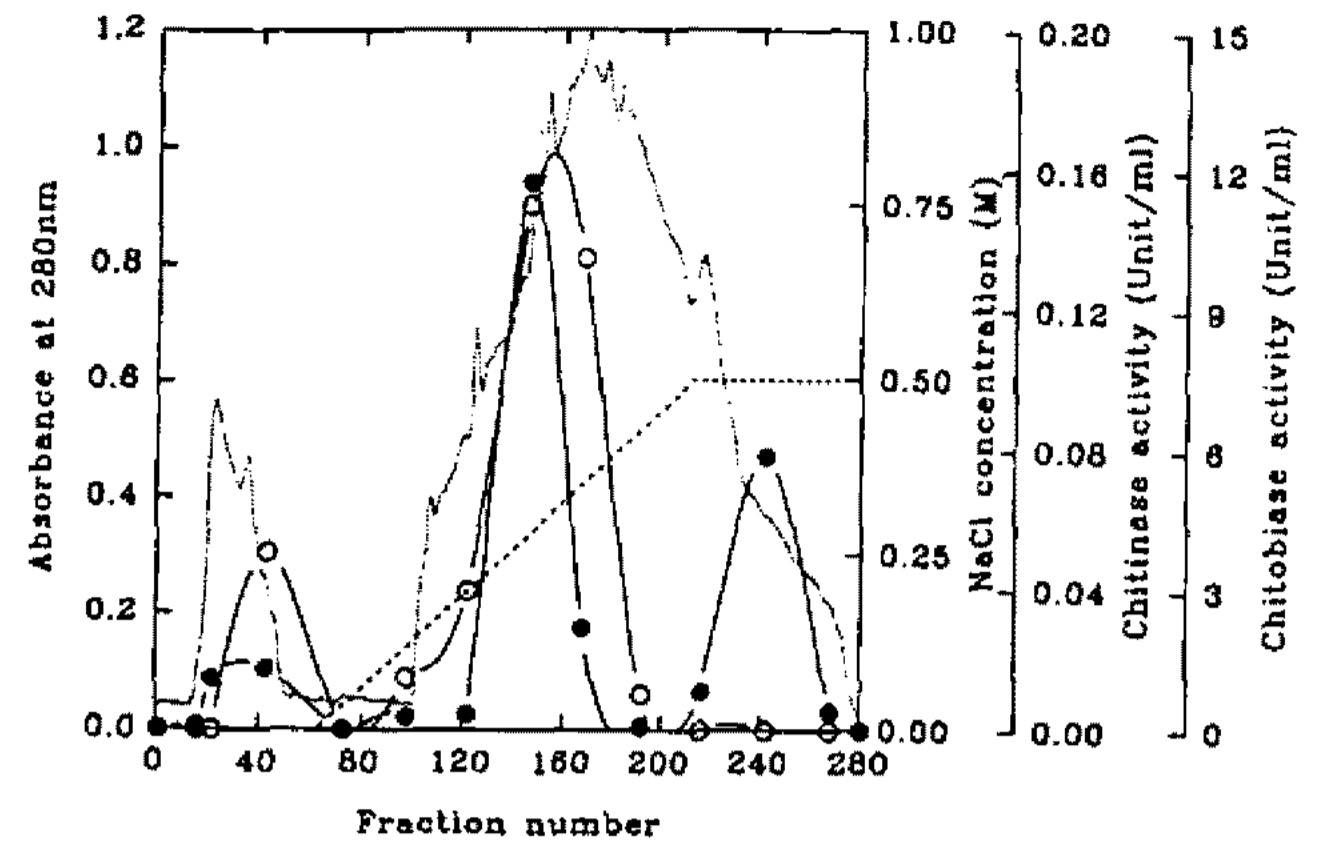


Fig. 4. Eluted protein and chitinase activity of each fraction of DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

Protein was adsorbed with pH 6.2 sodium phosphate washing buffer, and eluted by the same buffer with 0~0.5 M NaCl gradient at flow rate 30 ml/hr.

○: Chitinase activity, ○: Chitobiase activity, ···: Protein concentration, --: NaCl concentration

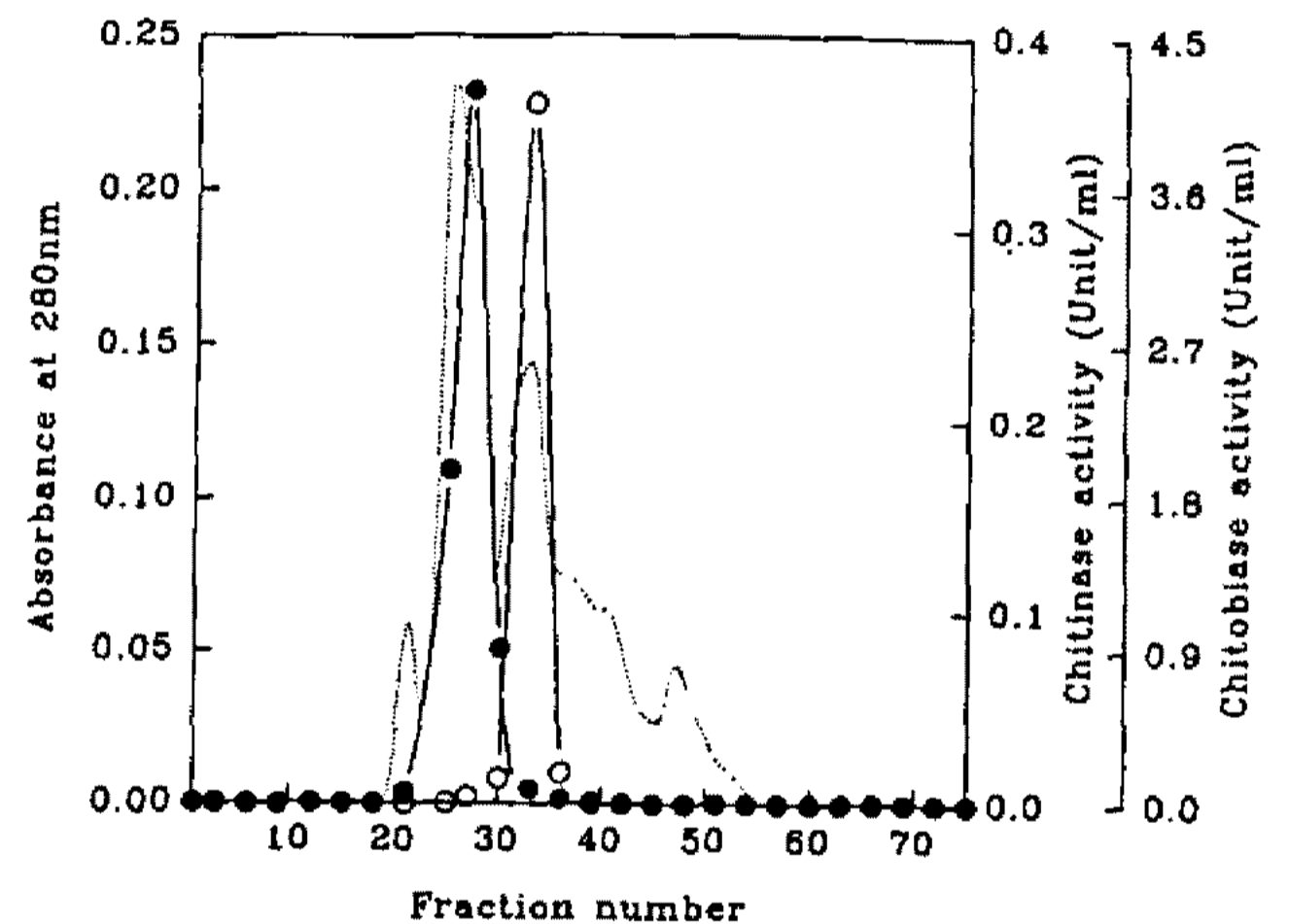


Fig. 5. Eluted protein and chitinase activity of each fraction of Sephacryl S-100 HR gel chromatography.

Protein was eluted with 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at flow rate 30 ml/hr.

○: Chitinase activity, ●: Chitobiase activity, ···: Protein concentration

chitinase 활성은 분획 30에서 35사이에서 각각 나타났다. 또한 Table 4는 상기 분리과정의 각 단계별로 정제된 효소액의 단백질량과 비활성 및 정제율을 조효소액을 기준으로 비교하여 나타내었다.

분자량 분리된 chitinase의 정제정도 및 분자량을 확인하기 위하여 chitinase 활성을 나타내는 32에서 34분획을 SDS-PAGE로 확인한 결과는 Fig. 6과 같으며 chitinase로 확인된 단일 band가 강하게 나타났으며, 분자량은 50 KDa으로 추정되었다.

Table 4. Summary of the purification of the chitinase from *Aspergillus fumigatus* JC-19

Purification steps	Total protein (mg)*	Total activity (unit)**	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Culture broth	387.64	1380.0	3.56	—	100.0
Ammonium sulfate fractionation	116.21	1104.0	9.5	2.67	80.0
Affinity adsorption	23.0	483.0	21.0	5.90	35.0
DEAE-cellulose chromatography	7.98	255.4	32.0	8.99	18.5
Sephacryl S-100 HR gel filtration	3.08	182.16	59.14	16.61	13.2

*Protein concentration determined by the method of Bradford *et al.*

**One unit of enzyme is determined as producing 1 μ mol of N-acetyl-D-glucosamine per 1 hour at 37°C.

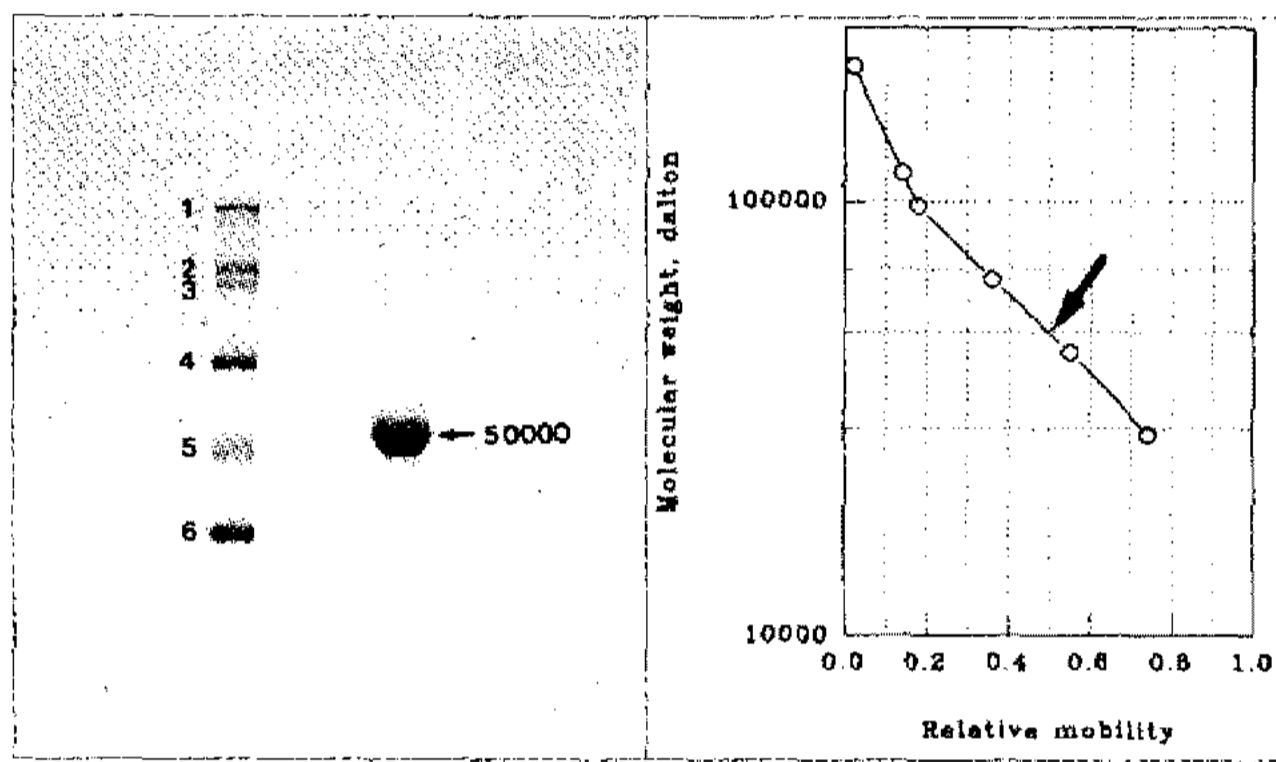


Fig. 6. SDS-PAGE band and determination of molecular weight of purified chitinase.

Electrophoresis was performed on SDS-10% polyacrylamide gel and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250.

Standard markers (KDa): 1; myosin (205), 2; β -galactosidase (116), 3; phosphorylase B (97.4), 4; albumin bovine (66), 5; albumin egg (45), 6; carbonic anhydrase (29)

분리 정제된 Chitinase의 효소적 특성

pH 및 온도의 영향 pH를 3에서 11로 변화시키면서 분리 효소의 pH 안정성과 최적 반응 pH를 검토하였고, 또한 온도를 20°C에서 60°C로 변화시키면서 온도 안정성과 최적 반응 온도를 검토한 결과는 Fig. 7과 같다. 분리효소는 pH 4에서 9까지의 비교적 넓은 pH 범위에서 안정하였으며, 최적 pH는 중성인 7.0이었다. 분리효소는 반응 온도 20°C에서 60°C 범위에서 안정하였으며, 최적 반응 온도는 50°C로서 비교적 고온에서 최대의 활성을 나타내었다.

금속이온 및 Chemical의 영향 각종 금속이온들과 chemical들이 chitinase의 활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 5와 같다. Fe^{2+} , I_2 및 *p*-chloromercuri-benzene(*p*-CMB)는 chitinase의 반응을 심하게 저해하였으며 Ca^{2+} 및 L-cystein은 효소활성을 증가시킬 수 있었다.

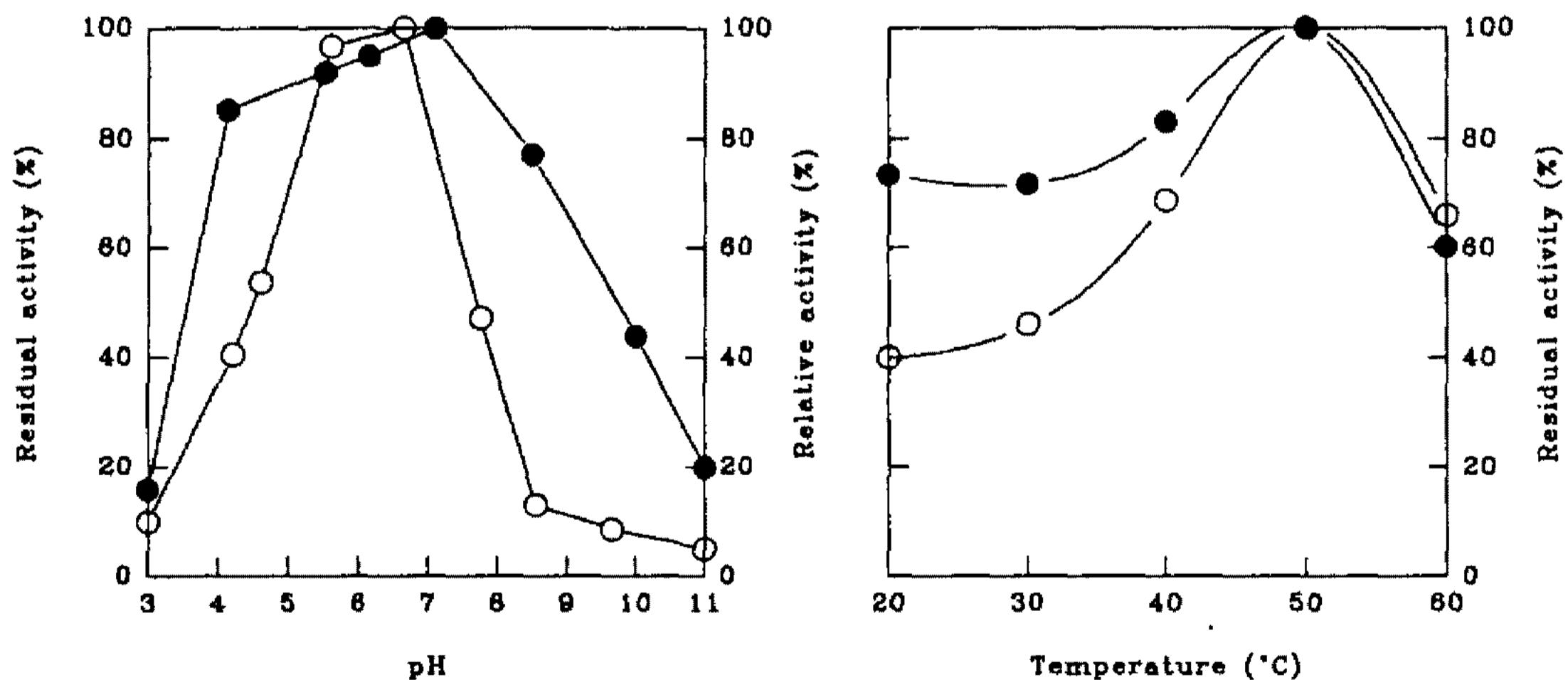


Fig. 7. Effect of pH and temperature on chitinase activity.

Optimum pH: 37°C, sodium acetate buffer of pH 3~5, sodium phosphate buffer of pH 5~8, Tris-HCl buffer of pH 8~10, and Glycine-NaOH buffer of pH 10~11, Optimum temperature : 20~60°C, pH 7.0

Enzyme stability: standing enzyme for 1 hr without substrate.

(A) ○: Optimum pH, ●: pH stability, (B) ○: Optimum temperature, ●: temperature stability

Table 5. Effect of chemical and metal agents on chitinase activity

Chemical and metal agents*	Relative activity (%)
None	100.0
NaCl	100.0
AgNO ₃	11.8
CaCl ₂	131.0
MgCl ₂	98.0
CoCl ₂	133.0
MnCl ₂	55.9
FeSO ₄	14.1
FeCl ₃	0.0
ZnCl ₂	65.7
BaCl ₂	48.0
CuCl ₂	53.0
I ₂	0.0
EDTA	35.3
p-CMB**	5.9
SDS	66.7
L-Cystein	137.0

*Added concentration of chemical and metal agents was 10 mM, **p-CMB was p-chloromercuribenzoate

Aspergillus fumigatus JC-19이 분비하는 Chitinase 반응특성

조효소액 *Aspergillus fumigatus* JC-19가 분비하는 chitinase의 반응 특성을 검토하기 위하여 배양 조효소액을 효소원으로 사용하여 2%(w/v)의 colloidal chitin을 50°C, pH 7.0에서 50시간 가수분해시키면서 생성된 chitooligosaccharides의 중합도의 변화를 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 8과 같다.

위에서와 같이 반응초기에는 중합도가 1~6인 chitooligosaccharides가 주로 생성되었으나 시간이 경과할수록 단량체인 N-acetyl-D-glucosamine이 크게 증가하였고, 반응 24시간 후의 N-acetyl-D-glucosamine의 농도는 13 g/l였고 그 이후에는 당 생성이 둔화되었다. 따라서 상기효소는 다량의 chitooligosaccharides를 반응초기에 생산하는 chitooligosaccharides 제조에 적합한 endo 형 chitinase를 포함하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 반응이 경과하면서 단량체가 급속히 증가되는 것으로 보아 chitobiase 활성도 일부 포함하고 있음을 알 수 있었다.

정제 Chitinase Fig. 9에서와 같이 반응초기에는 중합도가 1~6인 chitooligosaccharides가 주로 생성되었고 시간이 지날수록 1~3인 중합도를 지닌 chitooligosaccharides의 양이 증가되었다. 그러나 조효소액에 의한 효소반응에 비해서는 중합도가 1~6인

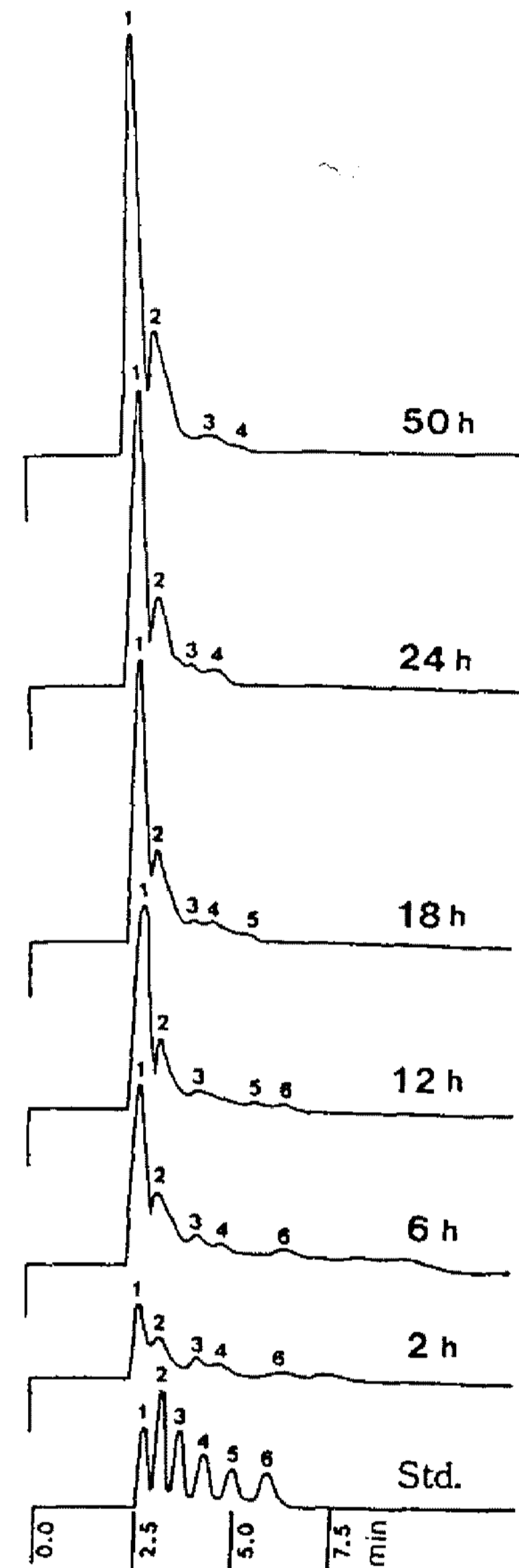


Fig. 8. Changes of chitooligosaccharides profile produced by crude chitinase from *Aspergillus fumigatus* JC-19 during hydrolysis reaction.

Reaction was performed at 50°C, pH 7.0 with colloidal chitin of 20 g/l and crude chitinase of 0.5 unit/ml for 50 hr.

Std. represents standard solution containing 1; N-acetyl-D-glucosamine, 2; chitobiose, 3; chitotriose, 4; chitotetraose, 5; chitopentose, and 6; chitohexaose of 5 mg/ml.

chitooligosaccharides의 함량이 증가되었음을 알 수 있었다.

따라서 2~6의 중합도를 지닌 chitooligosaccharides를 선별적으로 생산하기 위해서는 효소 반응시간을 조절함과 동시에 효소를 분리정제하여 endo 형 chitinase 활성이 높은 효소액을 사용할 필요가 있으며, 조효소액중의 chitobiase를 제거할 필요가 있다. 또한 chitooligosaccharides 생산에 적합한 endo 형

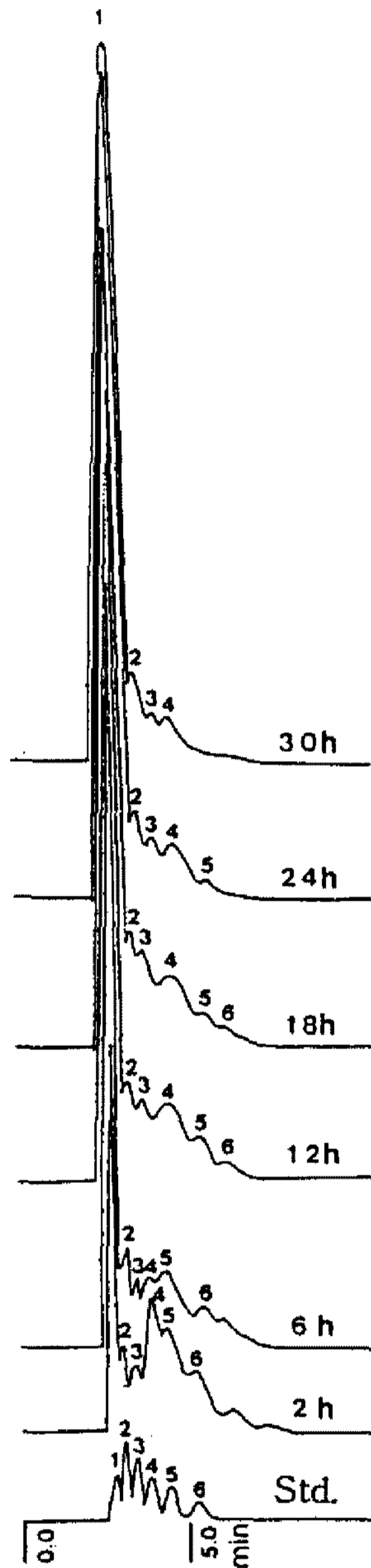


Fig. 9. Changes of chitooligosaccharides profile produced by purified chitinase from *Aspergillus fumigatus* JC-19 during hydrolysis.

Reaction was performed at 50°C, pH 7.0 with colloidal chitin of 20 g/l and purified chitinase of 0.4 unit/ml for 30 hr.

Std. represents standard solution containing 1; N-acetyl-D-glucosamine, 2; chitobiose, 3; chitotriose, 4; chitotetraose, 5; chitopentaose, and 6; chitohexaose of 5 mg/ml.

효소의 분리정제와 함께 이를 이용한 효소반응에 관한 연구가 요망된다.

요 약

기능성 chitooligosaccharides 생산에 적합한 chiti-

nase를 분리하는 균주를 토양으로부터 새로이 분리하였으며, 형태, 생리, 생화학, 그리고 배양학적 특성을 관찰하여 *Aspergillus fumigatus* JC-19로 동정하였다. *Aspergillus fumigatus* JC-19이 분리하는 chitinase는 chitin에 의하여 촉진되는 inducible 형 효소로서, 균체의 생장은 4일째 가장 높았고 효소 생산은 배양 5일째 0.46 unit/ml로 최대였고 배양 최적 pH 및 온도는 7.0, 37°C 였다. 분리 균주가 분리하는 chitinase를 ammonium sulfate 침전, colloidal chitin에의 흡착, 그리고 각종 column chromatography를 이용하여 분리정제하고 SDS-PAGE로 확인하였으며, 분자량은 50 KDa이었다. 분리된 chitinase는 chitobiase 활성이 비교적 적은 endo 형 chitinase로서 최적 pH 및 온도는 각각 7.0과 50°C 였다. 또한 분리 chitinase의 chitin 분해양상을 관찰한 결과 조효소액은 단량체인 N-acetyl-D-glucosamine을 주로 생성한 반면 정제된 chitinase의 경우는 1~6의 중합도를 지닌 chitooligosaccharides를 주로 생성하였다.

참고문헌

1. 이용현, 정의준. 1994. Chitin/Chitosan 유도체의 구조, 분해효소, 이용 및 주류 산업에의 활용. 주류공업 43: 73-85.
2. 日本 フツドケミカル. 1986. 最後の Biomass, Chitin and Chitosan, Pp. 11. 技報堂出版, 東京.
3. Muzzarelli, R.A.A. 1977. Chitin, Pp. 57-58, Pergamon Press, Oxford.
4. Usui, T., Y. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai, and Y. Ishido. 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Norcardia orientalis*. Biochim. Biophys. Acta. 923: 302-309.
5. Takayanagi, 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.
6. Jeuniaux, C. 1959. Recherches sur les chitinases. 2. Purification de la chitinase d'un Streptomyces et séparation électrophoretique de principes chitinolytiques distincts. Arch. Int. Physiol. Biochem. 67: 597.
7. Flach, J., P.E. Pilet, and P. Jollés. 1992. What's new in chitinase research? Experientia 48: 701-716.
8. Shaikh, S.A. and M.V. Deshpande. 1993. Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. World J. Microbiol. Biotechnol. 9: 468-475.
9. Pedraza-Reyes, M. and E. Lopez-Romero. 1989. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*.

- J. Gen. Microbiol.* **135**: 211-218.
10. Wood, W.A. and S.T. Kellogg. 1988. Biomass Pt B, lignin, pectin and chitin. *Meth. Enzymol.* **161**: 403-530.
 11. Mauch, F., L.A. Hadwinger, and T. Boller. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response. *Plant Physiol.* **87**: 325-333.
 12. 平野茂博, 憧口泰之, 島原健三. 1987. *Food Chemical, Chitin/Chitosan の 科学*. 食品化学新聞社, 東京.
 13. Jeuniaux, C. 1966. Chitinases. *Meth. Enzymol.* **8**: 644-650.
 14. Samson, R.A. and E. Van Reenen-Hoekstra. 1988. Introduction to *Food-Borne Fungi*. 3rd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands.
 15. Domsch, K.H., W. Gams, and T.H. Anderson. 1980. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London.
 16. Raper, K.E. and D.I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 17. Daniel, M.B. and J.E. Stuart. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York.
 18. Yabuki, M., K. Mizushima, T. Amatatsu, A. Ando, T. Fujii, M. Shimada, and M. Yamashita. 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* ssp. *Anaerogenes* A52. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 25-38.
 19. Pridham, T.G. and D. Gottlieb. 1948. The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as aids for species determination. *J. Bacteriol.* **56**: 107-114.
 20. Reynolds, D.M. 1954. Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp. *J. Gen. Microbiol.* **11**: 150-159.
 21. Berger, L.R. and D.M. Reynolds. 1958. Chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **29**: 522-534.
 22. Skujins, J., A. Pukite, and A.D. Melaren. 1970. Chitinase of *Streptomyces* sp. purification and properties. *Enzymologia* **39**: 353-370.

(Received 2 December 1994)