

## 키티나제에 의한 키토올리고당의 생성활성 규명과 올리고당의 당별 분리 생산

†김 광

동아대학교 재료금속화학공학부 화학공학과  
(접수 : 2002. 1. 23., 게재승인 : 2002. 2. 22.)

### Action Patterns of Chitinase and Separations of Chitooligosaccharides Produced by Chitinolytic Hydrolysis

Kwang Kim†

Division of Metallurgical and Chemical Engineering College of Engineering, Dong-A University  
(Received : 2002. 1. 23., Accepted : 2002. 2. 22.)

*N*-acetyl-*D*-glucosamine oligosaccharides [(GlcNAc)<sub>n</sub>] whose degree of polymerization is from one to ten (n=1-10) were fractionated by column chromatography on CM-Sephadex. Electro dialysis from a partially deacetylated chitosan hydrolysate prepared crudely with the *N*-acetyl-*D*-glucosaminidase(chitinase) and exo-*N,N'*-diacetylchito-biohydrolase(chitobiase) of *Serratia marcescens* QM B1466. Reducing sugar compositions and sequences of the *N*-acetyl-glucosamine oligosaccharides were identified by *N*-acetylation, randomly cleavage with chitinase and exo-splitting with chitobiase. *N*-acetyl-glucosamine heterochitooligosaccharides with glucosamine oligosaccharides ; (GlcN)<sub>n</sub> at the reducing end residues together with (GlcN)<sub>1</sub> ~ (GlcN)<sub>4</sub> were detected. Separation was accomplished by prefractionation with elution by 0 to 1.0 M NaCl gradient solution. (GlcNAc)<sub>1</sub>=4.25%, (GlcNAc)<sub>2</sub>=4.49%, (GlcNAc)<sub>3</sub>=11.1%, (GlcNAc)<sub>4</sub>=2.5%, (GlcNAc)<sub>5</sub>=0.64%, (GlcNAc)<sub>6</sub>=2.12% and (GlcNAc)<sub>7</sub>=1.21%, respectively, were crystallized after electro dialysis and lyophilization. Each *N*-acetyl-*D*-glucosamine oligosaccharides content were detected by HPLC.

**Key Words** : chitinase and chitobiase , *N*-acetyl-*D*-glucosamine chitooligosaccharides, partially deacetylated chitosan

#### 서 론

키틴은 *N*-아세틸-*D*-글루코사민 잔당, (GlcNAc)<sub>n</sub>, 이 β-1,4 결합한 선상다량 고분자로서 *D*-글루코사민 잔당, (GlcN)<sub>n</sub>, 이 일부 포함되어 있다. 이것은 동물체내에서 생분해 될 수 있고 항원성 고분자가 거의 없다(1). 키토산은 탈아세틸화물에서 β-1,4 폴리-*D*-글루코사민으로 정의된다. 키틴은 효소 키티나제에 의해 임의로 가수 분해되어 저분자량을 갖는 가용성 중간체로 생성되며 이 중간체에 포함된 *N*-아세틸-*D*-글루코사민 2당인 키토바이오스는 β-*N,N'*-디아세틸 글루코사미니 다제(키토바이아제)에 의하여 *N*-아세틸-*D*-글루코사민 단위로 최종 가수분해된다. 키티나제는 키틴 구성단위인 *N*-아세틸-*D*-글루코사민 사이의 β-1,4-글루코스의 결합을 임의로 분해하고, 키토텍스트린도 가수분해한다. 개껍질로부터 정제된 키틴은 단량체 단위가 2-아세트아미도-2-디옥시-*D*-글루코

피라노스 결합을 하고 있으며 이것은 *endo*-키티나제에 의하여 저분자량의 *N*-아세틸-*D*-글루코사민의 가용성 2량체 및 다량체를 생산한다. 이 두 효소는 키티나제 이원성계로 작용되며 수용성과 완충용액성을 갖는 저분자량인 올리고당이 키틴을 기질로하여 가수분해에 의해 *N*-아세틸-*D*-글루코사민을 제조하고 또 키토산을 가수분해하여 *D*-글루코사민으로 각각 제조된다. 이들 고유특성은 탈아세틸화(2)와 카르복시메틸화(3)와 같이 가장 간단한 화학수식에 의해 생화학적 소재로의 응용이 연구되고 있다. 키틴의 키토올리고당, 키토산의 올리고당, 및 부분 아세틸화에 의해 제조된 키틴과 키토산의 헤테로 키토올리고당, (GlcNAc-GlcN)<sub>n</sub> (n<10), 은 생화학분야 뿐만 아니라 생명공학분야, 제약학, 약리학분야와 농업분야에 이르기까지 폭넓게 응용되고 있다(4-7).

*N*-아세틸-*D*-글루코사민의 키토올리고당은 키틴 다당류의 천연폴리머를 효소 키티나제의 가수분해에 의하여 생산하고, *D*-글루코사민-올리고머의 생성은 키토산 다당류를 키토사나제에 의한 효소 가수분해로 제조될 수 있다. 또한 키틴을 키토산으로 변환하는 효소로서 키틴디아세틸라제(chitin deacetylase)가 있다. 헤테로-키토-올리고당은 키티나제 또는 키토사나제의 활성형태에 의존되어 부분적 탈아세틸화 키토산(partially deacetylated chitosan : PDC)과 같은 여러 가지 탈아세틸화 정

†Corresponding Author : Department of chemical engineering, college of engineering, Dong-A University, 840, Hadan-Dong, Saha-Ku, Pusan, 604-714, Korea  
Tel : +82-51-200-7724, Fax : +82-51-20-7728  
E-mail : kkim@mail.donga.ac.kr

도에 따라서 생산될 수 있다. 헤테로-키토-올리고당들은 *N*-아세틸화에 의하여 *N*-아세틸-*D*-글루코사민-키토-올리고당으로 간단히 전환시킬 수 있다. 이렇게 제조된 *N*-아세틸-*D*-글루코사민-키토-올리고당은 특히 의약품원료에 주목을 끌고 있다 (4,8). 이들은 항 균 및 항 곰팡이 활성제(7), 면역 강화제(1), 라이소자임 활성 강화제(9), 엘리시터(10,11) 등의 특성을 갖고 있다. 6당 이상의 키토-올리고당들은 매우 낮은 농도에서도 높은 활성을 갖고 있으며(12), 그들의 높은 생물학적 활성은 면역체계의 강화와 항암성(13)이 탁월하며, 콜레스테롤 강화에도 강한 효험이 있음이 증명되었다(6,11). 이들 유용성 키토-올리고당들은 화학적 방법(14)과 효소적 방법(15)으로 제조되고 있다. 효소적 방법은 생체적합성이 우수하여 부작용이 없고 천연적 소재로부터 가수분해 활성이 높은 효소를 선택함으로써 최적조건의 효소적 분해반응으로 정밀하게 제조됨이 바람직하다. 키티나제는 구조적으로 세 형태의 헬릭스로 구성된 불변의 핵심과 절단될 수 있는 기질결합으로 형성된 세 가지를 갖는  $\beta$ -쉬트를 갖고 있다. 이 키티나제는 불용성 기질과도 반응을 일으킬 수 있으며 효소 키티나제가 결정성 키틴분자에 확산하여 효소-기질 복합체를 형성하고 이들 사이에서 결정성키틴의 고체표면에 흡착이 이루어진 후에야 촉매화 분해반응을 일으킬 수 있다. 이러한 효소반응 중에서, 키티나제가 키틴 표면의 유용성 사이트에 흡착되는 것은 촉매화 반응을 일으키기 전에 예비적으로 필요한 단계이다. 이러한 속도론적 원인으로 인하여, 키티나제와 키토바이아제는 광범위하게 응용 될 수 있고, 생명공학적인 공정들의 여러 가지 중요한 임무를 담당할 수 있다 또한 세균성 질병들로부터 보호하는 중요한 역할과 키틴성 다당류분해를 포함한 그 외의 공정들도 갖고 있다(16-19). 세균성 균주 *Serratia* 속종에서 *Serratia marcescens*(20-22) QM B1466은 특수하게 키틴 존재 하에서 고도수준의 키틴성 분해효소가 생성됨이 밝혀졌다(약 1 mg/L). 이 효소는 무정형 키틴과 결정성 키틴 두 가지 모두를 가수 분해하는 활성을 갖고 있으며, 특히 결정성 키틴에 대한 활성은 특수공정에서 요구되는 키틴의 처리과정을 줄일 수 있으므로 경제적으로는 매우 매력적이다. 결정성 키틴을 기질로 하여 *S. marcescens* 균주의 고농도 세포발효에 대한 연구와 효소 키티나제와 키토바이아제의 키틴성 소재에 대한 효소적 가수분해 반응을 연구하였다.(23)

본 연구에서는 키틴의 부분탈아세틸화도(75-99%)에 의존되어 변화되는 효소가수분해물의 생성올리고당에 영향을 미치는 키티나제의 기질특이성과 그 작용양식에 대하여 연구하였다. 효소 키티나제의 활성은 불용성의 기질로서 콜로이드 키틴이, 가용성의 기질로서는 글리콜 키틴을 이용하였다. 기질에 따른 효소활성과 효소반응후 유리되는 환원당량을 정량하였다. 또한 *p*-nitrophenyl 유도체나 형광기질도 고감도의 측정법으로서 속도론적량을 구하는데 사용되었다. 목적에 알맞게 생산될 수 있도록 부분적으로 탈아세틸화한 키토산의 여러 기질로부터 효소 반응시킴으로서, *N*-아세틸-*D*-글루코사민-올리고당;(GlcNAc)<sub>1-8</sub> 의 각 올리고당을 분리 추출하여 제조하고 또한 고도로 정밀한 정제된 제품을 얻는데 그 목적을 두었다. 그리고 경제적으로 저렴하게 올리고당을 제조하기 위하여 정제되지않은 효소 키티나제를 직접 반응시켰다.

**Table 1.** Composition for Minimal-Media High-Density Cultures of *S. marcescens*

Component	Concentration [g/L]
Glucose	2.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Buffer component)	6.80
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Buffer component)	2.61
NaCl	10.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.00
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.123
CaCl <sub>2</sub>	0.0147
metal solution*	1.0% [v/v]

\* (in 1 L dH<sub>2</sub>O) : 3.84 g citric acid, 55.6 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 28.7 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 16.9 mg MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2.5 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.5 mg CoCl<sub>2</sub>, 6.2 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

## 재료 및 방법

### *Serratia marcescens* QM B1466 의 배양

*S. marcescens* 균주는 1%(w/v) yeast extract, 2% peptone, 2% glucose 액체배지에 pH 7.0으로 30°C에서 24시간 배양하였다. 탄소원으로서의 glucose 대사작용에 있어서 *E. coli*와 아주 유사하며 증식곡선(세대시간 3시간)도 거의 같은 모양을 나타낸다. 성장-제한 양분에 대한 시험을 위하여 아미노산이나 비타민 또는 인, 황 및 질소원 그리고 Mg, Co, Fe 등과 같은 소량의 금속양분을 첨가하였다. 기본 배지조성의 농도는 glucose 또는 결정성 키틴의 탄소원의 농도에 관계시켜 설정하여 희분배양과 고밀도발효에 함께 적용하였다. Table 1에 배양과 발효에 적합시킨 배지조성을 나타내었다.

키토바이아제를 포함한 키티나제의 효소 생성은 다음의 효소배지에서 배양하였다. 15 g/L 키틴 (practical grade of Sigma Chemical Co.,Ltd.), 0.5 g/L yeast extract, 1.0 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.36 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 의 배지에서 pH는 멸균하기 전에 1M-NaOH로서 8.5-9.0으로 조절하였다. 10 L의 발효기에서 working volume 7 L를 30°C로 발효하였다. 용존산소(DO)는 공기유속 7.5 L/min와 교반속도 200 rpm에 의하여 20-30%로 유지하였으며 소포제로서 2% SIGMA antifoam C를 첨가하였다. 7일 배양후에 8000 rpm 15분간 원심분리한 상층액을 효소용액으로 사용하였다.

### 기질 제조

본 실험실에서 탈아세틸화 공정을 통하여 제조된 75-99%의 부분적으로 탈아세틸화된 키토산을 사용하였으며 분자사슬의 심한 분해를 막기 위하여 증류수에 의한 간헐적 세척으로 중성화시키면서 재탈아세틸화하여 제조하였다. 100%로 탈아세틸화한 키토산은 알칼리 가수분해의 농도 및 온도와 반응시간을 조절함으로써 제조될 수 있었다. 정제된 순수 키틴은 개선된 방법(23)으로 제조되었는데 practical grade의 계첩질을 3시간 동안 볼-밀(ball-mill)하고 실온에서 2% (w/v) KMnO<sub>4</sub> 용액에서 20시간 침적시킨 후 1% (w/v) 옥살산으로 잔존하는 KMnO<sub>4</sub>와 MnO<sub>2</sub> 함량을 세정 및 제거하고 또한 붉은 염산으로 산화된 단백질을 제거하였다.

**키티나제 활성과 환원당 측정**

키티나제 활성은 pH 6.0의 McIlvaine 완충용액에 1.4 mL의 0.2% 글리콜 키티당과 0.1 mL의 효소 용액을 포함하는 반응 혼합물을 37°C에서 15분간 항온 시킨 후 측정하였다. 발색 시약 용액은 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 L에 0.5 g potassium ferricyanide를 용해시켜 제조하였다. 이 제조된 시약 2 mL에 시료용액 1.5 mL를 혼합하고 15분간 끓여 반응을 정지시킨 후 420 nm 흡광도를 측정하였다. 키티나제 활성 1 unit는 1 분간에 환원당 1 mol을 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다. 유리된 환원당의 양은 N-아세틸-D-글루코사민의 표준시약을 사용하고 Schales 법을 수식(25)한 방법으로 측정하였다.

**고성능 액체 크로마토그래피법(HPLC)**

HPLC계는 875-UV/VIS detector (Japan Spectroscopic Co. Ltd.)와 D-2500 Chromato-Integrator (Hitachi Ltd.)를 사용하였다. N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루코사민키티도-올리고머의 환원당은 분당 2.0 mL의 유속으로 아세토니트릴-물의 이동상에서 Radial-PAK Bondapak NH<sub>2</sub>컬럼 (8.0×100 mm, Millipore Co.)을 사용하여 분리하였다. N-아세틸-D-글루코사민 올리고당들은 210 nm의 흡광도에서 측정하였다.

**헤테로 키티올리고당의 N-아세틸화에 의한 N-아세틸-D-글루코사민 올리고당으로의 변환**

부분적으로 탈아세틸화 키티도-올리고당을 Barker *et al.* (26)을 수식한 방법으로 N-아세틸화 하였다.

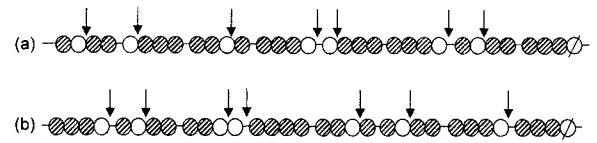
**부분 탈아세틸화 키티산의 효소 키티나제에 의한 가수분해**

효소 키티나제와 키티바이아제 (1.0 unit와 3.48 unit)의 1 mL, 0.1 M 아세트이트 완충용액(pH 6.0) 2 mL, 5 mL의 2% NaN<sub>3</sub> 혼합 용액에 탈아세틸화 키티산(75-99%)를 0.6%로 500 mL를 제조한 효소 반응 혼합물을 37°C에서 48시간 반응시킨 후 5분간 끓임으로서 반응을 정지하였다. 반응 혼합물은 35°C이하에서 감압한 회전 증발기에서 농축시켰으며 전기투석기(Micro Acilyzer G1, Asahikasei kogyo Co., Ltd. Japan)에 의하여 투석하였다. 투석용액은 1 N acetic acid를 가하여 pH 6.0으로 조절하였다.

**결과 및 고찰**

**기질특이성에 따른 *Serratia marcescens* 효소활성 규명**

한국 종균 협회로부터 구입한 *Serratia marcescens* 균주에서 생성시킨 키티나제의 키티산 분해 활성은 콜로이드 키티당을 기질로 사용할 때 0.181 μmol GlcNAc/min/mg enzyme preparation을 분해하였다. 키티산 가수분해율은 탈아세틸화도가 95, 85, 75%에 대하여 각각 0.015, 0.144, 0.163이다. 이것은 역으로 아세틸화도가 증가함에 따라 가수분해속도가 증가하는 것으로 나타냄을 알 수 있다. 그러므로 부분 탈아세틸화키티산을 가용성의 기질로 사용할 때의 가수분해속도와 그 기질에 대한 효소 키티나제의 작용활성의 규명이 요구된다. *S. marcescens*기원의 키티나제의 효소분해 생성물의 분리추출과 정제시험을 행하였다. N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루코사민으로 구성된 부분적으로 탈아세틸화한 키티산(partially



⊗: D-glucosamine(GlcN), ○: N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc), ⊘: Reducing end residue (a) The condition of homogeneous composition between GlcNAc and GlcN (b) The composition is heterogeneous chain-from

**Figure 1.** Speculative representation of the action pattern of chitinase on 75-99% partially deacetylated chitosan. The arrows show the action pattern of chitinase.

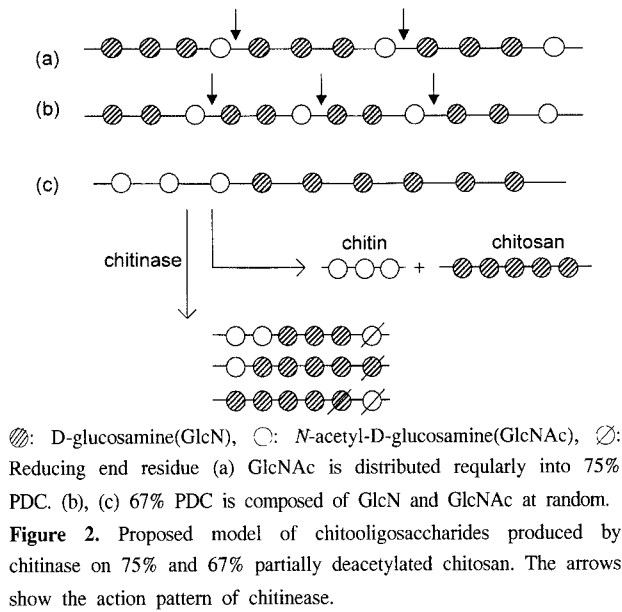
deacetylated chitosan ; PDC)은 온도와 알칼리 농도의 변화에 의존되어 키티를 알칼리 가수분해하여 여러 가지 탈아세틸화도를 갖는 키티산을 제조할 수 있다. 키티올리고당의 정의는 N-아세틸-D-글루코사민 키티올리고당으로 구성된 키티 올리고당과 D-글루코사민 키티 올리고당만을 가진 키티산의 올리고당 및 N-아세틸-D-글루코사민과 D-글루코사민의 올리고당을 함께 가진 헤테로 키티 올리고당으로 구분 지을 수 있다. 부분적으로 탈아세틸화된 키티산을 효소 가수분해하여 제조되는 헤테로 키티올리고머는 GlcNAc와 GlcN가 임의로 분포되게 된다. 그러므로 키티 올리고당의 올리고머로서 탈아세틸화도가 높은 키티산으로된 키티산은 낮은 중합도를 갖는 키티 올리고당으로 분해될 수 있지만 낮은 탈아세틸화도를 가진 키티산으로부터 생성되는 효소 가수분해물은 올리고머들의 중합도가 높은 것들이 많아진다. 반면에 탈아세틸화도가 같은 키티산이 효소 키티나제의 가수분해에 의하여 생성되는 올리고머들은 Figure 1에 예상되는 도식화로서 표현한 바와같이 균일 또는 불균일하게 배열된 당조성에 의존되어 각종 중합도를 갖는 올리고당들이 생성될 수 있다.

Figure 1(a)는 75% 탈아세틸화된 키티산을 기질로 할 때 효소 키티나제가 GlcNAc-GlcNAc사이와 GlcNAc-GlcN사이를 분해하는 활성패턴을 나타내었고 (b)는 불균일 배열된 당조성을 갖는 부분 탈아세틸화 키티산을 기질로 하여 키티나제의 활성패턴이 위와 같음을 표시하고 있다. Figure 2는 75% 탈아세틸화된 키티산과 67% 부분 탈아세틸화된 키티산이 Figure 1의 키티나제 활성패턴에 의하여 생성될 수 있는 헤테로 키티올리고머를 제안적 모델로서 나타낸 것이다. 그림에서 보는바와 같이 환원말단 잔기가 GlcNAc의 단당과 (GlcNAc)<sub>2</sub>의 2당을 함께 가진 올리고당이 생성 분리된다. 이것은 *S. marcescens* 균주에서 생성된 키티바이아제를 포함한 효소 키티나제(27)가 부분탈아세틸화된 키티산과 효소반응하여 GlcNAc-GlcNAc 결합과 GlcNAc-GlcN결합을 절단 가수분해됨을 나타내고 있다.

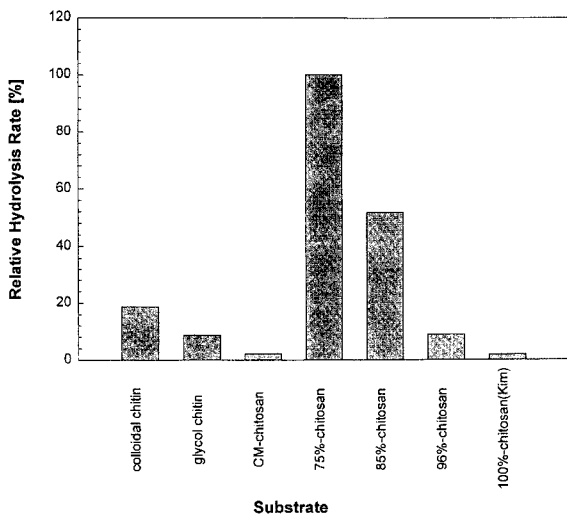
**75-99%의 부분 탈아세틸화한 키티산의 효소 키티나제에 의한 가수분해율**

각종 부분 탈아세틸화 키티산의 기질특이성과 키티나제 활성의 기질로서 잘 이용되는 콜로이드 키티당에 대한 상대 가수분해율의 결과를 Figure 3에 나타내었다.

키티나제와 키티바이아제의 효과적인 활성에 의한 키티올리고당의 Exo-절단은 두효소의 활성비를 알맞게 효소반응 시킴으로서 원하는 기질분해를 유도할 수 있다. 부분 탈아세틸



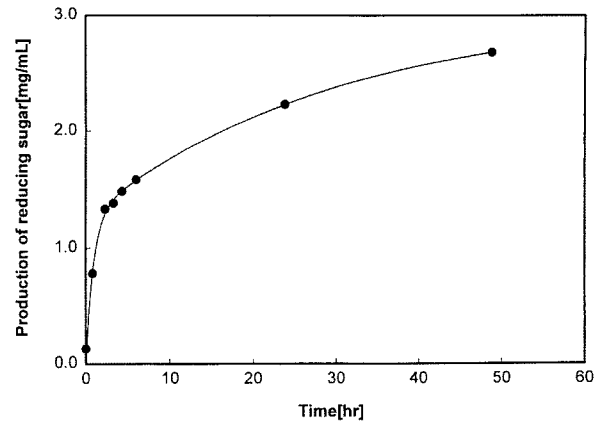
⊙: D-glucosamine(GlcN), ○: N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc), ⊘: Reducing end residue (a) GlcNAc is distributed regularly into 75% PDC. (b), (c) 67% PDC is composed of GlcN and GlcNAc at random. **Figure 2.** Proposed model of chitoooligosaccharides produced by chitinase on 75% and 67% partially deacetylated chitosan. The arrows show the action pattern of chitinase.



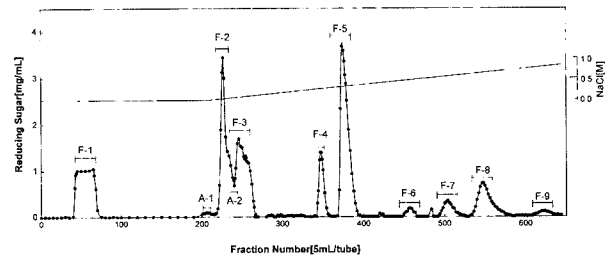
**Figure 3.** The relative hydrolysis rates[%] of *Serratia marcescens* chitinase and chitobiase by substrate specificity.

화 키토산의 탈아세틸화도가 증가할수록 효소 키틴나제와 키토바이아제의 가수분해 속도는 증가되지는 않는다. 이것은 키틴나제가 환원당 말단에 있는 GlcNAc-GlcNAc의 결합과 GlcNAc-GlcN결합 사이만을 절단할 수 있기 때문이다. 효소에 의한 가장 효율적인 키틴분해에 대한 가수분해율은 두 효소의 활성비와 환원당 말단의 GlcNAc-GlcNAc의 결합과 GlcNAc-GlcN결합이 많은 탈아세틸화도를 갖는 부분 탈아세틸화 키토산이 효과적일수 있다. 부분 탈아세틸화 키토산 분자에 내재된 N-아세틸-D-글루코사민 배열이 효소의 가수분해율을 크게 좌우되는 영향을 Figure 3으로부터 보여주고 있다. 이 그림은 75% 탈아세틸화 키토산의 가수분해율을 100으로 보았을 때 상대 가수분해율을 나타낸 것이다.

**키틴나제와 키토바이아제의 효소 가수분해에 의해 생성된 각종 키토올리고당의 분석**  
75-99% 부분 탈아세틸화한 키토산의 키틴나제(1.0 unit/mL)



**Figure 4.** Time course during enzyme reaction [crude chitinase and chitobiase] with 75% deacetylated chitosan



**Figure 5.** CM-Sephadex C-25 column chromatography of heteroooligosaccharides produced in the hydrolysis of 75% partially deacetylated chitosan by chitinase containing chitobiase from *Serratia marcescens* QM B1466 black circle : Reducing sugar, line : NaCl

와 키토바이아제(3.48 unit/mL)에 의한 가수분해에서 생성된 키토올리고당들을 확인하기 위하여 효소 분해 생성물을 CM-Sephadex C-25 컬럼의 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 중합도와 글루코사민 잔기수로서 분리하였다. 전기투석[日本旭化成社製 Micro Acilyzer-G1 및 Aciplex cartridge(AC-220-10)을 사용하였다]된 가수분해 생성물(환원당으로 총 2697 mg)을 0.02 M 아세테이트 완충용액(pH 5.0)으로 평형화시킨 컬럼(2.6×45 cm) 상에서 분리추출시켰다.

Figure 4는 75% 탈아세틸화된 키토산을 기질로 하여 키틴나제와 키토바이아제의 효소 반응 시간에 따라 생성된 혼합 환원당을 측정된 것으로 효소 반응 시간이 48시간에서 최대 환원당 생성량(2.73 mg/mL)을 나타내고 있다. Figure 5는 헤테로 올리고당들의 유출모양을 표시한 것이다. F-1은 미흡착 분획물의 N-아세틸-D-글루코사민의 호모올리고머가 함유된다. A-1을 포함한 F-2이후의 흡착분획물은 N-아세틸글루코사민과 글루코사민이 함유된 헤테로 올리고머가 존재하여 NaCl용액 0-1.0 M까지 선형구배로서 유출시켰다. 각각의 분율은 바(bar)로서 연결시켜 나타내었으며 전기투석기를 통하여 투석한 후에 동결 건조하여 각 시료를 분리 추출 생산하였다. Figure 5와 Figure 6에서 나타낸 바와 같이 A-1은 헤테로 올리고머의 4당이고 A-2는 예외적으로 2당과 3당의 혼합물이다. F-2와 F-5는 Mitsutomi(1996) 등(28)에 의한 예측 이론으로 당배열이 각각 GlcN-(GlcNAc)<sub>2</sub> 결합과 (GlcN)<sub>2</sub>-GlcNAc 결합으로 배열된 3당으로 제안될 수 있다. F-3은 GlcN-GlcNAc 결합의 2당이다. F-4는 4당으로서 GlcN-GlcNAc-

Table 2. Exo-splitting of 75% partially deacetylated chitosan by action of chitinase (1.0 unit/mL ) containing chitobiase( 3.48 unit/mL)

Fraction	Total Volumes (mL)	Total Reducing Suger (mg)	Lyophilized Crystalline (mg)	Yield(%)	Hydrolysis Products
F-1	146	127.5	103.4	3.45	Monomer
A-1	72	3.74	12.8	0.43	Tetramer
F-2	77	134.6	148.9	4.96	Trimer
A-2	29	25.3	41.1	1.37	Dimer + Trimer
F-3	121	134.7	137.2	4.57	Dimer
F-4	58	47.7	66.3	2.21	Tetramer
F-5	106	204.2	235.8	7.86	Trimer
F-6	76	9.88	19.9	0.66	Pentamer + heptamer
F-7	130	23.3	31.7	1.06	Tetramer
F-8	208	63.65	115.2	3.84	Hexamer
F-9	143	9.15	22.6	0.75	Pentamer

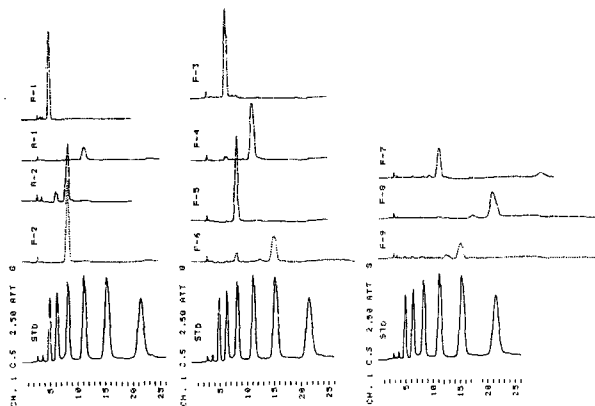


Figure 6. HPLC of 11 fractions obtained from CM-Sephadex C-25 column chromatography. Samples from 11 fractions were loaded separately onto a Radial-PAK  $\mu$ Bondapak NH<sub>2</sub> column (8.0×100 mm). A-1, A-2, and F-1~F-9 were eluted with acetonitrile-water (70:30). The absorbance at 210 nm was monitored with a UV detector. S, standard (GlcNAc)<sub>n</sub> (n=1-6).

GlcN-GlcNAc 결합과 (GlcN)<sub>2</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub> 결합으로 되어 있지만 F-7은 (GlcN)<sub>3</sub>-GlcNAc 결합의 4당과 (GlcN)<sub>2</sub>-(GlcNAc)<sub>3</sub>-(GlcN)<sub>2</sub> 결합의 7당으로서 4당과 7당의 혼합물이다. F-6은 (GlcN)<sub>3</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub> 결합이고 F-9는 (GlcN)<sub>4</sub>-GlcNAc 결합으로 된 F-6과 같은 5당이다. F-8은 중요한 키토헥사오스의 6당 올리고머로서 (GlcN)<sub>4</sub>-(GlcNAc)<sub>2</sub>의 결합으로 D-글루코사민 4단위와 N-아세틸-D-글루코사민 2단위의 헤테로 올리고 6당이다. 이와같이 F-9에 이르는 분획 추출물은 n≤10의 중합도를 갖는 것으로 추정될 수 있다. 각종 키토올리고 다당의 잔기 수는 N-아세틸화 공정을 통하여 헤테로 키토올리고당 잔기 중의 D-글루코사민을 N-아세틸-D-글루코사민으로 변환하여 호모 다당을 제조한 후에 HPLC에 의하여 분석하여 결정하였다.

각 분획 추출 생성물의 HPLC 패턴은 Figure 6에서 보여진 바와 같이 N-아세틸-D-글루코사민 키토올리고 다당을 분리하는데 유용한 방법임을 알 수 있다. 키토 올리고머의 분획 추출 생산은 Figure 5에서 나타난 바와 같이 11개의 피크로서 분리되었다. n=1-7의 중합도를 갖는 올리고당은 피크 A, B 및 F-1에서 F-9까지에 관련시켜 입증되었다. 11개의 피크 추출물의 수율을 Table 2에 표시하였다.

Table 2에 나타난 바와 같이 효소 키틴나제의 가수분해에 의한 헤테로 키토 5당 이하의 수율은 25.51%이고 6당은 2.12%, 4당 및 9당을 포함한 7당의 생성물은 1.21%이다. 그러므로 75-99% 부분 탈아세틸화한 키토산의 효소 키틴나제에 의한 가수분해는 선택적으로 N-아세틸-D-글루코사민의 올리고당을 추출 생산할 수 있다.

고성능 액체크로마토그래피법(HPLC)에 의한 올리고당의 확인 분석

각 분획물에 따른 HPLC 분석에 의한 정성분석을 통하여 올리고당 사슬 구조를 분석하였다. 예로서 GlcNAc-GlcNAc-GlcN-GlcNAc 결합을 갖는 헤테로 올리고당의 경우 이것을  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase로서 분해시키면 N-아세틸글루코사민과 Figure 5의 A-1이 생성된다. Exo- $\beta$ -glucosaminidase가 작용하면 이 피크는 소멸하고 GlcNAc과 GlcN이 생성 된다. 이와 같이 하여 효소분해와 정성분석을 조합하여 올리고당의 구조를 결정할 수 있다. 현재 당질분해효소는 활성 도메인의 구조의 유사성으로부터 약 60개의 family로 분류하는데 자연계의 키틴나제는 크게 두 그룹으로 분류하여 family 18과 family 19로 집약시키고 있다. 여기에서 특징적인 것은 family 18의 키틴나제는 대다수의 생물체에 광범위하게 존재하는 반면에 family 19는 최근까지도 고등식물에서만 발견될 뿐이다. *Serratia marcescens* 키틴나제는 family 18로서 활성 도메인은 8개의 헬릭스와 8개의  $\beta$ 스트랜드로 구성되어 있다. 이 효소는 엔도형의 작용양식에서 부분 N-아세틸키토산을 분해하지만 GlcNAc-GlcNAc 사이와 GlcNAc-GlcN 사이를 절단하고 그의 분해생성물도  $\beta$ 아노머형이다. HPLC분석에 있어서 F-1, 2, 3, 4, 5, 8, 9는 거의 균일하게 확인 될 수가 있으며 키토올리고당의 확인 분석에서는 F-2, 4, 6은 Exo- $\beta$ -glucosaminidase에 의하여 완전히 가수분해되어 (GlcNAc)<sub>2</sub>이 최종산물이 되었고 F-3, 5, 9는 가수분해되어 최종생성물로 GlcNAc로만 검출되었다.

요 약

중합도 n≤10을 갖는 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc)을 미생물 *Serratia marcescens* QM B1466의 최소배지 회분식

발효를 이용하여 키틴 및 키토산을 분해하는 효소 키틴나제 (1.5 unit/mL) [키틴바이아제(3.48 unit/mL)가 포함됨]를 생성시킨다. 효소 반응에 의한 키토올리고당의 생성 활성을 규명하기 위하여 부분적으로 탈아세틸화된 키토산을 효소적 가수분해 반응시킴으로써 생성된 *N*-아세틸-D-글루코사민과 D-글루코사민의 키토올리고당의 생성 패턴을 확인 조사한다. 이 혼합 올리고머로부터 CM-Sephadex의 컬럼 크로마토그래피에 의하여 당별로 분획시켜 추출한 헤테로 키토 올리고당들을 각각 *N*-아세틸화하고 이 최종 생성물을 전기투석 장치로서 정제하여 키토올리고 1-7당을 제조하였다. 부분적으로 탈아세틸화 키토산(환원당으로서 2697 mg/mL)을 효소반응에 의해 생성시킨 키토올리고당은 1당으로서 GlcNAc=4.25%, 2당(GlcNAc)<sub>2</sub>=4.49%, 3당(GlcNAc)<sub>3</sub>=11.1%, 4당(GlcNAc)<sub>4</sub>=2.5%, 5당(GlcNAc)<sub>5</sub>=0.64%, 6당(GlcNAc)<sub>6</sub>=2.12%, 7당(GlcNAc)<sub>7</sub>=1.21%가 각각 제조되었다.

## 감 사

이 논문은 2000학년도 동아대학교 학술연구비(공모과제) 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Nishimura, K., S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, and I. Azuma (1984), Immunological activity of chitin and its derivatives, *Japan Journal Vaccine.*, **2**, 93-99.
- Sannan, T., K. Kurita, and Y. Iwakura (1977), Study on chitin. V. kinetics of deacetylation reaction. *Polymer. Journal*, **9**, 649-651.
- Trujillo, R (1968), Preparation of carboxymethylchitin. *Carbohydr. Res.*, **7**, 483-485.
- Muzzarelli, A. A. Riccardo (1977), Chitin, 255-265, Pergamon, Oxford.
- Muzzarelli, A. A. Riccardo, C. Jeuniaux, and G. W. Gooday (1986), (Eds.), Chitin in Nature and Technology, Plenum, New York, 435-570.
- Skjak-Bræk, G., T. Anthonsen and P. Sandford (1992), (Eds.), Chitin and Chitosan, 51-69, Elsevier Applied Science, London.
- Uchida, Y., M. Izume, and A. Ohtakara (1992), Chitin and Chitosan. Elsevier Applied Science, London, 373-382.
- Muzzarelli, R. A. A. and M. G. Peter (1997), (Eds.), Chitin Handbook, 359-404 Eur.Chitin Sci. Atec. Grottammare. Italy.
- Hirano, S., M. Iwata, K. Yamanaka, H. Tanaka, T. Toda, and H. Inui (1991), Enhancement of serum lysozyme activity by injecting a mixture of chitosan oligosaccharides intravenously in rabbits. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2623-2625.
- Kendra, D. F. and L. A. Hadwiger (1984), Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, **8**, 276-281.
- Roby, D., A. Gadelle, and A. Toppan (1987), Chitin oligosaccharides as Elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, **143**, 885-892.
- Yamada, A., N. Shibuya, O. Kodama, and T. Akatsuka (1993), *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 405-409.
- Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki (1986), Antitumor effect of hexa-*N*-acetylchitohexase and chitohexase. *Carbohydrate Research*, **151**, 403-408.
- Rupley, J. A (1964), The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low-molecular-weight substrates for lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **83**, 245-255
- Izume, M., and A. Ohtakara (1987), Preparation of D-Glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan., *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1189-1191
- Flach, J., P. E. Pilet, and P. Jolles (1992), Whats new in chitinase reserch? *Experientia*, **48**, 701-716.
- Jolles, P., and J. Jolles (1984), What's new in lysozyme research? *Mol. Cell. Biochem.*, **63**, 165-189
- Honda, Y. and T. Fukamizo (1998), Substrate binding subsites of chitinase from barley seeds and lysozyme from goose egg white. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1388**, 53-65.
- Masaki, A., T. Fukamizo, A. Otakara, T. Torikata, K. Hayashi, and T. Imoto (1981), Estimation of rate constants in lysozyme-catalyzed reaction of chitoooligosaccharides. *Journal of Biochem.*, **90**, 1167-1175.
- Monreal, J. and E. T Reese (1969), The chitinase of *serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, **15**, 689-696.
- Reid, J. D., and D. M. Ogyrdziak (1981), Chitinase-overproducing mutant of *serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 664-668.
- Roberts, R. L., and E. Cabib (1982), *Serratia marcescens* chitinase : one-step purification and use for the determination of chitin. *Analytical Biochem.*, **127**, 402-412.
- Kim, K., A. L. Creagh, and C. A. Haynes (1998), Effective production of *N*-achetyl-b-D-glucosamine by *serratia marcescens* using chitinaceous waste. *The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering*, **3**, 71-77.
- Shigemasa, Y., K. Saito, H. Sashiwa, and H. Saimoto (1994), Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int. J. Biol. Macromol.*, **16**, 43-49.
- Imoto, T. and K. Yagishita (1971), A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1154-1156.
- Barker, S. A., Foster, A. B., Stacey, M., and Webber, J. M. : Isolation and properties of oligosaccharides obtained by controlled fragmentation of chitin., *Amino-sugars and related compounds. Part IV.* **451**. 2218-2227 (1958).
- Mitsutomi, M., T. Hata, and T. Kuwahara (1995), Purification and characterization of novel chitinases from *Streptomyces griseus* HUT6037. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **80**, 153-158.
- Mitsutomi, M., M. Ueda, M. Arai, A. Ando, and T. Watanabe (1996), Action patterns of microbial chitinases on partially *N*-acetylated chitosan. *Chitin Enzymology*, **2**, 273-284.