THE KOREAN JOURNAL OF MYCOLOGY
Vo. 31, No 3, p168-174 December 2003
Printed in S. KOREA
Copyright © 2003 by The Korean Society of Mycology

Cordyceps militaris 배양액으로부터 키틴분해효소의 분리 정제 및 그 특성 분석

이강협 · 민태진*
동국대학교 이과대학 화학과

Purification and Characterization of a Chitinase in Culture Media of *Cordyceps militaris*(Linn.) Link.

Kang-Hyeob Lee and Tae-Jin Min*
Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea
(Received November 7, 2003)

ABSTRACT: In this study, *Cordyceps militaris* was grown in a liquid medium containing colloidal chitin. A chitinase was purified from the supernatant of cultured medium by ammonium sulfate fractionation, DEAE-Sephadex A-25 and Sephadex G-50 column chromatography. Optimum temperature and pH of this enzyme were 35°C and 5.5, respectively. The molecular weight of the chitinase was estimated to be 48.5 kDa by SDS-PAGE and its Km value was 0.57 mM. The activity of this enzyme was inhibited by Cu^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, CN^-, ion, and OCN^- maleic anhydride, acetic anhydride or *N*-bromo succinimide, especially strongly inhibited by sodium cyanate for 84.0 percentage. But its activity was slightly stimulated by Mg^{2+} and K^+ ion, respectively. The products formed during hydrolysis of the hexa-*N*-acetylchitohexaose with this enzyme were *N,N'*-diacetylchitobiose and *N,N',N''*-triacetylchitotriose. These results imply that this purified enzyme may be an endo-chitinase.

KEYWORDS: Characterization, *Cordyceps militaris*, Endo-chitinase

동충하초란 포자나 균사가 곤충류의 큐티클층에 침투한 후 그 기주 안에 있는 물질을 영양원으로하여 기주 밖으로 자실체를 형성하는 곤충기생균을 일컫는다(Sung *et al.*, 1993, 1997). 이는 한국을 비롯하여 세계적으로 널리 분포되어 있으며 약 100여속, 800여종이 알려져 있다(Glare and Milner, 1991). 이들 중 자실체를 형성하는 대표적인 속균은 동충하초속(*Cordyceps*)으로 약 300여종이 알려져 있으며 우리나라에는 약 76종이 채집 분류되어 보고되었다(Sung *et al.*, 1997, 1998; Choi *et al.*, 1999).

Chitin은 *N*-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)과 glucosamine이 글리코시드결합으로 불규칙하게 연결되어 있는 생체고분자 물질이다(Coudron *et al.*, 1984; Felse and Panda, 1999; Keyhani and Roseman, 1999; Gokul *et al.*, 2000). 곤충 큐티클층의 약 30%(w/w)가 키틴질이며, 이는 단백질 복합체 형태로 곤충의 외골격을 이루고 곤충기생균 등의 외부 침입에 대한 방어벽 역할을 한다(Blackwell, 1988; Bidochka, and Khachatourians, 1993; Felse and Panda, 2000).

곤충이 균류에 감염될 때는 대부분 표피의 큐티클 층으로부터 시작되는 것으로 알려져 있다(Ferron, 1978; Coudron *et al.*, 1984). Giard(1892)가 처음으로 균류의 감염에 효소의 작용이 필요함을 보고한 이래, 침투 과정에서 균류의 접착과 단백질-키틴 복합체의 분해 등 많은 연구 보고가 있으며(Samsinakova *et al.*, 1971; Smith *et al.*, 1981; Roberts and Cabib, 1982; Smith and Grula, 1983; Coudron *et al.*, 1984; St. Leger *et al.*, 1986), 키틴분해효소는 Bernard(1911)에 의하여 난초의 구근 중에서 확인된 후, *Bacillus* 등의 박테리아, *Aspergillus* 등의 곰팡이 그리고 아몬드나 콩과 같은 고등식물 중 이 효소의 특성과 그 작용 등에 관한 연구가 보고되어 있다(Tracey, 1955; Skujins *et al.*, 1965; Jeuniaux, 1966; Cornelius *et al.*, 1976; Molano *et al.*, 1979; Smith and Grula, 1983; St. Leger *et al.*, 1986a, b; Bidochka and Khachatourians, 1988; Ulhoa and Peberdy, 1991; Havukkala *et al.*, 1993; Robbins *et al.*, 1988; Gokul *et al.*, 2000). 그러나 지금까지 *Cordyceps*속의 동충하초로부터 분리 정제된 키틴분해효소에 관한 보고는 없는 실정이다(Henrissat, 1999).

본 연구에서는 동충하초의 포자가 번데기와 같은 기주에 침투하기 위하여 큐티클 층의 키틴을 분해시키는 chitinase가 생성될 것으로 예측하고, 예비실험을 통한 키틴의 팽윤 현상이 균사에 의한 것인지 단순히 물에 의한 수화 현상인지를 밝히기 위한 기초연구로서 chitinase를 분리 정제, 확인한 다음, 최적 pH, pH 안정성, 최적 온도, 열 안정성, 겉보기 분자량, Km 값, 금속이온, 음이온 및

*Corresponding author <E-mail: tjmin@dongguk.ac.kr>

유기물 효과 그리고 기질 분해 특이성 등을 실험하였기에 이에 보고한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 *Cordyceps militaris* 균주(KACC NO. 50171)는 농촌진흥청으로부터 분양받아 사용하였다. Bacto potato dextrose agar(PDA) 및 yeast extracts는 Difco 제품을 사용하였으며, hexa-*N*-acetylchitohexaose (NAG6)는 Seikagaku사 제품을, *p*-nitrophenol(PNP), *p*-nitrophenyl-*N,N'*-diacetylchitobiose(PNP-NAG2), *p*-nitrophenyl-*N,N',N''*-triacetylchitotriose(PNP-NAG3), *N*-acetyl glucosamine(NAG), *N,N'*-diacetylchitobiose(NAG2) 및 *N,N',N''*-triacetylchitotriose(NAG3), DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-50 및 chitin은 Sigma 제품을, thin-layer chromatography(TLC) plate(silica gel 60, F254)는 Merck 제품을, colloidal chitin은 Hsu와 Lockwood(1975)의 방법에 따라 제조하여 사용하였고, 그 외의 모든 시약은 분석용 특급 시약을 사용하였다.

배지

균사 배양용 액체 배지는 Roberts와 Cabib(1982)의 방법을 인용하여 탄소원으로 1% colloidal chitin을 첨가한 변형 HM배지(*l*당 yeast ext. 3 g, hyponex 3 g, 1% colloidal chitin(dry w/v))를 사용하였다.

동충하초 균사의 배양

변형 HM배지 8 *l*를 고압수증기 멸균(autoclave; Johnsam Co., model JS-AC-60)한 후 PDA 배지에서 배양한 *C. militaris* 균사 30절편을 접종하고, 13일 동안 배양기(Biostat E, B. Braun) 중에서 배양하였다. 배양 기간 동안 0.1 M HCl과 0.1 M NaOH 수용액을 사용하여 pH 5.5로 유지하였으며, 온도는 21.5°C, 배양액의 교반속도는 40~60 rpm으로 하였다.

단백질양과 chitinase의 양이 최대로 증가하는 시간을 알기 위하여 배양하는 동안 매일 일정 시간에 배양액 20 *ml*를 취하여 Warburg-Christian법과 Park과 Johnson (1949)의 방법으로 단백질 양 과 환원당을 각각 정량하여 chtinase 활성도 변화를 측정하였다.

Chitinase 분리 정제

배양액 7.8 *l*를 5,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액 7.45 *l*를 취한 후 황산암모늄으로 60% 포화시키고 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, 이 상층액에 다시 황산암모늄을 가하여 80% 포화시킨 후 원심분리하여 얻은 단백질 침전물을 0.02 M 인산 완충용액(pH 6.2)으로 용해시키고, 이를 같은 완충용액으로 3일 동안 투석(Dialysis sacks, M.W>12,000, Sigma Inc.)하여 황산암모늄을 제거하고, ultrafiltration stirred cell(Amicon Inc., model 8400)을 이용하여 농축한 후 DEAE-Sephadex A-25 column(2.5×25 cm)에 loading하고 0.02 M 인산완충용액(pH 6.2) 1 *l*와 0.8 M의 NaCl이 포함된 같은 완충용액 1 *l*로 선형 농도 기울기 크로마토그래피하였다. 이때 매 분당 0.8 *ml*의 유속으로 5 *ml*씩 분취하였다. 활성 분획을 따로 모아 같은 방법으로 투석한 다음, 농축하여 1차 정제된 chitinase 용액을 얻었으며, 이를 Sephadex G-50 column(2.6×38 cm)에 loading하여 0.02 M 인산 완충용액(pH 6.2)으로 겔 여과하였다. 이때 매 분당 0.8 *ml*의 유속으로 3 *ml*씩 분취하였다. 활성 분획을 따로 모아 같은 방법으로 재크로마토그래피한 다음, 농축하여 최종적으로 정제된 이 효소 용액 36 *ml*를 얻었다. 이를 7.0% SDS-polyacrylamide gel 전기이동(SDS-PAGE)으로 정제되었음을 확인하여 사용하였다.

Chitinase 활성도 측정

이 효소의 활성도 측정은 Park과 Johnson 방법(1949)을 인용하여 효소 용액 0.2 *ml*에 기질로 colloidal chitin 현탁액을 정확히 1 *ml*를 가하여 35°C 교반 항온조에서 30분 동안 반응시킨 다음 250°C oil bath 중에서 5분 동안 정치하여 반응을 정지시킨 후 syringe 여과(Iso-Disc Filters N-25-4 Nylon, 25 mm×0.45 μm, Supelco Co.)하고 반응여액 1 *ml*에 50 mM sodium carbonate와 10 mM potassium cyanide의 혼합용액과 1.5 mM ferricyanide 용액을 각각 1 *ml*씩 가한 다음 100°C 물중탕에서 15분간 반응시키고 이에 0.05 N 황산 용액에 용해시킨 3 mM ammonium ferric sulfate 용액 5 *ml*를 가하여 실온에서 15분간 정치한 다음 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 환원당의 양은 NAG 표준 검량곡선에 의하여 산출하였다. 이 효소의 활성도 단위는 pH 5.5, 35°C에서 매분 당 1 μg의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1단위로 하였다.

단백질 정량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법을 인용하여 bovine serum albumin(BSA) 표준 검량곡선에 의하여 산출하였다.

겉보기 분자량 측정

이 효소의 분자량은 Hames의 방법(1981)에 따라 7.5% 겔을 사용하여 SDS-PAGE하여 측정하였다. 이때 표준 단백질은 pepsin(M.W. 29,000), egg albumin(M.W. 45,000), bovine serum albumin(M.W. 66,000) 및 β-amylase (M.W. 150,000) (Sigma Co.) 등을 사용하였다.

최적 pH, 최적 온도 및 그 안정성 측정

최적 pH는 0.05 M의 시트르산 완충용액과 0.05 M의 인산 완충용액을 사용하여 3.0에서 8.0까지 pH를 각각 변화시켜 활성도 변화를 측정하였다. 최적 온도는 최적 pH

하에서 15°C에서 50°C까지 온도를 각각 변화시켜 그 활성도를 측정하였다. pH 안정성은 0.05 M의 시트르산 완충용액, 0.05 M의 인산 완충용액 및 0.05 M Tris-HCl 완충용액을 사용하여 pH 2.5에서 9.5까지 pH를 각각 변화시켜 이에 효소 용액 0.2 *ml*를 가하여 30분 동안 전처리한 다음, 위와 같은 방법으로 pH 안정성을 측정하였다. 이 효소의 열안정성은 효소 용액을 10°C에서 60°C까지 온도를 각각 변화시켜 효소 용액 0.2 *ml*를 가하여 30분 동안 열처리한 다음, 최적 pH 및 최적 온도 하에서 이 효소의 활성도를 측정하였다.

양이온, 음이온 및 유기화합물 효과 측정

이 효소 용액 0.2 *ml*에 금속이온으로 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, $HgSO_4$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 및 K_2SO_4, 음이온으로 Na_2CO_3, Na_2SO_4 및 NaCN 이온을 각각 10 mM씩 가하여 5분 동안 전처리한 다음 최적 조건 하에서 활성도 변화를 측정하였다. 그리고 효소 단백질의 아미노산 잔기와 선택적으로 반응하는 sodium cyanate(Stark, 1988), maleic anhydride(Butler and Hartley, 1988), acetic anhydride(Riordan and Vallee, 1988) 및 *N*-bromo succinimide(Spande and Witkop, 1988)를 각각 1 mM씩 가하여 같은 방법으로 활성도 변화를 측정하였다.

Km 값

Km 값은 이 효소의 최적 조건 하에서 기질인 NAG6의 농도를 0.1에서 10.0 mM까지 변화시켜 이 효소 용액 0.2 *ml*를 각각 가하여 위와 같은 방법으로 그 활성도를 측정한 다음 Lineweaver-Burk double reciprocal plot하여 결정하였다.

기질 분해 특이성 측정

기질로 농도가 5 mg/*ml*인 NAG6, PNP-NAG2 및 PNP-NAG3의 각 수용액에 효소 용액 0.1 *ml*를 각각 가하여 최적 조건 하에서 위와 같은 방법으로 반응시킨 다음, syringe 여과하여 분해 생성물을 TLC로 확인하였다. 이때 표준 물질로 PNP, NAG, NAG2, 및 NAG3를 사용하였고, 전개 용매로 butanol : pyridine : water(4.3 : 3.0 : 2.7 v/v)의 혼합용매를, 그리고 발색제로 황산 : 에탄올(1 : 9, v/v)의 황산용액을 사용하였다.

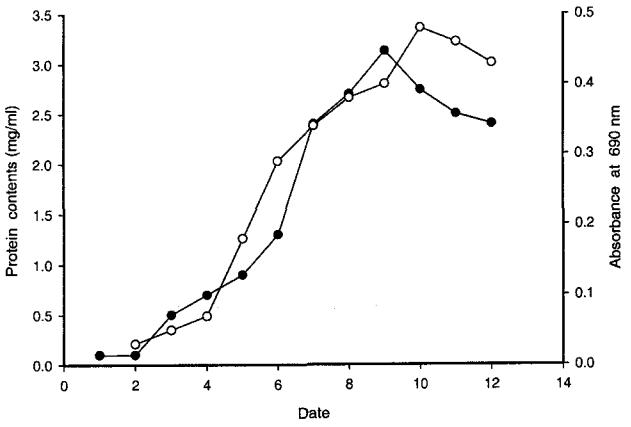

Fig. 1. The change of chitinase activity (○—○) and contents of protein (●—●) in culture media during the growth of *C. militaris*. Colloidal chitin hydrolysis activity was measured by absorbance at 690 nm.

결과 및 고찰

동충하초 균사 배양

균사 배양 시간에 따른 배양액 중 단백질의 양과 chitinase의 활성도 변화를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 단백질의 양은 배양 9일까지 크게 증가하다가 점차 감소하는 경향을 보였으나, 이 효소 활성도는 10일까지 증가하다가 점차 감소하는 경향을 보여, 이 효소는 배양 9일과 10일 사이에 증가하는 것으로 사려된다. 이와 같은 결과는 St. Leger 등(1986)이 *Metarhizium anisopliae*의 배양액 중 chitinase 활성도는 10일째에 가장 크게 증가한 다음 점차 감소한다는 보고와 일치하였다. 그러나 *Trichoderma harzianum*의 배양액 중 그 활성도가 4일째에 가장 크게 증가하였다는 결과(Ulhoa and Peberdy, 1991)와는 서로 상이하였다.

Chitinase의 분리 정제

배양액 중 정제 과정에 따른 이 효소의 활성도 변화는 Table 1과 같다. 이 표에서 보는 바와 같이 배양액의 비활성도는 7.02 단위였으나, 황산암모늄 분별 침전, 이온 교환 크로마토그래피 그리고 Sephadex G-50 겔 여과하여 얻은 이 효소의 비활성도는 627.78 단위로, 89.4배 정제되었음을 알 수 있었다.

Table 1. Purification steps for a chitinase from culture media of *C. militaris*

Purification step	Total volume (*ml*)	Total activity (U[b])	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Culture filtrate	7450	60,154	8567.5	7.02	0	0
$(NH_4)_2SO_4$[a]	126	47,605	389.0	122.38	17.4	79.2
DEAE-Sephadex A-25	215	32,095	91.3	351.53	50.1	53.4
Sephadex G-50	36	14,690	23.4	627.78	89.4	24.4

[a]$(NH_4)_2SO_4$ fractionation was collected from 60% to 80% saturation.
[b]Unit : One unit of activity was defined as an amount of enzyme that released 1 μg of reducing sugar per min. at 35°C, pH 5.5.

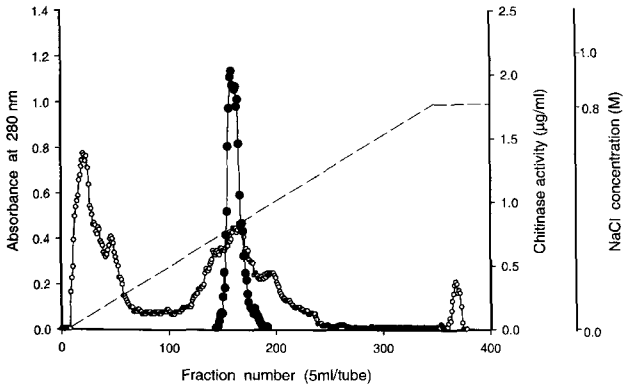

Fig. 2. DEAE Sephadex A-25 ion-exchange column chromatography of the chitinase in culture media of *Cordyceps militaris*. The column was eluted with linear gradient of 0~0.8 M NaCl in 0.02 M phosphate buffer (pH 6.0). Protein contents : ○—○, chitinase activity : ●—●.

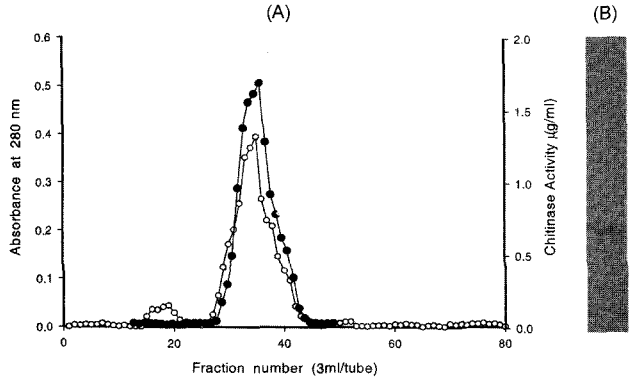

Fig. 3. (A) Sephadex G-50 Gel filtration column chromatography of the chitinase in culture media of *Cordyceps militaris*. Elution buffer : 0.05 M phosphate buffer(pH 6.0) Protein contents : ○—○, chitinase activity : ●–●. (B) SDS-PAGE pattern of chitinase from culture media of *C. militaris*. Electrophoresis was carried out using 7.5% separating gel at 4 mA per gel for 2 hours 30 min. Protein pattern was stained with 0.1%. Coomassie brilliant blue R-250 and then destained with 30% methanol soln. contained 10% acetic acid.

이때 DEAE-Sephadex A-25 이온 교환 크로마토그래피한 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 이 효소는 이온 강도가 0.35 M에서 0.45 M 사이에서 용출됨을 알 수 있었다. 또한 Sephadex G-50 겔 여과하여 얻은 결과는 Fig. 3(a)와 같고, 이 활성분획을 따로 모아 재크로마토그래피하여 순수 정제하였다. 정제된 효소 단백질을 SDS-PAGE한 결과는 Fig. 3(a)와 같고 단일 밴드를 보여 순수 정제되었음을 확인하였다.

겉보기 분자량

이 효소의 겉보기 분자량을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 이 효소의 겉보기 분자량

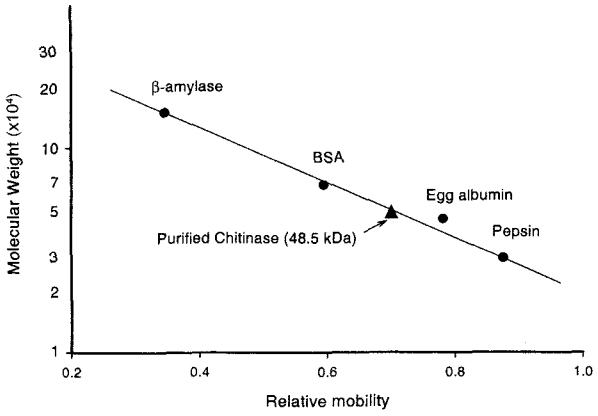

Fig. 4. Assay of apparent molecular weight of the chitinase in culture media of *Cordyceps militaris* by SDS-PAGE. Marker protein : β-amylase(mw 150 kDa), Bovine serum albumin(mw 66 kDa), Egg albumin(mw 45 kDa), Pepsin (mw 29 kDa), respectively.

은 48,500 Da이었다. 이 결과는 곤충기생균인 *Beauveria bassiana*의 배양액 중 이 효소의 분자량이 45,000 Da이라는 보고(Havukkala *et al.*, 1993)와 거의 유사하였다. 그러나 그람 음성 박테리아인 *Serratia marcescens*로 부터 얻은 이 효소의 분자량이 58.000 Da과 52,500 Da이라는 결과(Cabib, 1988), *Neurospora crassa*의 배양액 중 이 효소의 분자량이 20,600 Da이라는 보고(Begovich, 1j988) 및 사상균류인 *Verticillium albo-atrum*으로 부터 얻은 이 효소의 분자량이 64,000 Da이라는 결과(Pego, 1988)와는 서로 상이하였다. 그러나 고등식물 및 해조류 중 이 효소의 분자량이 30,000 Da 안팎의 분포를 보이며, 박테리아와 균류에서 유래된 이 효소의는 분자량이 30,000 Da에서 120,000 Da의 다양한 분포를 보이는 것(Koga *et al.*, 1999)과 유사함을 알았다.

최적 pH 및 pH 안정성

pH 변화에 따른 이 효소의 최적 pH는 5.5이었다. 동물체에서 얻은 이 효소의 최적 pH는 4.8에서 7.5 범위, 고등식물과 algae에서 얻은 이 효소 들의 최적 pH는 4.0에서 9.0 범위 그리고 미생물 중 이 효소들의 최적 pH는 3.5에서 8.0 범위인 것으로 보고되어 있다(Koga *et al.*, 1999). 본 연구 결과는 *Streptomyces erythraeus*에서 얻은 이 효소의 최적 pH가 5.0이라는 보고(Hara *et al.*, 1989) 및 쌀겨에서 얻은 이 것의 최적 pH 6.0이라는 보고(Cabib, 1988), *Pycnoporus cinnabarinus*로부터 얻은 이 효소의 최적 pH가 4.5 라는 보고(Ohtakara, 1988)와 *N. crassa*의 배양액으로부터 얻은 이 것의 최적 pH가 6.7이라는 보고(Begovich, 1988)와는 상이하였다.

또한 본 연구에서 얻은 이 효소의 pH 안정성은 pH 3.0과 8.0 범위에서 30분 동안 그 활성이 안정함을 알 수 있었다. 이 결과는 *P. cinnabarinus*로부터 얻은 효소의

pH 안정성이 pH 4.0과 8.0 범위에서 유지된다는 보고(Ohtakara, 1988)와 *S. marcescens*로부터 얻은 이 효소가 pH 4.0에서 7.0의 영역에서 활성이 유지되었다는 보고(Cabib, 1988)와 유사하였다. 그러나 강남콩 잎에서 분리한 이 효소의 안정성이 pH 3.0과 9.0 범위에서 50% 이상의 활성을 유지하였다는 보고(Boller *et al.*, 1988)와 *S. erythraeus*에서 얻은 이 효소의 안정성이 pH 4.0과 10.0 사이에서 24시간 동안 안정하였다는 보고(Hara *et al.*, 1989)와는 상이하였다.

최적 온도 및 열 안정성

본 실험에서 얻은 chitinase의 최적 온도는 35.0°C이었다. 이 결과는 *Streptomyces antibioticus*와 *Streptomyces griseus*의 배양액에서 얻은 이 효소의 최적 온도가 40.0°C라는 보고(Jeuniaux, 1966)와는 상이하였으며, *V. albo-atrum*으로부터 얻은 이 것의 최적 온도가 50.0°C이었다는 보고(Pego, 1988)와 *S. erythraeus*에서 얻은 이 효소의 최적 온도가 60.0°C이었다는 결과(Hara *et al.*, 1989)와는 크게 상이하였다.

본 연구에서 얻은 chitinase의 열 안정성은 50.0°C 이하에서 30분 동안 안정하였으며 60°C에서도 50%의 활성을 유지함을 알 수 있었다. 이 결과는 *V. albo-atrum*에서 얻은 이 효소의 열 안정성이 65.0°C에서 40%의 활성을 보이나, 70.0°C 이상에서는 불활성화한다는 보고(Pego, 1988)와 유사함을 알 수 있었다. 그러나 *S. erythraeus*로부터 얻은 이 효소가 60.0°C에서 1시간 동안 그 활성이 80% 유지된다는 보고(Hara *et al.*, 1989)와는 상이하였다.

Km 값

본 실험에서 얻은 chitinase의 최적 pH, 최적 온도 하에서 NAG6의 기질 농도 변화에 따른 Km 값의 측정 결과는 Fig. 5와 같고, 그 값은 0.57 mM이었다. 이 결과는 *P. cinnabarinus*에서 얻은 이 효소의 Km 값이 0.45 mM이라는 보고(Ohtakara, 1988)와 유사하였다. 그러나 *S. marcescens*로부터 얻은 이 효소의 Km 값이 4.4 mM이라는 보고(Cabib, 1988) 및 쌀겨에서 분리한 이 효소의 Km 값이 2.0 mM이라는 보고(Cabib, 1988)와는 크게 상이하였다. 이 효소의 Km 값은 키틴이나 콜로이드성 키틴과 같이 사슬이 긴 고분자성 기질에 대한 그 값과 *N*-acetyl chitooligosaccharides와 같이 사슬이 짧은 올리고머성 기질에 대한 그 값은 차이가 있으며, 미생물에서 유래된 이 효소의 Km 값이 0.38에서 2.24 mg/*ml*의 분포를 보인다는 보고(Koga *et al.*, 1999)와 유사한 결과라 사료된다.

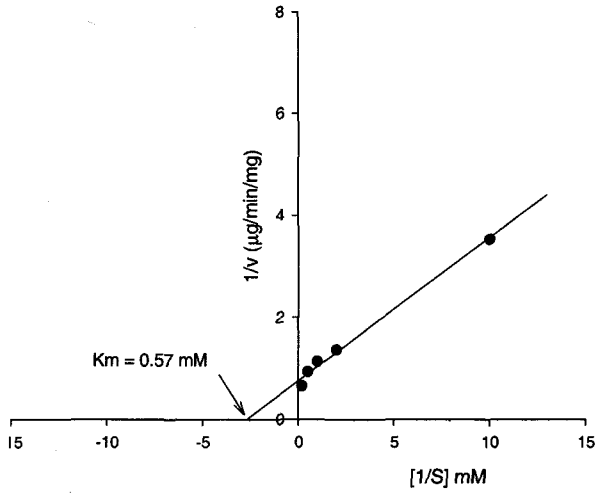

Fig. 5. Assay of Km value of the purified chitinase from the culture media of *Cordyceps militaris* by Lineweaver-Burk double reciprocal plot using hexa-*N*-acetyl chitohexaose as substrate.

양이온, 음이온 및 유기화합물 효과

본 실험에서 얻은 chitinase의 최적 pH 및 온도 조건 하에서 양이온, 음이온 및 유기물에 대한 비활성도 변화를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 이 효소의 활성도는 10 mM Cu^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+} 및 Zn^{2+} 이온에 대하여 각각 38.0%, 11.1%, 31.1% 및 9.0% 억제되었으나, Mg^{2+}, Ca^{2+} 및 K^{+} 이온에 대하여는 각각 3.0%, 1.1% 및 5.0% 활성이 증가함을 알 수 있었다. 이 결과는 Cu^{2+}와 Hg^{2+}가 억제제로 작용하였다는 보고(Jeuniaux, 1966)와 *V. albo-atrum*으로부터 얻은 이 효소의 활성이 50 mM의 Cu^{2+} 및 Hg^{2+}에 의하여 그 활성이 억제된다는 보고(Pego, 1988)와 일치함을 알 수 있었다. 그러나 양이온이 효소의 활성 증가에 영향을 미치지 않았다는 보고(Jeuniaux, 1966)와는 달리 Mg^{2+} 및 K^{+} 이온에 의하여 5% 미만의 활성 증가를 보였고, Ca^{2+} 이온은 같은 결과를 보였다.

또한 음이온에 대한 비활성도 변화는 10.0 mM CO_3^{2-},

Tabel 2. Effects of various cation, anion and organic compounds on *Cordyceps militaris* chitinase activity

Substances	Concentration (mM)	Inhibition rate (%)	Activation rate (%)
None	0.0	0.0	0.0
Cu^{2+}	10	38	–
Mn^{2+}	10	11	–
Hg^{2+}	10	31	–
Zn^{2+}	10	9.0	–
CO_3^{2-}	10	12	–
SO_4^{2-}	10	14	–
CN^{-}	10	35	–
Sodium cyanate	1.0	84	–
Maleic anhydride	1.0	21	–
Acetic anhydride	1.0	28	–
N-bromo succcinimide	1.0	18	–
Mg^{2+}	10	–	3.0
Ca^{2+}	10	–	1.1
K^{+}	10	–	5.0

SO_4^{2-} 및 CN^- 이온에 의하여 각각 11.5%, 13.5% 및 35.3% 활성이 억제됨을 알 수 있었다.

한편 효소 단백질의 아미노산 잔기와 활성 부위를 예측하기 위하여 카르복실기, 아민기, 하이드록실기 및 indole tryptophane 잔기와 각각 선택적으로 결합하는 것으로 알려진 1 mM의 sodium cyanate, 무수말레인산, 무수아세트산 및 *N*-bromo succinimide에 대한 이 효소의 활성 억제 효과를 측정한 결과, 각각 84.0%, 21.2%, 28.1% 및 18.0% 억제됨을 알았다. 이로써 이 효소의 활성에 카르복실기를 가진 아미노산 잔기가 중요한 역할을 하는 것으로 사려된다. 이 결과는 효소에서 카르복실기를 가진 글루타민산 잔기가 기질 chitin의 β-1,4 결합을 절단한다는 보고(Brameld and Goddard III, 1998)와 글루타민산 및 아스파라긴산이 이 효소 활성 부위의 주요 잔기라는 보고(Watanabe *et al.*, 1993)와 유사함을 알았다.

기질 분해 특이성

본 실험에서 얻은 이 효소의 기질 분해 특이성을 확인하기 위하여, 각 표준 물질 및 기질로 PNP-NAG2, PNP-NAG3 및 NAG6를 각각 사용한 이 효소와의 반응에서 얻은 분해산물의 Rf 값은 Fig. 6과 같다. 그림에서 보는 바와 같이 Rf 값 0.42의 NAG6(S-7)을 기질로 사용한 반응(R-3)에 의하여 Rf 값 0.65의 NAG2, 0.62의 NAG3 및 0.66의 NAG가 생성됨을 알 수 있었으며, 또한 Rf 값 0.73의 PNP-NAG3(S-3)을 기질로 한 반응(R-2)에서는 Rf 값 0.66의 NAG, 0.65의 NAG2 및 0.75의 PNP-NAG2가 생성되는 것을 알 수 있었다. Rf 값 0.76의 PNP-NAG2(S-2)를 기질로 사용한 반응(R-1)에서는 기질의 대부분과 Rf 값 0.86의 PNP 및 0.65의 NAG2가 미량 생성된 것을 알 수 있었다.

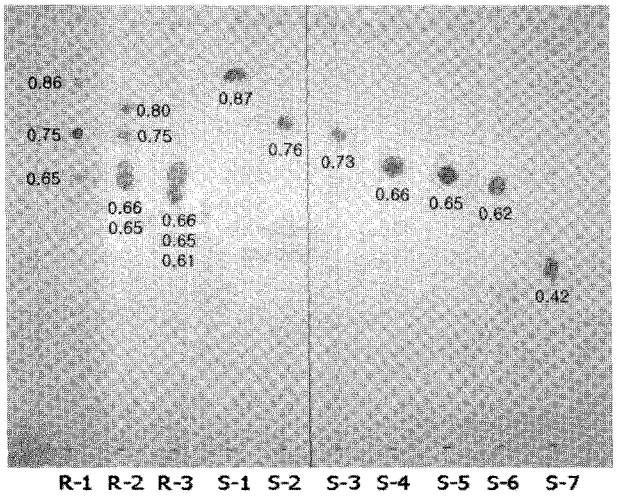

Fig. 6. Thin-layer chromatogram of cleavaging properties of the chitinase purified from the culture media of *C. militaris* on the various substrates. Reaction mixtures : R-1: PNP-*N,N'*-diacetylchitobiose(PNP-NAG2), R-2 : PNP-*N,N',N''*-triacetylchitotriose(PNP-NAG3), R-3 : hexa-acetylchitohexaose(NAG6). Standard substances : S-1 : p-nitrophenol(PNP), S-2 : PNP-*N,N'*-diacetylchitobiose(PNP-NAG2), S-3 : PNP-*N,N',N''*-triacetylchitotriose(PNP-NAG3), S-4 : *N*-acetylglucosamin(NAG), S-5 : *N,N'*-diacetylchitobiose(NAG2), S-6 : *N,N',N''*-triacetylchitotriose(NAG3), S-7 : Hexa-*N*-acetylchitohexaose(NAG6), respectively. Developing solvent system : butanol : pyridine : water=4.3 : 3.0 : 2.7(v/v/v), developing time : 4 hrs, Coloring reagent : conc. Sulfuric acid in ethanol(1 : 9, v/v). Each lane number is Rf value.

Endo-형태의 chitinase는 기질인 키틴 고분자 사슬을 무작위로 절단하며, 최종 분해 산물로 이당류인 chitobiose와 삼당류인 chitotriose를 생성하고, exo-형태의 chitinase는 기질의 비환원 말단으로부터 단계적으로 이당류인 chitobiose를 생성하는 효소로 알려져 있다(Molano *et al.*, 1979; Begovich, 1988; Cohen-Kupies and Chet, 1998; Felse and Panda, 2000; Gokul *et al.*, 2000). 이 결과로부터 NAG6를 기질로 사용한 반응(R-3)에서 chitotriose가 생성되고, PNP-NAG3를 기질로 사용한 반응(R-2)에서는 NAG와 NAG2가 동시에 생성되고, Rf 값 0.80의 PNP-NAG가 생성된 것으로 볼 때 이 효소는 기질을 단계적으로 절단한 것이 아니라 무작위로 분해한 것으로 보이며, 또한 PNP-NAG2와의 반응(R-1)에서 대부분의 기질이 분해되지 않은 결과로부터 이 효소는 endo-형태인 것으로 사료된다.

이상에서 *C. militaris*의 배양액으로부터 키틴 분해 효소를 분리 정제하여 그 효소적 특성을 확인하였다.

적 요

C. militaris 균사를 콜로이달 키틴이 첨가된 액체 배지에서 배양한 후 황산암모늄 분별침전, 이온 교환 및 겔 여과 크로마토그래피를 이용하여 배양액 중의 chitianse를 분리 정제하였다. 이 효소의 최적 pH와 온도는 각각 5.5와 35°C이었으며 겉보기 분자량은 48.5 kDa이었고, 그 Km 값은 0.57 mM이었다. 이 효소는 Cu^{2+}, Mn^{2+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, CN^- 및 OCN^- 이온에 의하여 활성이 억제되었나, Mg^{2+} 및 K^+ 이온에 의하여 활성이 약간 증가되었다. 또한 효소 단백질의 아미노산 잔기와 선택적으로 반응하는 무수말레인산, 무수아세트산 및 *N*-bromo succinimide에 의하여 활성이 억제되었으나, 특히 sodium cyanate에 의하여 84.0% 활성이 억제되어 카르복실기를 가진 아미노산 잔기가 이 효소의 활성 부위에 중요한 역할을 함을 알았다. NAG6에 의한 기질 분해 특이성 실험을 통하여 이 효소는 endo-형태의 chitinase임을 알았다.

참고문헌

Begovich, A. A. 1988. Chitinase from *Neurospora crass. Meth-*

ods Enzymol. **161**: 471-474.

Bidochka, M. J. and Khachatourians, G. G. 1993. Partial purification and characterisation of two extracellular *N*-acetyl-D-glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus. *Beauveria bassiana*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 40-45.

Blackwell, J. 1988. Physical methods for the determination of chitin structure and conformation. *Methods Enzymol.* **161**: 435-442.

Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. 1988. Chitinase from *Phaseolus vulgaris* leave. *Methods Enzymol.* **161**: 479-484.

Brameld, K. A. and Goddard III, W. A. 1998. Substrate distortion to a boat conformation at subsite -1 is critical in the machnism of family 18 chitinase. *J. Am. Chem. Soc.* **120**: 3571-3580.

Butler, P. J. G. and Hartley, B. S. 1972. Maleylation of amino groups. *Methods Enzymol.* **25**: 191-199.

Choi, I. Y., Choi, J. S., Lee, W. H., Yu, Y. J., Joung, G. T., Ju I. O. and Choi, Y. K. 1999. The condition of production of artificial fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Kor. J. Mycol.* **27**: 243-248.

Cohen-Kupies, R. and Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. *Environ. Biotech.* **9**: 270-277.

Cornelius, C., Dandrifosse, G. and Jeuniaux, C. H. 1976. Chitinolytic enzymes of the gastric mucosa of *Perodicticus potto* (Primate prosimian): Purification and enzyme specifificity. *Int. J. Biochem.* **7**: 445-448.

Coudron, T. A., Kroha, M. J. and Ignoffo, C. M. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol.* **79**: 339-348.

Felse, P. A. and Panda, T. 1999. Regulation and cloning of microbial chitinase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 141-151.

_____ and _____. 2000. Production of microbial chitinases-A revisit. *Bioprocess Engineering* **23**: 127-134.

Ferron, P. 1978. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Ann. Rev. Entomol.* **23**: 409-442.

Glare, T. R. and Milner, R. J. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. Pp. 547-612. *In*: Arora, D. K. Ajello, L. and Mukerji, K. G. Eds. Handbook of Applied Mycology 2. Marcel Dekker Inc., N.Y.

Gokul, B., Lee, J.-H., Song, K.-B., Rhee, S. K., Kim, C.-H. and Panda, T. 2000. Characterization and application of chitinases from *Trichiderma harzianum*-a review. *Bioprocess Engineering* **23**: 691-694.

Hames B. D. and Rickwood, D. 1981. Gel electrophoresis of protein. IRL press Limited. Oxford, England.

Hara, S., Yamamura, Y., Fujii, Y., Mega, T. and Ikenaka, T. 1989. Purification and characterization of chitinase produced by *Strptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* **105**: 484-489.

Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hiratae, K., Nishizawa, Y. and Hibi, T. 1993. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes. *J. Invertebr. Pathol.* **61**: 97-102.

Henrissat, B. 1999. Classification of chitinases modules. Pp. 137-156. *In*: Jolles, P. and Muzzarelli, R. A. Eds. Chitin and Chitinases. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland.

Hsu, S. C. and Lockwood, J. L. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* **29**: 422-426.

Jeuniaux, C. 1966. Chitinase. *Methods Enzymol.* **8**: 644-650.

Keyhani, N. O. and Roseman, S. 1999. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1473**: 108-122.

Koga, D. Mitsutomi, M. Kono, M. and Matsumiya, M. 1999. Biochemistry of chitinase. Pp. 111-123. *In*: Jolles, P. and Muzzarelli, R. A. Eds. *Chitin and Chitinases*, Birkhauser Verlag. Basel. Switzerland.

Molano, J., Polacheck, I., Duran, A. and Cabib, E. 1979. An endochitinase from wheat germ: Activity on nascent and preformed chitin. *J. Biol. Chem.* **254**: 4901-4907.

Ohtakara, A. and Mitsutomi, M. 1988. Viscosmetric assay for chitinase. *Methods Enzymol.* **161**: 453-457.

Park, J. T. and Johnson, M. J. 1949. A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* **181**: 149-151.

Pego, G. F. 1988. Chitinase from *Verticillium albo-atum*. *Methods Enzymol.* **161**: 474-479.

Riordan, J. F. and Vallee, B. L. 1972. Acetylation. *Methods Enzymol.* **25**: 494-497.

Robbins, P. W., Albright, C. and Benfield, B. 1988. Cloning and expression of a *Streptomyces plicatus* chitinase (chitinase-63) in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **263**: 443-447.

Roberts, R. L. and Cabib, E. 1982. *Serratia marcescens* chitinase: One-step purification and use for the determination of chitin. *Anal. Biochem.* **127**: 402-412.

Skujins, J. J., Potgieter, H. J. and Alexander, M. 1965. Dissolution of fungal cell walls by a streptomycete chitinase and β-(1-3) glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 358-364.

Smith, R. J. and Grula, E. A. 1983. Chitinase is an inducible enzyme in *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* **42**: 319-326.

Smith, R. J., Pekrul, S. and Grula, E. A. 1981. Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* **38**: 335-344.

Spande, T. F. and Witkop, B. 1967. Tryptophan involvement in binding sites of proteins and in enzyme-inhibitor complexes as determined by oxidation with *N*-bromosuccinimide. *Methods Enzymol.* **11**: 522-527.

Stark, G. R. 1967. Modification of proteins with cyanate. *Methods Enzymol.* **11**: 590-594.

St Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1986a. Cutile-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1509-1517.

St. Leger, R. J., Cooper, R. M. and Charnley, A. K. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogens. *J. Invertebr. Pathol.* **47**: 167-177.

Sung, J. M., Kim, C. H., Yang, K. J., Lee, H. K. and Kim, Y. S. 1993. Studies on distribution and utilization of *Cordyceps militaris* and *C. nutans*. *Kor. J. Mycol.* **21**: 94-105.

_____, Lee, H. K., Choi, Y. S., Kim, Y. Y., Kim, S. H. and Sung, G. H. 1997. Distribution and taxonomy of entomopathogenic fungal species from Korea. *Kor. J. Mycol.* **25**: 239-252.

_____, _____, Yoo, Y. J., Choi, Y. S., Kim, S. H., Kim, Y. O. and Sung, G. H. 1998. Classification of *Cordyceps* species based on protein anding pattern. *Kor. J. Mycol.* **26**: 1-7.

Tracey, M. V. 1955. Chitinase in some *Basidiomycetes*. *Biochem. J.* **61**: 579-586.

Ulhoa, C. J. and Peberdy, J. F. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2163-2169.

Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M. and Tanaka, H. 1993. Identification of glutamic acid204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 18567-18572.