

미생물 Chitin Deacetylase의 특성과 응용

국주희 · 정우진 · 김길용 · 박노동*
전남대학교 응용생물공학부 · 농업과학기술연구소

Enzymatic Characteristics and Applications of Microbial Chitin Deacetylases. Kuk, Ju-Hee, Woo-Jin Jung, Kil-Yong Kim, and Ro-Dong Park*. *Glucosamine Saccharide Materials National Research Laboratory, Department of Agricultural Chemistry, Institute of Agricultural Science and Technology, Chonnam National University Graduate School, Gwangju, 500-757, Korea* – Chitin deacetylase (CDA; EC 3.5.1.41) catalyzes the hydrolysis of *N*-acetamide bonds of chitin, converting it to chitosan. Chitosan has several applications in areas such as biomedicine, food ingredients, cosmetics, pharmaceuticals, and agriculture. In this paper, occurrence, assay and purification protocols, enzymatic characteristics, substrate specificity, and mode of action of microbial CDAs have been described. Several lines of evidence have substantiated the biological roles involved in cell wall formation and plant-pathogen interactions for fungal CDAs. The gene structure of CDAs has been compared with other family 4 carbohydrate esterases which deacetylate a wide variety of acetylated poly/oligo-saccharides. The use of CDAs for the conversion of chitin to chitosan, in contrast to the presently used chemical procedure, offers the possibility of a controlled, non-degradable process, resulting in the production of well-defined chitosan oligomers and polymers. Insect pathogen that can secrete high levels of chitin-metabolizing enzymes including CDA can be a possible alternative for new pest management tools.

Key words: Chitin deacetylase, family 4 carbohydrate esterase, reverse deacetylation reaction, chitin, chitosan

키틴과 키토산은 주로 게와 새우 껍질을 열화학적으로 처리하여 생산한다. 껍질을 알칼리 조건에서 제단백하고 이어서 산성 조건에서 탈회분하여 먼저 키틴을 조제한다. 다음으로, 키틴을 열조에서 진한 NaOH로 처리하면 탈아세틸화도 85-93%의 키토산이 불용성 침전으로 얻어진다[7]. 키틴을 보다 온화한 조건에서 NaOH로 처리하면 탈아세틸화도 48-55%의 수용성 키토산을 얻는다[35]. 그러나, 이 방법들은 3가지 결정적 단점을 가지고 있다. 즉, 막대한 에너지를 소모하며, 다량의 강알칼리용액을 폐기물로 발생하여 환경오염의 위험이 있으며, 특정한 분자량과 탈아세틸화도의 키토산을 생산하기 어렵다는 것이다. 이 결점을 극복할 수 있는 대안으로 chitin deacetylase(CDA; EC 3.5.1.41)를 이용한 효소적 방법이 제시되고 있다.

CDA는 *N*-acetamide bond를 가수분해하여 chitin을 chitosan으로 만드는 반응을 촉매한다(Fig. 1). 이 효소는 여러 진균[1, 2, 16, 20, 25, 37, 46]과 곤충[8]에서 발견되고 연구되었다. 이 논문은 CDA의 주요한 특성을 짚어보고 나아가 키틴에서 효소적 방법에 의한 키토산의 생산을 포함한 다양한 응용에 관한 가능성에 초점을 맞추고자 하였다.

효소적 특성

CDA는 다수의 곰팡이에서 먼저 정제되고 특성이 밝혀졌다. 가장 잘 연구된 효소들은 *Mucor rouxii*[2, 20, 25], *Absidia coerulea*[16], *Aspergillus nidulans*[1], *Colletotrichum lindemuthianum*[37, 46] 등의 곰팡이와 효모 *Saccharomyces cerevisiae*[8]에서 얻어진 CDA들이다. 이들의 중요한 특성들을 Table 1에 요약하였다.

모든 CDA들은 당단백질이며 주변질(periplasmic region) 또는 배지로 분리된다. 이 효소들은 대개 최적온도 50°C에서 뛰어난 열안정성을 보이며 수용성 β -(1,4)-*N*-acetyl-D-glucosamine polymers에 대하여 엄격한 특이성을 보였다. 그럼에도 불구하고, 이들은 분자량(26-150 kDa)과 탄수화물 함량이 상이하며, 넓은(pH 4.5-11.5) 범위의 최적 pH를 나타냈다. *C. lindemuthianum*과 *A. nidulans* CDA는 열안정성 뿐만 아니라 탈아세틸화반응의 산물인 초산에 의하여 저해받지 않는데[1, 37, 46], 이는 산업적 응용과 관련하여 유용한 성질이다. *Metarhizium anisopliae* CDA는 키틴분해효소의 저해제인 melanin에 의하여 영향을 받지 않았다[33].

CDA 활성은 반응 생성물인 glucosamine 잔기나 초산을 정량하는 방법으로 다양하게 측정할 수 있다. Kauss & Bauch는 glucosamine 잔기를 비색법으로 정량하여 *C. lindemuthianum* CDA의 활성을 측정하였다[22]. Kafetzopoulos 등은 여러 가지 키틴류의 기질에 CDA가 작용할 때

*Corresponding author

Tel: 82-62-530-2133, Fax: 82-62-530-0876

E-mail: rdpark@chonnam.ac.kr

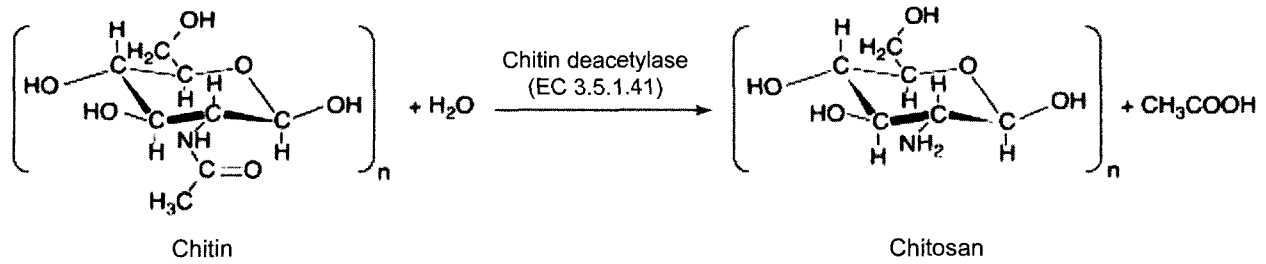


Fig. 1. The catalytic action of chitin deacetylases.

Table 1. Characteristics of chitin deacetylases from different sources.

Source	Location	Mw (kDa)	pI	Opt. pH	Opt. Temp. (°C)	Acetate Inhibition	Min DP	Ref.
<i>Mucor rouxii</i>	Periplasm	75	3	4.5	50	Yes	3	20
<i>Absidia coerulea</i>	Periplasm	75	-	5.0	50	Yes	3	16
<i>Aspergillus nidulans</i>	Culture media	27	2.75	7.0	50	No	2	1
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ATCC 56676	Culture media	31.5	-	11.5	60	No	2	37
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> DSM 63144	Culture media	150	3-5	8.5	50	No	2	46
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Culture media	70, 37, 26	2.7, 3.8, 4.1	8.5-8.8	30	No	-	33
<i>Sccharomyces cerevisiae</i> Cda2p	Recombinat Intracellular	43	-	8.0	50	Yes	2	28
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ATCC 56676	Recombinat Culture media	24.3	-	11.5	50	no	2	40
<i>Sccharomyces cerevisiae</i> Cda2	Recombinant Periplasm	35	-	8.0	50	Yes	2	29

유리되는 초산을 Bergmeyer의 효소적 방법에[4] 의하여 3종 효소(acetyl-CoA synthetase, citrate synthase, malate dehydrogenase)를 써서 이 연쇄반응의 최종산물인 NADH를 정량하여 *M. rouxii* CDA 활성을 측정하였다[20]. 이들은 또 다른 방법으로서 *N*-acetyl group에 방사능 표지된 partially *O*-hydroxyethylated chitin(³H-acetylglucosamine)을 기질로 사용하여 유리된 방사능을 측정하였다[20]. 방사능 표지된 기질은 Araki & Ito의 방법으로 조제한다[2]. 한편, Tokuyasu 등은 키틴올리고당의 CDA 반응을 Dionex CarboPac™ 컬럼과 amperometric detector를 사용하여 HPLC로 추적하였다[38].

PAGE 전기영동 후에 젤에서 기질 ethylene glycol chitin을 사용하여 CDA의 띠를 눈으로 확인할 수 있다. 젤을 Calcofluor로 염색하면 CDA는 청색 형광 배경 위에 더 밝은 청색 형광 띠로 나타나는데, 이는 chitosan이 chitin 보다 Calcofluor에 대해 더 큰 결합 친화도를 보이기 때문이다[33, 44]. PAGE 분석법을 이용하면, CDA의 동위효소를 용이하게 확인할 수 있다. 이 방법으로 *Uromyces viciae-fabae*에서 5종의 동위효소를(MW 12.7-48.1 kDa)[11], *Mucor racemosus*에서 3종(MW 26, 30, 64 kDa)[44], *Rhizopus nigricans*에서 4종(MW 26, 30, 35, 64 kDa)[44], *M. anisopliae*에서 3종(MW 26, 37, 70 kDa)을 확인하였다[33].

기질 특이성과 작용기작

M. rouxii CDA는 수용성 키틴[glycol chitin, chitin(MW 160 kDa, DA 40%)]은 물론 *N*-acetylchitotetraose와 acetyl xylan을 탈아세틸화 하였다. CDA가 xylan에 대하여 활성을 갖는다는 것은 매우 흥미로운 발견이다. 한편, CoCl₂를 첨가하면, 키틴질 기질에 대한 활성은 크게 증가하였지만, xylan에 대한 활성은 증가하지 않았다[6]. *C. lindemuthianum* CDA도 CoCl₂에 의하여 활성화되었다[46]. *S. cerevisiae*의 Cda2p를 endoglycosidase F와 *N*-glycosidase F의 조합으로 *N*-deglycosylation 하면 활성을 완전히 소실하지만, 1 mM CoCl₂를 첨가해주면 활성을 회복하였다[28]. 그러나, CoCl₂에 의한 CDA의 활성화 기작은 아직까지 알려진 바 없다. 이 CoCl₂-의존적 CDA 활성은 다른 CE-4 효소들, NodB protein[19], peptidoglycan deacetylase[15, 50] 및 여타 chitin deacetylase[18, 20, 37, 47]에서는 보고된 바 없는 성질이다(아래 참조).

CDA는 (GlcNAc)₂₋₆의 기질에 대하여 활성이지만 기질의 DP가 증가하면 탈아세틸화율이 점점 증가하였다[20, 28]. *M. anisopliae* CDA는 γ -chitin을 제외한 다양한 키틴 기질에 대해 활성을 보였다[33].

*S. lividans*의 acetyl xylan esterase는 xylan 뿐만 아니라

수용성 chitin 기질도 효율적으로 탈아세틸화하였으며, xylan binding domain(XBD)을 제거한 경우에도 기질들에 대하여 활성을 유지하였다[6]. 그러나, NodB homology domain을 갖지 않는 *B. pumilus* acetyl xyln esterase는 키틴질 기질의 탈아세틸화반응을 촉매하지 않았다. *C. fimi*[24]와 *Clostridium thermocellum* xylanases[13]의 NodB homology domain은 그 자체가 활성을 가지고 있어서, acetyl xylan을 탈아세틸화시켰다. Acetyl xylan esterase는 식물세포벽의 주요 구성분인 O-acetylated xylan을 탈아세틸화한다[6].

마지막으로, CDA와 상당한 상동성을 가진 *Bacillus* sp. peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase는 peptidoglycan deacetylases의 기능을 가진 것으로 알려졌다[21]. Peptidoglycan deacetylase는 세균 세포벽의 반복단위인 N-acetylmuramic acid & N-acetylglucosamine의 탈아세틸화를 촉매하였다. 그러나, *M. rouxii* CDA와 *S. lividans*의 acetyl xylan esterase는 peptidoglycan의 탈아세틸화반응을 촉매하지 않았다[6].

CDA의 작용기작은 주로 천연기질인 키토산과[27] 키토산 올리고당을[38, 47] 기질로 사용하여 연구되었다. *M. rouxii* CDA의 작용기작은 DP 30인 탈아세틸화된 수용성 키토산(DA 32%)을 기질로 ¹H-과 ¹³C-NMR spectroscopy로 연구되었다[27]. 이 효소는 기질의 acetyl groups을 다중공격기작(multiple-attack mechanism; 효소가 효소-키토산중합체 복합체를 형성한 후, 해리하여 새로운 중합체와 새로운 활성 복합체를 이루기 전에, 여러 acetyl group을 연속적으로 가수분해하는 기작)으로 가수분해하였다. 이때 다중공격도(degree of multiple attack)는 3이었다. 이것은 이 효소가 키토산중합체와 한번 결합하여 탈아세틸화할 수 있는 아세틸기의 최대수를 말하는 것으로, 이 기질에서 연속적으로 분포하는 N-acetyl-D-glucosamine 잔기의 최대수가 3이었음을 의미한다[27].

키토산 올리고당(DP 2-7)에 대한 *M. rouxii* CDA의 작용기작도 구명되었다[47]. 효소적 탈아세틸화반응 후에 키토산 올리고당의 서열은 2종의 specific exoglycosidases를 교대로 처리한 다음 HPLC로 분석하였으며 ¹H-NMR spectroscopy로 확인하였다. 이 효소의 작용에는 올리고당의 길이가 중요하였으며, DP 2 이하의 키토산 올리고당은 탈아세틸화되지 않았다. Tetra-N-acetylchitotetraose와 penta-N-acetylchitopentaose는 완전히 탈아세틸화되었으나, tri-N-acetylchitotriose, hexa-N-acetylchitohexaose, hepta-N-acetylchitoheptaose의 환원말단 잔기는 그대로 남아있었다. 이 효소는 반응 초기에 DP 3 이상의 모든 키토산 올리고당의 비환원말단에서부터 acetyl group을 제거하기 시작하여 점진적으로 다음 acetamide group의 가수분해를 촉매하였다[47].

C. lindemuthianum CDA의 작용기작 연구에는 기질로써 chitin oligosaccharides(DP 2-4)를 사용하고 HPLC와 fast-atom-bombardment mass spectrometry(FAB-MS)을 이용하여

분석하였다[38]. 이 효소의 작용기작은 *M. rouxii* 효소와 비슷하였다. *C. lindemuthianum* CDA는 tri-N-acetylchitotriose와 tetra-N-acetylchitotetraose를 완전히 탈아세틸화시켜 상응하는 키토산 올리고당으로 전환시켰다. 한편, di-N-acetylchitobiose의 경우, 비환원 말단의 acetyl group만을 가수분해하여 2-acetamido-4-O-(2-amino-2-deoxy-D-glucopyranosyl)-2-deoxy-D-glucose(GlcNGlcNAc)를 생성하였다. 이 효소적 과정은 화학적 방법에 비하여 당사슬의 분해를 초래하지 않고, 고도로 재현성이 있으며, GlcNGlcNAc와 같은 특이한 물질을 얻을 수 있는 장점이 있다고 할 것이다. 매우 흥미로운 발견으로, 이 효소는 3 M sodium acetate 존재 하에 역탈아세틸화반응(reverse deacetylation reaction)을 촉매하였다[39]. 이 성질을 이용하여 *C. lindemuthianum* CDA로 chitobiose (GlcNGlcN)를 아세틸화하여 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose (GlcNAcGlcN)를 얻을 수 있었다.

유전자의 구조

곰팡이 *M. rouxii*[21], *C. lindemuthianum*[40], *Gongronella butleri*[30], *Phycomyces blakesleeana*(GenBank AB046690), *Schizophyllum commune*(GenBank AF271216), *Blumeria graminis*(GenBank AAK84438) 등과 효모 *S. cerevisiae*[8, 9], 세균 *Vibrio alginolyticus* H-8[34], *Vibrio cholerae Non-1* [52], *Azorhizobium caulinodans*[17], *Rhizobium* sp.[14]에서 CDA 유전자들이 클로닝되었다. *C. lindemuthianum* CDA는 *Escherichia coli*[41]와 *Pichia pastoris*[36]에서, *S. cerevisiae* CDA는 *E. coli*[29]에서 발현되었다. *G. butleri* CDA 유전자의 NodB homology domain은 다른 CDA 뿐만 아니라 *Sinorhizobium meliloti*와 *Bacillus subtilis*의 NodB, *Cellulomonas fimi*의 xylanase D, *Streptomyces lividans*의 acetyl xylan esterase 등과 높은 서열상동성을 나타냈다[30]. *S. cerevisiae* CDA의 [8, 9, 29] ORF은 개시코돈(ATG)에서부터 44개의 predomain을 지령하는 부위와 이어서 269개 아미노산의 성숙 Cda2p를 지령하는 부위로 구성되어 있었다. *E. coli*에서 발현된 *S. cerevisiae* CDA2는 N-말단에서 12개 이상 아미노산을 절단해내면 완전히 실활하는 것으로 보아 성숙 효소의 N-말단 아미노산들이 단백질의 접힘구조에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다[29].

CDA는 family 4 carbohydrate esterases (CE-4, CAZY classification, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>)의 일원으로, CE-4는 광범위한 종류의 acetylated poly/oligo-saccharides를 탈아세틸화한다. 여기에는 chitin deacetylase(EC. 3.5.1.41), rhizobial NodB chitooligosaccharide deacetylase (EC. 3.5.1.-), peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase (EC. 3.1.1.-), acetyl xylan esterase(EC. 3.1.1.72), xylanase A, B, D, E(EC. 3.2.1.8) 등이 포함된다. 이 family의 모든

효소들은 키틴, NodB factor, peptidoglycan의 *N*-acetylglucosamine으로부터 *N*-linked acetyl group을 가수분해하거나 (chitin deacetylase, rhizobial NodB chitooligosaccharide deacetylase, peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase), acetyl xylan으로부터 *O*-linked acetyl group을 가수분해한다(acetyl xylan esterase, xylanase A, B, D, E).

CDA 유전자는 근류균 근류형성 단백질(rhizobial nodulation proteins, NodB proteins)[12, 19], 미생물 acetyl xylan esterases와 xylanases[13, 24], *Bacillus* sp.의 open reading frames(ORFs)과 상당한 상동성을 보이는 공통보전부위(universal conserved region)를 가졌으며, NodB proteins과 상동성이 높은 탓에 이를 NodB homology domain이라 명명되었다[5, 28]. NodB proteins은 근류균 단백질로, 두과식물과 질소고정세균 사이의 공생관계를 조절하는 Nod factors, 즉 chitin lipooligosaccharide를 탈아세틸화하는 deacetylases이다[12]. 근류균의 Nod factors는 공통적 기본구조를 가졌는데, 이들은 모두 비환원 말단 잔기에 *N*-acyl 치환기를 가진 *N*-acetylglucosamine oligomers이다. *N*-Acetylglucosamine oligomers는 숙주식물에 균류형성-특이적 반응을 유도할 수 없으므로, Nod factors의 생물활성을 위하여는 *N*-acyl 치환이 필요하다. NodB proteins는 특이적으로 *N*-acetylglucosamine oligomers의 비환원 말단 잔기의 *N*-acetyl group을 제거해냄으로서, *N*-acylation에 필요한 free amino group을 제공한다[19]. 최근, CE-4 효소 가운데 처음으로 peptidoglycan deacetylase의 하나인 *B. subtilis* PdaA의 결정구조가 해명되었다[5]. PdaA는 기다란 홈통에 NodB homology domain을 가지고 있는 (β/α)₈ barrel 구조를 하고 있으며, NodB homology domain에 위치한 하나의 Asp와 세개의 His이 유사기질인 *N*-acetylglucosamine과 상호작용한다고 알려졌다.

생물학적 역할과 응용

곰팡이 CDA의 생물학적 기능으로 고려되는 것으로 1) 세포벽 생성과 2) 식물/곤충-병원균 상호작용이 있다. 곰팡이의 키틴과 키토산의 생합성을 연구하는 과정에서 CDA가 세포벽 키토산 생합성에 관여하는 것이 밝혀졌다. *M. rouxii*의 경우, 키틴생합성효소(chitin synthase)가 CDA와 나란히 작동하는데, 키틴생합성효소가 uridine 5-diphospho-*N*-acetyl-D-glucosamine(UDP-GlcNAc)로부터 *N*-acetyl-D-glucosamine residues를 중합하여 키틴을 생합성하면, CDA는 키틴 사슬의 *N*-acetamide bonds를 가수분해한다[10]. *A. coerulea*에서도 유사한 결과를 얻었다[16]. CDA는 세포벽의 주변질에 위치하는 것이 밝혀졌는데, 이 공간적 배치는 키틴생합성이 곰팡이의 원형질막 분획에서 일어난다는 것을 제시한다[31]. 비슷한 생물학적 기능이 *S. cerevisiae*의 두 CDA (Cda1p & Cda2p)에서 보고되었다. 이들은 자낭포자(ascospore) 세

포벽 형성에 필수적인 것으로 포자형성 때에만 발현되었다[8]. 이들 유전자의 돌연변이는 포자 외벽의 dihydroxytyrosine layer의 형성에 결함을 초래하여 가수분해효소의 공격에 용이하게 노출되었다. Cda2p는 자낭포자 세포벽에서 탈아세틸화반응의 대부분을 수행하며, Cda1p는 포자 외벽층의 성숙에 관여하는 것으로 보인다[9].

둘째, CDA가 식물/곤충-병원균 상호작용에 관여한다는 것은 병원균인 *C. lindemuthianum*의 CDA가 세포 외벽에서 키틴 올리고당에 매우 활성인 점을 고려하여 제안되었다. 키틴 올리고당(DP 4-6)은 칼로스(callose) 형성, 리그닌화(lignification), 쿠마린 유도체(coumarin derivatives) 생합성 등의 식물방어기구를 유도하지만[3, 23], 이들의 탈아세틸화물은 이런 기능이 없다[48, 51]. 식물 키틴분해효소가 곰팡이 세포벽을 공격하여 생성되는 키틴 올리고당을 CDA가 신속히 탈아세틸화시키면 식물 방어기구의 유도 활성이 그만큼 감소되는 것이다[46].

한편, 식물 또는 곤충 조직으로 키틴을 상당량 함유한 곰팡이 균사(hypha)가 침투하는 과정에서 CDA의 역할이 제안되었다. CDA에 의하여 아세틸화도가 감소하면 식물 키틴분해효소(endochitinase)에 의한 균사 키틴의 분해가 억제될 수 있으므로, 침투한 균사는 식물 효소의 작용으로부터 보호받게 된다[32]. 비슷한 예로, *Metarhizium anisopliae* 세포벽에는 glucosamine과 *N*-acetylglucosamine이 동비로 존재하는 것으로 보아 *M. anisopliae* CDA는 자신의 세포벽 성분의 조절을 통하여 균사의 침투시에 곤충 chitinase의 방어기작을 회피하는 것으로 해석되었다[33]. 구체적으로, *Helicoverpa armigera*에 접종시킨 *M. anisopliae* 분생포자(conidia)가 발아하면 곤충 큐티클의 키틴이 키토산으로 전환되는 것이 발견되었다. 이는 *M. anisopliae* CDA가 chitinase와 함께 키틴의 가수분해에 크게 기여할 수 있음을 제시한다. 그러므로, CDA는 병원균인 *M. anisopliae*의 균사가 곤충의 큐티클을 연화하여 균사의 침투를 용이하게 하여 발병의 개시에 중요한 역할을 담당하는 것으로 보였다[33].

이러한 생물학적 활성을 해충 방제의 관점에서 보면, 화학적 방제의 대안으로 CDA를 포함한 고효성의 키틴 대사 효소들을 분비하는 곤충 병원균의 활용을 고려할 수 있게 된다. 미생물살충제(myco-insecticide) 제제와 CDA를 혼합하여 사용한다면, *B. thuringiensis*, *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus 등 생물농약의 약점인 지효성을 보완할 수 있을 것이다. 포자를 포함한 미생물 살충제가 곤충의 큐티클에 접촉 발아 침투하여 숙주를 살해하는 데 4-7일이 소요되는 바, CDA는 큐티클층의 연화를 촉진하여 균사의 침투를 조장할 뿐만 아니라 숙주의 저항반응을 회피하는 수단이 될 수 있기 때문이다[33].

마지막으로, 키틴의 효소적 탈아세틸화를 통한 키토산의 조제에의 CDA의 응용 가능성을 살펴보고자 한다. 이 연구는 곰팡이 *M. rouxii*[26]에서 정제된 효소를 사용하여 처음

Table 2. The effectiveness of chitin deacetylase for preparation of chitosan from crystalline and amorphous chitins [26].

Substrate	Acetate released (nmol)	% Deacetylation
Crystalline chitin (shrimp)	126±2	0.50±0.01
Amorphous chitin (shrimp)	2383±30	9.5±0.1
Crystalline chitin (crab)	120±2	0.48±0.01
Amorphous chitin (crab)	2347±29	9.4±0.1

시도되었다. 두 상태의 키틴, 결정형과 무정형 키틴을 기질로 사용하여 조사한 탈아세틸화 효율은 각각 0.5%와 9.5%였다(Table 2). 이처럼 낮은 탈아세틸화도는 이 효소가 불용성 키틴 기질을 효율적으로 탈아세틸화시키지 못함을 나타낸다. 이와 유사한 결과는 다른 종류의 CDA를 사용하였을 때에도 나타났다[16, 37, 46]. 이는 효소가 불용성 기질의 아세틸기에 용이하게 접근할 수 없는 데서 연유한 것으로, 반응의 수율과 속도를 증진시키기 위하여 효소를 첨가하기 전에 결정형 키틴 기질을 전처리할 필요가 있다. *M. rouxii* CDA와 부분 탈아세틸화된 수용성 키토산을 사용하여 실험을 수행하던 바[27, 45], 효소는 97%의 높은 효율로 기질을 탈아세틸화하였다[45]. 그러므로, 키틴의 CDA에 의한 효소적 탈아세틸화반응의 실용화는 결정형 기질을 무정형 기질로 변환시키는 기술의 개발과 불가분의 관계에 있다고 하겠다.

CDA는 수용성 키틴 올리고당을 용이하게 탈아세틸화시켰다. 이를 효소적으로 탈아세틸화하면, 화학적 과정에 비하여 용이하게 올리고당을 생산할 수 있고 또 *N*-탈아세틸화 잔기의 분포를 조절할 수 있다. 효소적 방법의 특이성과 용이성의 예는 *C. lindemuthianum* CDA에 의한 *p*-nitrophenyl *N,N'*-diacetyl-β-chitobioside[(GlcNAc)₂-*p*NP]의 선택적 탈아세틸화에서 찾을 수 있다[42]. 이 효소는 특이적으로 이 글리코시드의 비환원말단을 탈아세틸화시켜, 이를 *p*-nitrophenyl-2-acetamido-4-*O*-(2-amino-2-deoxy-β-D-glucopyranosyl)-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (GlcNGlcNAc-*p*NP)로 전환시켰다. 이 이당류 유도체는 [(GlcNAc)₂-*p*NP]를 분해하는 chitinases를 분류하는 데 기질로 이용될 수 있는 당이다.

C. lindemuthianum CDA에 의하여 촉매되는 역탈아세틸화반응(reverse deacetylation reaction)은 응용면에서 흥미롭다. 이 효소를 이용하여 triacetylated chitosan tetramer [(GlcNAc)₃GlcN]를 합성하였다[43]. 이 효소반응은 화학적 방법으로는 달성할 수 없는 부위선택성(regioselectivity)을 발휘하였다. 이는 효소적 탈아세틸화과정의 개발로 신규한 키토산 중합체와 올리고당을 제조할 수 있음을 시사한다.

요 약

Chitin deacetylase(CDA; EC 3.5.1.41)는 키틴의 *N*-

acetamide bonds를 가수분해하여 이를 키토산으로 전환시키는 효소다. 한편, 키토산은 의약, 화장품, 식품, 농업 등의 분야에서 다양하게 응용되는 고분자 다당류이다. 본 논문에서는 미생물 유래 CDA의 분포, 분석법, 효소적 특성, 기질 특이성, 작용기작, 유전자의 구조, 생물학적 역할, 응용 등의 최신 지견을 기술하고자 하였다. 미생물 CDA가 세포벽 형성과 식물-미생물 상호작용에 관여한다는 연구결과들을 제시하였으며, CDA의 유전자 구조를 다양한 acetylated poly/oligo-saccharides를 탈아세틸화하는 family 4 carbohydrate esterases의 유전자 구조와 비교하였다. 키틴의 탈아세틸화로 키토산을 제조하는 과정에 CDA의 활용 가능성과, CDA를 포함한 고활성의 키틴 대사효소들을 분비하는 곤충 병원균의 활용 가능성도 살펴보았다.

감사의 글

이 연구는 과학기술부 국가지정연구실사업(NRL)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사를 포함합니다.

REFERENCES

- Alfonso, C., O.M. Nuero, F. Santamaria, and F. Reyes. 1995. Purification of a heat stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr. Microbiol.* **30**: 49-54.
- Araki, Y. and E. Ito. 1975. A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*: enzymatic deacetylation of chitin. *Eur. J. Biochem.* **189**: 249-253.
- Barber, M. S., R. E. Bertram, and J. P. Ride. 1989. Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **34**: 3-12.
- Bergmeyer, H.U. 1974. *Method of Enzymatic Analysis*, pp. 112-117. 2nd ed. Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim.
- Blair, D. E. and D. M. F. van Aalten. 2004. Structures of *Bacillus subtilis* PdaA, a family 4 carbohydrate esterase, and a complex with *N*-acetyl-glucosamine. *FEBS Letters* **570**: 13-19.
- Caufrier, F., A. Martinou, C. Dupont, and V. Bouriotis. 2003. Carbohydrate esterase family 4 enzymes: substrate specificity. *Carbohydr. Res.* **338**: 687-692.
- Chang, K. L., G. Tsai, J. Lee, and W.R. Fu. 1997. Heterogeneous *N*-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydr. Res.* **303**: 327-332.
- Christodoulidou, A., V. Bouriotis, and G. Thireos. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 31420-31425.
- Christodoulidou, A., P. Briza, A. Ellinger, and V. Bouriotis. 1999. Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Lett.* **460**: 275-279.
- Davis, L. L. and S. Bartnicki-Garcia. 1984. Chitosan synthe-

- sis by the tandem action of chitin synthase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry* **23**: 1065-1073.
11. Deising, H. and J. Seigrist. 1995. Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabaeis* controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**: 207-212.
 12. Denarie, J., F. Debelle, and J. C. Prome. 1996. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65** : 503-535.
 13. Fernandes, A., M. G. A. Fontes, H. J. Gilbert, G. P. Hazlewood, T. H. Fernandes, and L. M. A. Ferreira. 1999. Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochem. J.* **342**: 105-110.
 14. Freiberg, C., R. Fellay, A. Bairoch, W. J. Broughton, A. Rosental, and X. Perret. 1997. Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. *Nature* **387**: 394-401.
 15. Fukushima, T., H. Yamamoto, A. Atrih, S. J. Foster, and J. Sekiguchi. 2002. A polysaccharide deacetylase gene(*pdaa*) is required for germination and for production of muramic delta-lactam residues in the spore cortex of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**: 6007-6015.
 16. Gao, X., T. Katsumoto, and K. Onodera. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.* **117**: 257-263.
 17. Goethalis, K., M. Gao, K. Tomekpe, M. V. Montagu, and M. Holsters. 1989. Common *nodABC* genes in *Nod* locus 1 of *Azorhizobium caulinodans* : nucleotide sequence and plant-inducible expression. *Mol. Gen. Genet.* **219**: 289-298.
 18. Hekmat, O., K. Tokuyasu, and S. G. Withers. 2003. Subsite structure of the endo-type chitin deacetylase from a Deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*: an investigation using steady-state kinetic analysis and MS. *Biochem. J.* **374**: 369-380.
 19. John, M., H. Rohrig, J. Schmidt, U. Wieneke, and J. Schell. 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 625-629.
 20. Kafetzopoulos, D., A. Martinou, and V. Bouriotis. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2564-2568.
 21. Kafetzopoulos, D., G. Thireos, J. Vournakis, and V. Bouriotis. 1993. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8005-8008.
 22. Kauss, H. and B. Bauch. 1998. Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*, pp. 518-523, In W. A. Woods and S. T. Kellogg. (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. **161**, Academic Press, San Diago.
 23. Kauss, H., W. Jeblick, and A. Domard. 1989. The degree of polymerization and *N*-acetylation of chitosan determines its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplast of *Catharanthus roseus*. *Planta* **178**: 385-392.
 24. Laurie, J., J. H. Clarke, A. Ciruela, C. B. Faulds, G. Williamson, H. J. Gilbert, J. E. Rixon, J. Millward-Sadler, and G. P. Hazlewood. 1997. The NodB domain of a multidomain xylanase from *Cellulomonas fimi* deacetylases acetylxytan. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**: 261-264.
 25. Martinou, A., D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis. 1993. Isolation of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* by immunoaffinity chromatography. *J. Chromatogr.* **644**: 35-41.
 26. Martinou, A., D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis. 1995. Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydr. Res.* **273**: 235-242.
 27. Martinou, A., V. Bouriotis, B. T. Stokke, and K. M. Varumd. 1998. Mode of action of chitin deacetylase from *M. rouxii* on partially *N*-acetylated chitosans. *Carbohydr. Res.* **311**: 71-78.
 28. Martinou, A., D. Koutsoulis, and V. Bouriotis. 2002. Expression, purification, and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase(Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Prot. Expr. Purif.* **24**: 111-116.
 29. Martinou, A., D. Koutsoulis, and V. Bouriotis. 2003. Cloning and expression of a chitin deacetylase gene(CDA2) from *Saccharomyces cerevisiae* in *Escherichia coli* . Purification and characterization of the cobalt-dependent recombinant enzyme. *Enzym. Microbial Technol.* **32**: 757-763.
 30. Maw, T., T. K. Tan, E. Kohr, and S. M. Wong. 2002. Complete cDNA sequence of chitin deacetylase from *Gongronella butleri* and its phylogenetic analysis revealed clusters corresponding to taxonomic classification of fungi. *J. Biosci. Bioeng.* **93**: 376-381.
 31. McMurrough, I., A. Flores-Carreón, and S. Bartnicki-Garcia. 1971. Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthase in *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* **246**: 3999-4007.
 32. Mendgen, K., M. Hahn, and H. Deising. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **34**: 367-386.
 33. Nahar, P., Ghormade, V, and V. Deshpande. 2004. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. *J. Invertebrate Pathol.* **85**: 80-88.
 34. Ohishi, K., K. Murase, T. Ohta, and H. Etoh. 2000. Cloning and sequencing of the deacetylase gene from *Vibrio alginolyticus* H-8. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 561-563.
 35. Sannan, T., K. Kurita, and Y. Iwakura. 1976. Studies on chitin. *Makromol. Chem.* **177**: 3589-3600.
 36. Shrestha, B., K. Blondeau, W. F. Stevens, and F. L. Hegarat. 2004. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Prot. Expr. Purif.* **38**: 196-204.
 37. Tokuyasu, K., M. Ohnishi-Kameyama, and K. Hayashi. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**: 1598-1603.
 38. Tokuyasu, K., H. Ono, M. Ohnishi-Kameyama, K. Hayashi, and Y. Mori. 1997. Deacetylation of chitin oligosaccharides

- of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydr. Res.* **303**: 353-358.
39. Tokuyasu, K., H. Ono, K. Hayashi, and Y. Mori. 1999. Reverse hydrolysis reaction of chitin deacetylase and enzymatic synthesis of β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-GlcN from chitobiose. *Carbohydr. Res.* **322**: 26-31.
 40. Tokuyasu, K., M. Ohnishi-Kameyama, K. Hayashi, and Y. Mori. 1999. Cloning and expression of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 418-423.
 41. Tokuyasu, K., S. Kaneko, K. Hayashi, and Y. Mori. 1999. Purification of a recombinant chitin deacetylase in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *FEBS Lett.* **458**: 23-26.
 42. Tokuyasu, K., H. Ono, Y. Kitagawa, M. Ohnishi-Kameyama, K. Hayashi, and Y. Mori. 1999. Selective *N*-deacetylation of *p*-nitrophenyl *N,N*-diacetyl- β -chitobioside and its use to differentiate the action of two types of chitinases. *Carbohydr. Res.* **316**: 173-178.
 43. Tokuyasu, K., H. Ono, M. Mitsutomi, K. Hayashi, and Y. Mori. 2000. Synthesis of a chitosan tetramer derivative, β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc-(1 \rightarrow 4)-D-GlcN through a partial *N*-acetylation reaction by chitin deacetylase. *Carbohydr. Res.* **325**: 211-215.
 44. Trudel, J. and A. Asselin. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **189**: 249-253.
 45. Tsigos, A., K. Martinou, D. Varum, Kafetzopoulos, and A. Christodoulidou. 1994. Enzymatic deacetylation of chitin employing chitin deacetylases, pp. 98-107. In A. Karnicki et al.(eds.), *Chitin World*, Wirtschafsverlag NW, Bremerhaven.
 46. Tsigos, I. and V. Bouriotis. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biol. Chem.* **270**: 26286-26291.
 47. Tsigos, I., N. Zydowicz, A. Martinou, A. Domard, and V. Bouriotis. 1999. Mode of action of chitin deacetylase from *M. rouxii* on *N*-acetylchitooligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* **261**: 1-9.
 48. Vander, P., K. M. Varum, A. Domard, N. E. Gueddari, and B. M. Moerschbacher. 1998. Comparison of the ability of partially acetylated chitosans and chitooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiol.* **118**: 1353-1359.
 49. Versali, M. F. and F. Clerisse. 1997. Expression and characterization of recombinant chitin deacetylase, pp. 273-278, In A. Domard et al.(eds.), *Advances in Chitin Science*, vol. 2, Jaques Andre Publisher.
 50. Vollmer, W. and A. Tomasz. 2000. The *pgda* gene encodes for a peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **275**: 20496-20501.
 51. Walker-Simons, M., D. Jin, C. A. West, L. Hadwiger, and C. A. Ryan. 1984. Comparison of proteinase inhibitor-inducing activities and phytoalexin elicitor activities of a pure fungal endopolygalacturonase, pectic fragments and chitosans. *Plant Physiol.* **76**: 833-836.
 52. Yamano, N., N. Oura, J. Wang, and S. Fujishima. 1997. Cloning and sequencing of the gene for *N*-acetylglucosamine use that contract divergent operons(*nagE-nagAC*) from *Vibrio cholerae Non-1*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 1349-1353.

(Received Jan. 18, 2005/Accepted Mar. 14, 2005)