

放線菌이 生産하는 Chitinase 의 性質에 關한 研究

金光顯·徐正墳

慶北大學校 農科大學 農化學科
(1978년 10월 10일 수리)

Studies on the Production and Properties of Chitinase Produced by *Streptomyces* sp.

Kwang Hyeon Kim · Jung Hwn Seu

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyung Pook National
University, Taegu, Korea
(Received Oct. 10, 1978)

Abstract

A strain of *Streptomyces* sp producing chitinase was isolated from soil and its cultural condition and some properties of this enzyme were investigated. When 0.375 per cent of glucose was added to basal medium, this organism produced the most quantities of this enzyme after shaking culture at 30°C for 48 hrs., while the production of the enzyme was repressed at the more concentration of glucose than that. The enzyme had a optimal pH of 7.0, optimal temperature of 50°C and the activity of that was not decreased by heat treatment for 20 minute at 70°C. And then the activity was increased by Co^{2+} but was slightly inhibited by Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} .

緒 論

Chitin 은 *N*-acetyl glucosamine 의 β -1,4 linkage 로 結合된 polymer 로서 自然界에서는 계, 새우等 의 갑각과 fungi 의 구성분을 이루고 있다.

Chitin 質을 分解할 수 있는 酵素는 달팽이, 갑각류, bean seeds⁽¹⁾, 곤충⁽²⁾等 生物體內에 널리 분포되어 있으나, chitinase 利用의 問題로 微生物에서 由來되는 것이 가장 효과적이며^(3,4), 오늘날 原料용으로 利用되는 효모, 곰팡이 類의 세포벽제거와 해충의 갑각을 分解시켜 살충제의 효과를 증진시킬 수 있는 공업적 이용 가능성을 고려할 때 미생물의 선택과 chitinase 생성에 關한 배양조건도

또한 중요하다. 微生物이 생산하는 chitinase 에 對한 研究는 Reynold⁽⁵⁾와 Berger⁽⁶⁾를 비롯하여 Monreal⁽⁷⁾, Cohen⁽⁸⁾等에 의하여 많이 이루어졌으나, 放線菌이 생산하는 chitinase 에 對한 研究는 別로 알려져 있지 않다.

著者들은 土壤에서 chitinase 를 강하게 分泌하는 *Streptomyces* 屬 菌株중 1 菌株를 分離 選別하여 그 酵素學的 性質 및 培養條件을 검토하여 그 일부를 보고한다.

實驗材料 및 方法

1. 供試菌株

本 實驗에 使用한 菌株는 大邱近郊의 土壤에서

分離한 放線菌을 對象으로 하였다.

2. 菌分離 및 酵素生成培地組成

Glucose 0.1%, chitin 0.1%, peptone 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, NaCl 0.1%, K_2HPO_4 0.05%, (pH 6.8~7.0)와 같은 組成의 培養液을 調製하여 常法에 따라 菌分離를 하였으며 酵素生成培地로 使用할 때는 30°C에서 48時間 진탕培養하였다.

3. 基質調製

Whistler and Bemiller의 變法^(9,10)을 使用하여 調整하였으며 즉, 市販되는 게(crab)의 갑각을 잘 씻어 乾燥시켜 約 200 g을 粉末로 粉碎한 後 $CaCO_3$ 을 除去시키기 위하여 6N HCl을 徐徐히 發泡되지 않을 때까지 加하여 Toyo filter paper No. 2 濾紙로 減壓濾過시켜 증류수로써 pH 5.0가 될 때까지 水洗하고 30°C에서 數日間 乾燥시켜 crude chitin으로 하였다(수량 50 g). 上記의 crude chitin을 다시 粉碎하여 40 mesh 체로 쳐서 cold c. HCl 200 ml를 加하여 0°C에서 3時間 방치 한 후 2000 rpm, 10分間 원심분리하여 沈澱物을 除去하고 上澄液을 5°C에서 2l의 물을 加하여 1日 방치시켰다. 여기서 生成된 colloid성 물질을 다시 濾紙로 減壓濾過하여 모으고 그 濾液은 물을 가하여 1日 방치하는 조작을 pH 5.0이 될 때까지 數回 반복하여 colloid性 chitin을 回收하고 이를 30°C에서 恒量이 될 때까지 數日間 乾燥시켜 實驗에 使用하였다.

4. 酵素液의 調製

上記와 같이 培養한 培養液을 濾過하여 $(NH_4)_2SO_4$ 로써 60%포화시켜 溶解한 後 5°C에서 투석한 液을 酵素液으로 使用하였다.

5. 酵素活性化도 測定方法

生成된 환원당을 Somogyi-Nelson method⁽¹¹⁾에 따라 定量하였으며, 酵素活性化도는 對照區와의 差로써 算出하여 生成된 환원당량을 $\mu M/ml$ 로 나타내었다.

6. 菌株選別

上記와 같은 酵素活性化도 測定方法으로써 土壤으로부터 分離한 *Streptomyces*屬 菌株中 chitinase를 強하게 分泌하는 As 115-5 菌株을 選別하여 그 酵素學的 性質 및 酵素生成條件을 검토하였다.

實驗結果

1. 培養時間에 따른 酵素生成

本 酵素의 培養時間에 따른 酵素生成량을 調査하기 위하여 0~80時間까지 진탕培養한 結果, 48時間 培養에서 최대의 活性을 나타내었으며, 건조 菌체량은 35時間까지 점차 감소되나 그 이후에서 서서히 증가되었고 탁도도 마찬가지로 38時間까지 감소된 후 급격히 증가 되었다(Fig. 1).

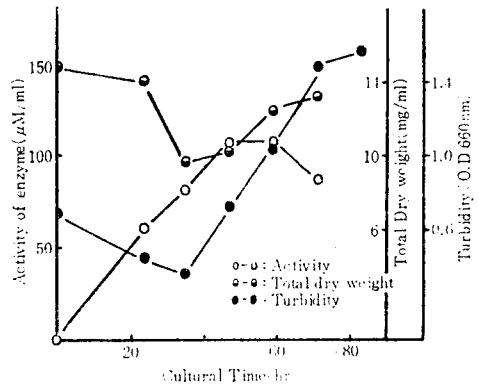


Fig. 1. Enzyme Activity on Cultural Time.

2. 最適 pH 및 pH 安定性

0.05M phosphate buffer를 使用하여 本 酵素의 最適 pH 및 pH 安定性을 調査한 結果 本 酵素의 最適 pH는 7.0附近이었으며, 38°C에서 한 時間 동안 各 pH 別로 前處理시킨 後 N NaOH와 N HCl로써 酵素液의 pH를 中性으로 再調節하고 殘存力價를 測定한 結果, 本 酵素는 pH 6.5~8.0에서 比較的 安定하였다(Fig. 2).

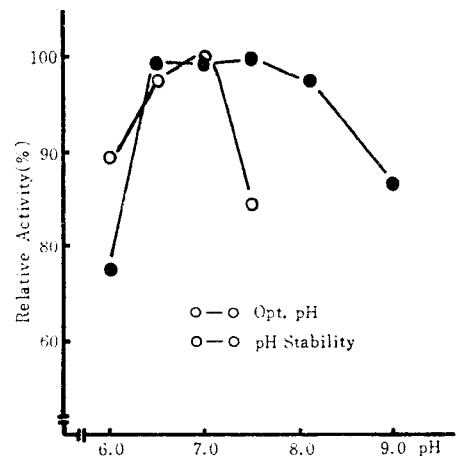


Fig. 2. Effect of pH on Enzyme.

3. 最適溫度

本 酵素作用의 最適溫度를 調査한 結果 50°C 附近에서 가장 높은 活性을 나타내었다(Fig. 3).

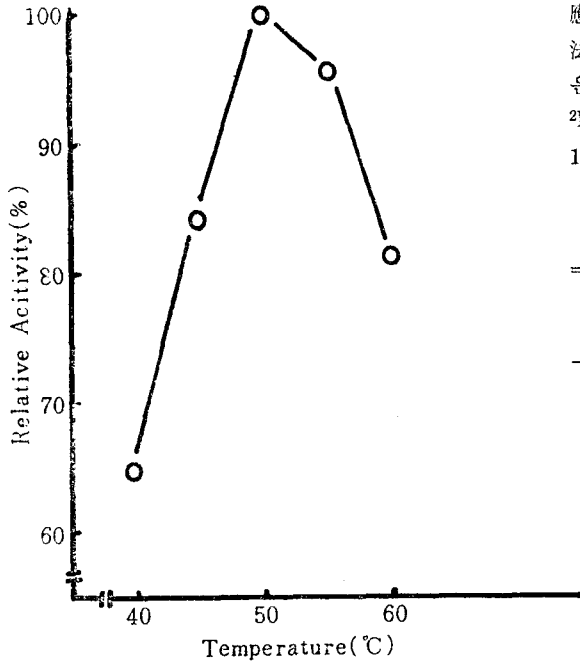


Fig. 3. Effect of Reaction Temperature on the Enzyme Activity.

4. 熱 安定性

本 酵素를 60°C, 70°C, 80°C에서 各各 60分間 熱處理시키면서 經時的으로 그 殘存力價를 測定한 結果 60°C에는 30分間, 70°C에서는 20分間 熱處理하여도 別다른 影響을 받지 않았으나 80°C에서는 10分間 熱處理로 約 50% 정도가 失活되었다(Fig. 4).

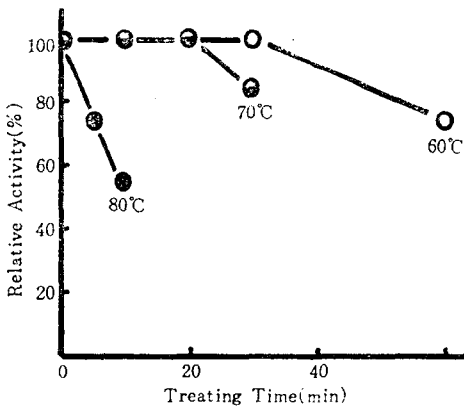


Fig. 4. Heat Stability on Enzyme.

5. 金屬 이온의 影響

여러가지 金屬 이온이 本 酵素作用에 미치는 影響을 調査하기 위하여 金屬 이온 濃度를 本 酵素反應液에 $10^{-2}M$ 및 $10^{-3}M$ 을 加하여 作用시킨 後 上法에 따라 酵素作用을 測定한 結果 Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 은 활성화 作用이 있으나 Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} 는 $10^{-2}M$ 을 添加하였을 때 阻害作用을 나타내었다(Table 1).

Table 1. Effect of Metal Ions on the Enzyme Reaction.

Kinds of Metal	Relative activity (%)	
	$10^{-2}M$	$10^{-3}M$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	163	191
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	140	140
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	120	140
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	81	90
$HgCl_2$	65	70
$NiSO_4 \cdot 7H_2O$	47	116
$PbCl_2$	47	95
$CaCl_2$	100	120
KCl	116	116
$MnCl_2 \cdot 5H_2O$	116	120
$AgNO_3$	84	112
None	100	-

6. 基質種類의 影響

各種 基質에 對한 本 酵素의 活性을 調査하여 本 結果 調製한 chitin에서는 $129 \mu M/ml$ 의 유리 환원당이 生成되는데 對하여 crude chitin에서는 $49 \mu M/ml$ 가 生成되었다. Sarcoma와 Ehrlich를 基質로 使用한 경우에도 유리 환원당이 生成되었으며,

Table 2. Effect of the Various Substrate on Activity of Enzymes.

Substrate	Activity ($\mu M/ml$)	Protein (O. D 280)	Turbidity (%)
Prepared chitin	129	-	-
Crude chitin	49	-	-
Sarcoma	51	1.63	76.8
Ehrlich	28	0.62	86.8
<i>S. cerevisiae</i>	0	0.25	90.3
<i>A. oryzae</i>	96	0.03	91.6
Raw shrimp	0	2.02	-
Rice weevil	44	0.13	-

*Asp. oryzae*의孢子에도本酵素가 비교적强하게作用하는反面 *Saccharomyces* 속과 세우에서는 환원당의 유리는 없었으나 protein의生成을 볼수 있었다(Table 2).

7. 酵素生産에 미치는 glucose 농도의 영향

本酵素의生産을 위하여 基本培地로서 chitin 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.05%, K_2HPO_4 0.1%를 사용하여 glucose 농도별로 0~2.0%까지添加시켜 培養하여 酵素活性도를測定한結果 glucose 농도를 基本培地內에 0.375%添加시켰을 때 가장 높은 活性을 나타냈으며, 그 以上濃度の glucose를 加했을 경우 오히려 本酵素 生産力이 현저히 감소되었다(Fig. 5).

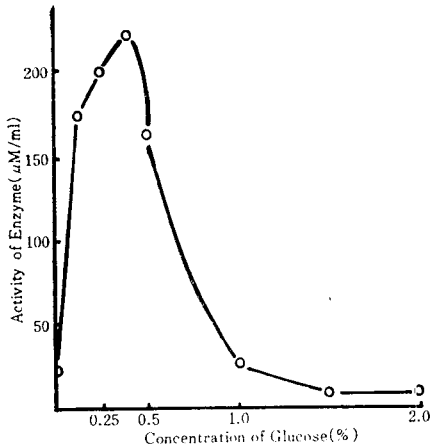


Fig. 5. Effect of Glucose on Enzyme Formation.

8. 酵素의 生産에 미치는 各種 질소원의 영향

各種 窒素源을 添加하여 酵素生産을 調査한 結果 放線菌이 比較的 잘 利用하는 asparagine 이 他

Table 3. Effect of Nitrogen Source on Enzyme Formation.

Nitrogen source	Relative activity (%)	pH
Asparagine	142	8.3
$(NH_2)_2CO$	87	8.1
$(NH_4)_2SO_4$	9	6.9
$(NH_4)_2HPO_4$	13	7.6
NH_4Cl	5	6.9
NH_4NO_3	22	7.1
$NaNO_3$	81	8.1
$NaNO_2$	5	7.3
None	100	7.6

無機窒素源에 比해 本酵素生産에 좋은 影響을 나타내었다(Table 3).

考 察

培養時間에 따른 酵素活性度 測定에서 35時間 培養까지의 全乾燥菌體量과 濁度の 감소는 colloid 狀의 chitin 분해에 의하며 그 以上 培養에서는 菌體增殖에 따라 다시 증가 現象을 나타내는 것 같다. 또한 本酵素의 最適 pH는 7.0 이나 *Phycomyces blakesleeana*⁽⁸⁾와 *Serratia marcescens*⁽⁷⁾ 菌株가 生産하는 chitinase의 最適 pH는 各各 5.5, 6.0의 弱酸性 附近으로서 中性인 pH 7.0에서는 그들의 酵素活性이 급격히 감소하였으며, pH 安定性은 *Streptomyces orientalis* 菌株가 生産하는 chitinase⁽¹²⁾와 같이 pH 6.5~8.0에서 安定하였다. 最適 온도 역시 *Sacharomyces marcescens*, *Streptomyces orientalis*의 chitinase와 本酵素는 同一하게 50°C였으나 熱安定性에 對해서는 *Streptomyces orientalis*의 경우 75°C에서 15分間 熱處理로 거의 100%失活되지만 本酵素는 70°C에서 20分間 熱處理에서도 거의 失活되지 않고 80°C에서 10分間 熱處理하면 約 50%정도 失活되었다. 金屬 이온과의 關係를 보면 *Streptomyces orientalis* 경우 Fe^{2+} 와 Hg^{2+} 을 $10^{-3}M$ 정도 反應액內에 加할 때 約 70%이상 阻害 現象을 나타내고 다른 金屬 이온은 別 影響이 없었는데 比하여 本酵素는 Co^{2+} 이 활성화 作用을 나타내고 있다.

*Sacharomyces cerevisiae*와 眞菌세우에 本酵素를 作用시킨 結果 환원당의 유리는 보이지 않으나 蛋白質의 유리가 나타나는 것으로 보아 外皮에 약간의 손상을 일으킨 것으로 생각된다.

本酵素 生成을 위해 glucose를 基本培地에 0.375% 添加시켰을 때 最大의 酵素生産을 얻을 수 있었으며 그 이상의 glucose 농도를 加할 경우 오히려 酵素生産에 阻害(repression)을 일으킨다고 고려 되어진다.

要 約

1) 土壤에서 分離한 *Streptomyces* 屬中에 chitinase를 强하게 分泌하는 菌 一株를 分離選別하여 그 酵素學的 性質 및 生成條件을 調査하였다.

2) 30°C에서 진탕培養하면서 經時的으로 本酵素 生産을 調査한 바 45時間만에 最大 生産을

보였으며 또한 培地內에 glucose 를 0.375% 添加하였을 때 酵素生産이 最大에 달하였으며 그 이상의 濃度에서는 酵素生産에 오히려 阻害現象이 일어났다.

3) 本酵素의 最適 pH는 7.0, 最適溫度는 50°C 였으며 pH 6.5~8.0에서 비교적 安定하였고 70°C에서 20分間 熱處理에서도 安定하였다.

4) 金屬 이온에 對한 影響은 Co^{2+} 에 의해 活性化 되었고 Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} 등 重金屬인 경우 $10^{-2}M$ 정도의 高濃度에서 約 50% 정도 失活하였다. 또한 本酵素는 *Aspergillus oryzae*에 對해서도 比較的 强하게 作用하였다.

參 考 文 獻

- 1) Powning, R. F. and Irzykiewicz, H. : *Comp. Biochem. Physiol.*, **14**, 127 (1965).
- 2) Waterhouse, D. F. Hackman, R. H. and Mckeller, J. W. : *J. Insect. Physiol.*, **6**, 96 (1961).
- 3) Okimasu, S. and Otakara, A. : *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **34**, 873 (1960).
- 4) Otakara, A. : *Agr. Biol. Chem.*, **25**, 494 (1961).
- 5) Reynolds, D. M. : *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 150 (1954).
- 6) Berger, L. R. and Reynolds, D. M. : *Biochem. Biophys. Acta.*, **29**, 522 (1958).
- 7) Monreal, J. and Reese, E. T. : *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689 (1969).
- 8) Robert, J. Cohen, : *Life Sciences*, **15**, 289 (1974).
- 9) 江上不二不: 多糖類化學, 共立出版社, p 232~237 (1955).
- 10) Bemiller J. N., : *Method in Carbohydrate Chem.*, Vol. 5, Academic Press, p 103 (1965).
- 11) 安藤銳郎, 寺山宏, 西澤一俊, 山川民夫: 生化學研究法 I, 256 (1967).
- 12) Yoshio, T. : *Agr. Biol. Chem.*, **40** (12), 2325 (1976).