

강낭콩 잎에서 정제한 키틴분해효소의 항균활성

박노동 · 송경숙 · 정인웅

전남대학교 농화학과, *경상대학교 식물분자생물학 및 유전자조작 연구센터

초록 : 강낭콩 잎에서 에틸렌에 의하여 유도되는 분자량 30 KD인 염기성 키틴분해효소를 정제하고 그 항균활성을 연구하였다. 이 단백질은 chitinase 활성과 lysozyme 활성을 가졌으며, *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*의 균사 성장을 억제하였다. 그러나 함께 실험한 2종류의 미생물 chitinase, 달걀 lysozyme, 파파야 protease는 이들에 대한 항균작용을 갖지 않았다. 이상의 결과는 lysozyme 활성을 가진 식물 chitinase가 병원균의 균사생장을 억제하여 자신을 방어할 수 있음을 시사한다(1992년 4월 16일 접수, 1992년 5월 16일 수리).

식물세포는 동물과 같은 면역계를 가지고 있지 않기 때문에 다른 기작으로 병원균의 공격에 대응한다. 병원균에 감염되면 식물세포는 항균성 phytoalexin의 생합성에 관여하는 효소, 식물세포벽의 변조(modification)에 관여하는 효소, protease의 저해제들, 병원균 세포벽을 분해할 수 있는 분해효소, elicitor의 생성에 관여하는 효소 등을 생합성 촉진한다. 그 결과 이어서 일어나는 이들의 반응에 의하여 미생물의 감염에 대한 저항성을 획득하는 것으로 보인다.¹⁾

1975년 Mirelman 등²⁾이 wheat-germ agglutinin(WGA)이 *Trichoderma viride*의 발아와 균사 성장을 저해한다는 사실을 최초로 관찰하여 이 렉틴(lectin)이 식물의 방어에 어떤 역할을 할 것임을 제시한 이래, 식물에서 항생물 활성(antibiotic activity)을 갖는 물질의 연구가 활발히 이루어져 왔다. 그중 대표적인 것이 lectin 단백질과 곰팡이 세포벽 분해효소이다. 이들은 크게 phytohemagglutinin(PHA) family(PHA-E, PHA-L, α -amylase inhibitor, arcelin 등)과 chitin-binding family(WGA, rice lectin, datura lectin, tomato lectin, nettle lectin, hevein, chitinase 등)으로 나누어진다. Chitin-binding family에 속하는 단백질은 모두 chitin과 결합하는 부위(hevein domain)을 가지고 있으며, 그중에서 WGA, rice lectin, datura lectin, tomato lectin, nettle lectin 등은 바구미과 유충에 강한 살충력을 가지고 있으며, chitinase, hevein, nettle lectin 등은 항균활성을 가지는 것으로 알려지고 있다.³⁾

키틴분해효소(Chitinase, EC 3.2.1.14)는 곰팡이 세포벽의 주요구성분인 β -1,4-glycosidic linkage를 가수분해시키는 효소로, 식물에서 chitinase는 키틴을 함유하는 병원균의 침입에 대한 방어기능을 담당할 것으로 오래 전부터 추정돼왔다.⁴⁾ Boller 등⁵⁾은 강낭콩 잎의 chitinase가 조제한 *Fusarium oxysporum* 세포벽 성분을 분해하는 것을 관찰하였으며, Roberts와 Selitrennikoff는⁶⁾ 보리에서 정제한 chitinase가 *Trichoderma reesei*, *Alternaria alternaria*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Neurospora crassa*의 성장을 저해하는 것을 관찰하였다. Schlumbaum 등⁷⁾은 강낭콩 chitinase가 *T. viride* 균사의 성장을 저해하며 에틸렌이나 병원균을 처리한 식물체에서 얻은 추출물은 더욱 증강된 항균활성을 갖는 것을 관찰하였다. Mauch 등⁸⁾은 완두의 chitinase와 β -1,3-glucanase를 조합하면 상승적으로 그 항균활성이 강화되는 것을 보고하였다. 한편, *Arabidopsis thaliana*에서 정제된 chitinase는 *T. reesei*의 성장을 저해하였을 뿐 같이 시험한 다른 곰팡이에 대해서는 저해를 보이지 않았다.⁹⁾

상기한 보고들을 종합하여보면, 식물 chitinase는 식물의 *in vivo* 병저항성 기구의 구성체로서 병원균의 침입으로부터 숙주를 방어하는 역할을 한다는 가설을 세울 수 있다. 본 연구에서는 강낭콩 잎에서 에틸렌에 의하여 유도되는 염기성 chitinase를 정제하여 몇가지 종류의 chitinase와 함께 몇가지 곰팡이에 대한 항균활성을 비교 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Chitinase의 정제

강낭콩(*Phaseolus vulgaris*, L.)을 vermiculite 묘상에서 16 : 8의 일광 : 암 조건에서 3주일 재배한 후 묘판을 밀폐된 유리함 속에 옮기고 실험실의 광 조건에서 10 ppm의 에틸렌을 30시간 처리한 다음 잎을 수확하여 chitinase를 추출하였다. 이 추출물에서 전보에¹⁰⁾ 보고한 바대로 Boller 등의 방법에⁹⁾ 준하여 chitinase를 정제하였다.

Chitinase의 활성 및 단백질 정량

Chitinase 활성은 Boller 등의 방법에⁹⁾ 따라 측정하였다. 이 효소의 기질인 swollen chitin과 이 효소의 정제용 regenerated chitin도 이미 보고한 방법에 준하여 조제하였다.¹⁰⁾ 단백질은 bovine serum albumin을 표준으로 사용하여 Bradford법으로¹¹⁾ 정량하였다.

Chitinase의 항균작용(Antifungal activity)

정제된 chitinase의 곰팡이에 대한 항균력을 알아보기 위해 곰팡이(*Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*)를 PDA 배지(감자즙 200g, 포도당 20g, 한천 15g, 증류수 1 L, pH 5.6)에서 3일 배양하여 colony 직경이 3~4 cm 정도가 되면, 직경 5 mm의 멸균된 filter paper를 colony 끝부분으로부터 5 mm 정도 떨어진 곳에 놓고, 0.2 µm filter를 통하여 멸균된 효소용액 50 µl를 여지에 적가한 다음 30 °C에서 8~12시간 배양 후에 inhibition zone을 관찰하였다.⁶⁻⁷⁾

시약

본 실험에서 사용된 효소 *Serratia marcescens* chitinase, *Streptomyces griseus* chitinase, egg white lysozyme, papaya protease는 미국 Sigma사에서 구입하여 그 효소 활성을 확인한 후에 사용하였다.

결과 및 고찰

Chitinase의 항균활성(Antifungal activity)

강낭콩 잎에서 정제된 키틴분해효소는 분자량 30 KD의 염기성 endochitinase이다.^{5,10,12)} 우리는 이 단백질의 항균작용 여부를 균사 성장억제 측정법으로 시험하고자 하였다. Fig. 1에 보이대로 이 정제된 chitinase는 *A. fumigatus*의 균사의 성장을 억제하였으며, 디스크 하나당

정제된 효소 2 µg을 적가한 경우에도 *A. fumigatus*의 균사생장은 뚜렷이 저해되었다. 이는 chitinase가 곰팡이의 성장하는 균사의 chitin 구조체를 직접 분해하거나 이의 형성을 저해하여 나타난 결과로 보인다.

우리는 이제 이 정제된 단백질이 *A. fumigatus* 이외의 곰팡이에도 항균활성을 나타내는지와 어떤 농도에서 항균활성을 갖는지를 알아보고자 하여 몇가지 곰팡이에 대한 항균작용을 정량적으로 조사하였다. Table 1에 나

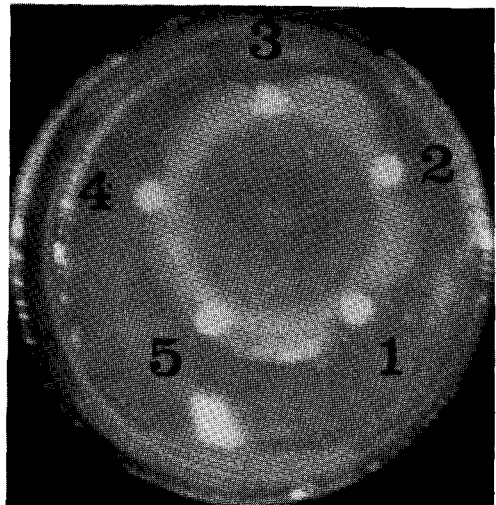


Fig. 1. Antifungal activity of the purified bean chitinase against the growth of *A. fumigatus* assessed by the hyphal-extension inhibition assay. Serial dilutions of the protein in 50 µl of 10 mM sodium acetate (pH 5.0) applied to discs 1 through 4 so that 10, 5, 2, 0.5 µg of chitinase were applied, respectively. An equal volume of the buffer was applied to disc 5 as a buffer blank (control)

Table 1. Antifungal activity of the purified bean chitinase against the growth of various fungi assessed by the hyphal-extension inhibition assay

Concentration	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Buffer	-	-	-	-
0.5 µg	-	-	-	-
1.0 µg	+/-	+/-	+/-	-
2.0 µg	+	+/-	+	+/-
5.0 µg	++	+	++	+
10.0 µg	+++	+	+++	++

- : No inhibition, +/- : Doubtful, + : Weak inhibition, ++ : Moderate inhibitions, +++ : Serious inhibition

타넨대로 이 chitinase는 그 정도의 차이는 있었으나 2.0 µg/disc 이상에서 시험한 4가지 곰팡이 *A. fumigatus*, *F. oxysporum*, *R. solani*, *B. cinerea*의 균사 생장을 억제하였다. 그러나 *B. cinerea*에 대해서는 그 억제작용이 강하지 않았다. 식물 키틴분해효소의 항균활성에 관한 몇몇 보고를 살펴보면 곰팡이의 종류에 따라 그 항균활성이 상이함을 알 수 있다. 산사나무, 밀, 토마토에서 정제된 키틴분해효소는 *Trichoderma hydatum*과 *P. blakesleeanus*의 균사생장과 포자발아를 억제하였으나, *B. cinerea*의 균사 생장은 억제하지 않았다.¹³⁾ *Arabidopsis* chitinase는 *T. reesei*의 균사생장은 억제하지만 *A. solani*, *F. oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Phytophthora megasperma*의 생장을 억제하지 않았다.⁹⁾ 이러한 감수성의 차이는 아마도 균사 세포벽의 구성분과 구조의 차이에서 일부 기인되었을 것으로 보인다.⁹⁾

몇가지 chitinase와의 항균활성의 비교

Table 2. Antifungal activities of some crude enzymes against the growth of various fungi assessed by the hyphal-extension inhibition assay

Source	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
Bean chitinase	++	+	+	+
<i>Serratia marcescens</i> chitinase (C1050)	-	-	-	-
<i>Streptomyces griceus</i> chitinase (C6137)	-	-	-	-
Egg white lysozyme (L6876)	-	-	-	-
Papaya protease (P4880)	-	-	-	-

Each protein of 5 µg was placed on sterile paper disc around the perimeter of the fungal culture and a crescent shaped zone of inhibition was observed around the disc. The numbers in parentheses are Sigma product numbers.

- : No inhibition, + : Weak inhibition, ++ : Moderate inhibition

이러한 결과를 바탕으로 몇가지 서로 다른 생물체에서 얻은 키틴분해효소와의 항균작용을 비교 시험하였다. Table 2에 나타낸대로 본 연구에서 정제한 강낭콩 chitinase만이 항균활성을 가졌을 뿐 *Serratia marcescens*와 *Streptomyces griceus*에서 얻은 2종의 미생물 chitinase, 동물 lysozyme, protease 모두 항균작용을 나타내지 않았다.

현재까지 연구된 바에 의하면, 일반적으로 식물 chitinase는 항균작용을 갖는 반면 미생물 chitinase는 그 활성이 없거나 낮은 것처럼 보인다. *Streptomyces* chitinase와 β-1,3-glucanase는 단독으로는 균사의 벽을 분해하지 못하지만, 함께 작용하면 균사의 벽을 분해하였다.¹⁴⁾ 한편, *Serratia marcescens*, *Streptomyces griceus*, *Pseudomonas stutzeri*에서 정제한 키틴분해효소는 밀, 보리, 옥수수에서 정제한 그것과는 달리 항균작용을 보이지 아니하였다.⁶⁾ 본 연구에서도 미생물 chitinase와는 달리 강낭콩 chitinase만이 항균활성을 보였다. 이러한 차이는 어디서 비롯되는 것일까? 그 가능한 해답으로 식물 키틴분해효소는 주로 endochitinase 활성과 함께 상당한 lysozyme활성을 가지는 반면 미생물의 그것은 주로 exochitinase활성을 가지며 동물의 lysozyme은 아주 낮은 chitinase활성을 가진다는 사실을 고려하게 되었다.⁵⁻⁶⁾

이중활성의 강낭콩 chitinase

파파야와 무화과 유액에서 정제한 식물 lysozyme은 높은 chitinase활성을 함께 가지고 있다는 보고와¹⁶⁻¹⁷⁾

Table 3. Enzyme activities of the purified protein for various substrates

Assay	Specific activity (Unit/mg protein)
Chitinase	60.08
β-Hexosaminidase	0.14
β-Galactosidase	0.14
β-Glucosidase	0.14
Lysozyme	25.0
Neuraminidase	0

Aliquots of the purified protein were incubated with swollen chitin for chitinase,⁵⁾ p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide for β-hexosaminidase,¹⁸⁾ p-nitrophenyl-β-D-galactoside for β-galactosidase,¹⁹⁾ p-nitrophenyl-β-D-glucoside for β-glucosidase,¹⁹⁾ *Micrococcus lysodeikticus* cells for lysozyme,²¹⁾ and muscin for neuraminidase,²⁰⁾ respectively.

정제한 식물 키틴분해효소가 lysozyme활성을 가지고 있다는 보고에 근거하여,⁵⁾ 본 연구에서 정제한 chitinase가 위에서 관찰한 항균활성과 관련된 다른 효소활성을 가지는지를 시험하였다. Table 3에 나타낸대로 정제된 강낭콩 chitinase는 β -hexosaminidase,¹⁸⁾ β -glucosidase,¹⁹⁾ β -galactosidase,¹⁹⁾ neuraminidase²⁰⁾ 등의 활성은 갖지 않았으나 상당한 lysozyme활성을²¹⁾ 가지고 있었다. 본 실험에 사용된 키틴분해효소는 전보에¹⁰⁾ 보고한 대로 순수하게 정제된 30 KD의 염기성 chitinase였다. 그러므로 이 키틴분해효소는 한가지 단백질이 두가지 효소활성을 갖는 이중활성 단백질(bifunctional protein)인 chitinase/lysozyme이라고 간주할 수 있다. Boller 등⁵⁾은 정제된 강낭콩 chitinase가 *F. oxysporum* 세포벽 성분을 분해하는 것을 관찰한 바 있는데, 그들은 이 두 효소활성이 한 단백질의 두가지 작용일 것이라고 제시하였었다. Martin은²²⁾ 고무나무 유액에서 chitinase와 lysozyme 활성을 동시에 갖는 6종의 chitinase/lysozyme isozyme을 분리하였으며, Ary 등²³⁾도 *Coix lachryma jobi* 종실에서 α -amylase inhibitor 활성을 동시에 갖는 chitinase/ α -amylase inhibitor를 전제한 바 있다.

식물체는 널리 분포하는 chitinase/lysozyme의 활성은 건강한 식물체에서 대단히 낮지만 에틸렌에 의하여 강하게 유도되며,^{10,12)} 이 효소의 기질은 식물체에는 존재하지 않지만 곰팡이 세포벽 성분의 키틴과 박테리아 세포벽의 펩티드 글리칸이 그 천연의 기질이며, 정제된 30 KD의 chitinase는 몇가지 병원균의 균사 생장을 억제하였다는 점 등을 고려할 때, 이 단백질이 식물의 병저항성 반응과 깊은 상관이 있다고 믿어진다. 특히, 본 연구에서 정제한 염기성 chitinase의 두가지 활성, 즉 endochitinase활성과 lysozyme활성이 이 키틴분해효소의 생물활성과 관련하여 중요한 인자가 될 것으로 생각된다.

사 사

이 논문은 1991년도 교육부 유전공학연구 조성비와 한국과학재단 PMBBRC의 연구비 지원에 의하여 연구된 내용의 일부입니다.

참 고 문 헌

1. Broglie, K. E., Gaynor, J. J. and Broglie, R. M. :

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 6820(1986)
 2. Mirelman, D., Galun, E., Sharon, N. and Lotan, R. : Nature 256 : 414(1975)
 3. Chrispeels, M. J. and Raikhel, N. V. : Plant Cell, 31 : 1(1991)
 4. Abeles, F. B., Bosshart, P. P., Forrence, L. E. and Habig, W. E. : Plant Physiol., 44 : 129(1971)
 5. Boller, T., Gehri, A., Mauch, F. and Vogeli, U. : Planta 157 : 22(1983)
 6. Roberts, W. K. and Selitrennikoff, C. P. : J. General Microbiol., 134 : 169(1988)
 7. Schlumbaum, A., Mauch, F., Vogeli, U. and Boller, T. : Nature, 324 : 365(1986)
 8. Mauch F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. : Plant Physiol., 88 : 936(1988)
 9. Verburg, J. G. and Khai Huynh, Q. : Plant Physiol., 95 : 450(1991)
 10. Park, R. -D., Lee, C. -M. and Park, N. -Y. : Kor. Biochem. J., 24 : 121(1991)
 11. Bradford, M. M. : Anal. Biochem., 72 : 248(1976)
 12. Park, R. -D., Lee, C. -M. and Jhon, D. -Y. : Kor. Biochem. J., 25 : 101(1992)
 13. Broekhaert, W. F., Van Parijs, J., Allen, A. K. and Peumans, W. J. : Physiol. Mol. Plant Pathol., 33 : 319(1988)
 14. Skujins, J. J., Potgieter, H. J. and Alexander, M. : Archives of Biochem. Biophys., 111 : 358(1965)
 15. Kim, Y. S., Lee, K. B. and Lindhardt, R. J. : Korean Biochem. J., 24 : 466(1991)
 16. Glazer, A. N. and Barel, A. Q., Howard, J. B. and Brown, D. M. : J. Biol. Chem., 244 : 4583(1969)
 17. Howard, J. B. and Glazer, A. N. : J. Biol. Chem., 242 : 5715(1967)
 18. Rome, L. H., Garvin, A. J., Allietta, M. M. and Neufeld, E. F. : Cell, 17 : 143(1979)
 19. Craven, G. R., Steers, E. and Anfinson, C. B. : J. Biol. Chem., 240 : 2468(1965)
 20. Warren, L. L. : J. Biol. Chem., 234 : 1971(1959)
 21. Shugar, D. : Biochem. Biophys. Acta, 8 : 302(1952)
 22. Martin, M. N. : Plant Physiol., 95 : 469(1991)
 23. Ary, M. B., Richardson, M. and Shewry, P. R. : Biochim. Biophysic. Acta, 999 : 260(1989)

Antifungal activity of a chitinase purified from bean leaves

Ro-Dong Park, Kyong-Sook Song and Ihn-Woong Jung(Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea)

Abstract : In order to elucidate the plant-microorganism relationship, we purified an ethylene-inducible, basic 30 KD endochitinase from bean leaves and studied its antifungal activity by a hyphal extension-inhibition assay. The purified chitinase was effective in the inhibition of hyphal growth of *Aspergillus fumigatus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*, while microbial chitinases of *Serratia marcescens* and *Streptomyces griseus*, egg white lysozyme and papaya protease didn't affect hyphal growth of the fungi. The chitinase degraded the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*, suggesting the lysozyme activity of the chitinase. We discussed the implication of the bifunctional chitinase/lysozyme activities of the protein with hydrolysis of chitin in the rapidly extending hyphae of the fungi.