

Chitinase Inhibitor 생산 균주의 분리와 곤충탈피 억제효과

成洙一·金 權·成樂文·姜玆科
水原大學校 遺傳工學研究所

Isolation of Chitinase Inhibitor-producing Microorganisms and Their Inhibitory Effect on Larval-Pupal Ecdysis

Su Il Seong, Keun Kim, Nack Moon Sung and Hyun A Kang
Institute of Genetic Engineering, The University of Suwon, Suwon, Korea

Abstract

Crude fermentation broths of two bacterial isolates, S-11 and S-25, from about 200 soil samples, showed inhibitory activities against the crude chitinase prepared from alimentary canals of the silkworm, *Bombyx mori*, as well as against reagent chitinase from *Streptomyces griseus*, in vitro. The chitinase inhibitors also exhibited insecticidal activities by preventing larval-pupal ecdysis when these broths were injected into the silkworm larvae during spinning.

Key words : Silkworm, chitinase inhibitor, ecdysis, fermentation broth.

序 論

Chitin은 *N*-acetyl-D-glucosamine의 β -1,4 配糖結合에 의한 糖 중합체로서 곤충에서는 단백질과 결합을 이루며 곤충의 표피(cuticle)층을 형성하고 있다. 곤충의 성장과 변태를 위한 탈피과정에는 新舊 표피의 갱신이 수반되며 이 때 곤충의 표피에서는 낡은 표피층에서의 chitin 분해와 새로운 표피의 형성을 위한 chitin의 생합성이 동시에 이루어진다. 이러한 표피의 갱신에는 chitin의 합성효소(chitin synthetase)와 분해효소(chitinase)가 함께 관여하고 있으며 이들 효소의 활성을 억제하는 새로운 형태의 곤충성장조절제가 대두되고 있다(Kramer and Koga, 1986).

Chitin synthetase 억제물질에 관한 연구는 1970년대 초부터 연구가 진행되어 현재 polyoxin, nikkomycin 등의 새로운 곤충성장조절제가 알려져 있으나 (Cohen and Cashida, 1982), chitinase의 억제제에

관한 연구는 비교적 늦게 시작되었다. 최근 Sakuda *et al.*(1987)은 토양미생물의 배양액으로부터 누에의 용화를 억제하는 chitinase inhibitor 물질을 추출하여 allosamidin이라 명명하고 그 후 이 물질을 순수 분리하여 그의 분자구조를 밝히는데 성공하였다(Koga *et al.*, 1987; Sakuda *et al.*, 1987). 한편 Somers *et al.*(1987)는 새로운 chitinase inhibitor 선발법에 의해 역시 토양 미생물로부터 A82516라는 chitinase의 억제물질을 얻어냈다.

당 연구실에서는 무공해 살충제 개발에 관한 연구의 일환으로 우리나라의 전라남도 여수를 비롯한 전국 각지로부터 80 여점의 토양을 채취하여 200여종의 방선균을 분리해내고 이들 균들이 분비한 배양산물액을 대상으로 한 chitinase inhibition 검사와 아울러 누에를 이용한 생물검정을 통하여 chitinase의 활성을 억제하는 2개의 유효균주를 선발하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 토양시료의 채취

인천, 전남 여수를 비롯한 전북 덕유산, 경기 제부도 등 전국 각지로부터 토양층 5-8 cm 깊이의 토양시료 80여점을 채취하였다. 채취한 시료는 실온에 보관하여 될수록 빠른 시일안에 방선균과 세균을 분리하였다.

2. 방선균의 분리 · 보존용 배지

방선균의 분리용 배지는 Benett's agar medium을 사용하였고, 보존용 배지는 Benett's agar medium에서 항균제 nystatin 성분을 뺀 것 이외는 분리용 배지와 동일하였다. Benett's agar medium의 조성은 다음과 같다.

Glucose	1.0 %
Peptone	0.2 %
Beef Extract	0.1 %
Yeast Extract	0.1 %
Nystatin	5 ug/ml
Agar	1.5 %
(Final pH	7.2)

3. 방선균의 분리

토양시료 1g에 멸균한 생리 식염수 10ml를 넣고 잘 교반한 후 멸균수로 희석(10^{-2})하여 그 0.1ml를 petri-dish상의 방선균 분리배지에 도말하였다. 배양은 30°C 에서 3-5일간 행하였고 1차로 분리된 방선균은 방선균 보존용 배지에 접종하여 30°C 에서 1주일간 배양한 후 냉장고(4°C)에 보존하였다.

4. 미생물의 배양

Nystatin이 첨가되지 않은 Benett's broth 10ml을 16mm×125mm의 시험관에 분주하여 보존중인 방선균들을 접종한 후 5일간 30°C 에서 160 rpm으로 배양하였다. 배양완료 후 2,500g에서 20분간 원심 분리하여 cell mass를 제거한 다음 그 상등액을 5분간 끓여 chitinase inhibition test의 시료로 사용하였다.

5. Colloidal chitin의 조제

Colloidal chitin의 조제는 Angela(1986)의 방법에 기초하였다. 즉 Chitin(Sigma, practical grade) 100g에 농염산 2l를 넣어 4°C 에서 12시간 교반한 후 glass wool로 여과하고 걸러진 여과물에 차가운 증류수

1l를 가하여 6,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 얻어진 침전물은 5N NaOH로 pH 7까지 중화시킨 후 6,000×g에서 15분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물에 2l의 증류수를 넣어 6,000×g에서 15분간 원심분리하고 이 과정을 4-5회 반복하여 침전물을 충분히 세정하였다. 이렇게 하여 얻어진 colloidal chitin은 저온에 보관하여 chitinase 효소반응의 기질로 사용하였다.

6. Chitinase crude enzyme의 조제

Chitinase 활성측정에는 Kimura(1981)의 방법에 따라 누에의 소화관에서 추출한 crude enzyme를 효소원으로 하였다. 즉, 화용직후의 누에로부터 채취한 중장소화관에 50mM의 citric acid- Na_2HPO_4 완충액(pH 5)을 넣어 마쇄한 후 원심분리하여 얻어진 상등액에 황산암모니움을 서서히 가하여 70%의 포화 황산암모니움액을 얻었다. 이 포화액을 원심분리하여 침전물을 얻고 처음 중장소화관의 마쇄에 사용하였던 완충액을 누에 1.5마리당 1ml의 비율로 넣어 침전물을 용해한 후 -70°C 에 보존하여 효소반응시 chitinase의 효소원으로 사용하였다.

7. Colloidal chitin을 기질로한 chitinase 활성측정

Chitinase의 활성은 Kimura(1973)의 방법에 따라 colloidal chitin과 crude enzyme의 반응산물인 *N*-acetylglucosamine의 양을 비색 정량함으로써 측정하였다. 효소반응액은 0.2M acetate buffer(pH 5.2) 0.1 ml, colloidal chitin(1.25mg of chitin) 0.2ml, crude enzyme 0.2ml와 여기에 chitinase inhibitor의 검출을 위한 토양 미생물 배양액 0.4ml를 넣어 반응을 시켰으며 대조구는 배양액 대신 같은 양의 증류수를 넣어 효소반응에 들어갔다. 효소반응은 37°C 의 항온조에서 6시간 진행하였고 반응완료 후 0.6ml의 증류수를 넣어 반응액을 희석한 후 100°C 에서 3분간 가열하여 효소반응을 정지시켰다. 반응액은 잠시 차가운 물로 식힌 후 17,000×g에서 20분간 원심하고 얻어진 상등액내의 chitin의 분해산물 *N*-acetylglucosamine의 양을 비색정량 하였다.

N-acetylglucosamine의 비색정량은 Waterhouse *et al.*(1961)의 방법에 따라 행하였다. 즉 원심상등액 0.5 ml에 acetate buffer(0.08M, pH 5) 0.5ml을 넣고 여기에 포화 sodium borate 0.3ml을 가하여 충분히 교반한 후 7분간 끓는 물 속에서 중탕하였다. 중탕 후 차가운 물속에서 7분간 식힌 다음 8.7ml의 빙초산을 넣고 여기에 사용직전 조제한 Ehrlich시약(*p*-dimethylaminobenzaldehyde 1g, 빙초산 50ml, 농염산

2.5ml) 1ml을 가하여 충분히 교반한 후 실온에서 30 분간 발색시키고 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Chitin azure를 기질로한 chitinase inhibition 검정

Colloidal chitin과 crude enzyme을 사용하여 chitinase inhibition을 나타내는 균주를 1차로 선발하고 선발된 유효 균주를 대상으로 市販의 chitin azure와 chitinase를 사용하여 chitinase의 억제능을 재확인하였다(Somers et al.1987). 즉, chitin azure(Sigma) 1.2 ml(4.8mg/1.2ml 0.1M acetate buffer), chitinase(Sigma) 1.2ml(8.6 unit/1.2ml), 0.1M acetate buffer(pH 5.0) 1.2ml, 미생물배양액 0.6ml에 항생제 Merthiolate (10%)를 첨가하여 효소반응액을 만들고 37°C의 항온조에서 효소반응을 시켰다. 반응개시 후 2시간후 반응혼합액으로부터 1.5ml를 취하여 2,500×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 570nm에서 흡광도를 측정하고 나머지 반응액은 효소반응을 계속하여 반응개시 12시간후 위와 같은 방법으로 원심분리하여 상등액의 흡광도를 측정하였다. 이렇게 얻어진 흡광도값으로부터 반응 2시간을 기준으로 한 반응 12시간에서의 미생물 배양액 첨가에 의한 chitinase 억제능을 산출하였다(표 3참조).

9. Chitinase inhibitor 균주의 생물검정

토사 개시 후 2일 및 3일 되는 누에에 chitinase inhibition 효과를 나타낸 균주의 배양액을 마리당 20 μl씩 주사하고 이후 25°C에 보호하며 용화 탈피 여부를 조사하였다. 대조구의 누에에는 같은 양의 chitinase inhibition 효과가 없는 균주의 배양액을 주사하여 역시 용화탈피의 여부를 조사하였다.

結 果

전국에서 수집된 토양시료로부터 약 200 여종의 방선균을 분리해내고 이들 균주의 배양 산물액에 대한 chitinase inhibition 조사 및 생물검정을 행하였다.

표 1은 colloidal chitin을 기질로 하고 화용 직후의 누에 중장 소화관으로부터 조제한 crude enzyme을 chitinase의 효소원으로 한 효소반응액에 200여 토양 미생물의 배양액을 넣어 남아있는 chitinase의 활성을 조사한 결과 중 효소의 활성이 낮았던 15개 균주의 효소활성비를 나타낸 것이다. 남아있는 효소활성비가 낮을 수록 배양액의 chitinase inhibition 효과는 큰 것이 된다. 이 균주들로부터 효소활성비가 50% 미만인 S-11과 S-25를 chitinase inhibitor 유효균주로 선

Table 1. Chitinase Inhibitor Effect with Colloidal chitin-Crude Enzyme Reaction

	A	B	C	% Enz. Activity [(A-B)/C×100]
S-25	0.108	0.031	0.226	34.1
S-11	0.153	0.051	〃	45.1
S-45	0.162	0.046	〃	51.3
S-74	0.160	0.036	〃	54.9
S-153	0.145	0.020	〃	55.3
S-18	0.159	0.031	〃	56.6
S-73	0.163	0.023	〃	61.9
S-38	0.171	0.018	〃	67.7
S-42	0.182	0.029	〃	67.7
S-36	0.182	0.022	〃	70.8
S-22	0.175	0.011	〃	72.6
S-71	0.188	0.012	〃	77.9
S-23	0.200	0.020	〃	79.7
S-17	0.203	0.019	〃	81.4
S-3	0.259	0.015	〃	107.9

A : Absorbance of complete reaction mixture including enzyme and fermentation broth

B : Absorbance of reaction mixture lacking enzyme

C : Absorbance of un-inhibited enzymatic reaction

Table 2. Chitinase Inhibitor Effects with Chitin Azure-Chitinase Reaction

	Incubation time	A	B	C
S-11	2 hr	0.098	0.054	0.046
S-25	〃	0.082	0.041	〃
S-11	12 hr	0.103	0.056	0.135
S-25	〃	0.098	0.043	〃

A, B, C are same as explanations for table 1.

Table 3. Percent enzyme activities of S-11 and S-25 during 2 - 12 hours of incubation time

	A(12 ^h -2 ^h)	B(12 ^h -2 ^h)	C(12 ^h -2 ^h)	% Enz. Activity
S-11	0.005	0.002	0.09	3.3
S-25	0.016	0.002	〃	15.5

% Enz. Activity = (A-B)/C×100

발하였다.

다음, 선발된 S-11 및 S-25 균주를 대상으로 Somers et al.(1987)의 방법에 따라 이들 균주의 chitinase에 대한 억제효과를 재확인하였다. 표 2는 구입한 Sigma 제품의 chitin azure와 chitinase를 사용한 효소반응액에 각각 S-11 및 S-25 균주의 배양액을 넣어 2시간 및 12시간 효소반응 시킨 후 기질 chitin azure의 분해물을 570nm에서 비색정량한 결과이다.

그리고 이 결과를 토대로 효소반응 2시간을 기준으로 한 반응 12시간에서의 chitinase 활성에 대한 inhibitor의 억제능을 효소활성비로 나타냈다(표 3). Percent(%) 효소활성도는 chitinase에 의한 chitin azure의 분해정도를 나타내는 것으로써 chitin azure가 같은 시간내에 inhibitor의 간섭없이 chitinase만에 의해 분해되는 양 100에 대한 상대적 분해능을 말하며 따라서 이 값이 작을 수록 배양액의 chitinase활성에 대한 억제능은 크다 하겠다.

표 3에서와 같이 S-11과 S-25는 각각 3.3%와 15.5%의 percent(%) 효소활성도를 나타냄으로써 이들 균주의 배양액이 첨가된 효소반응액에서는 반응 12시간 후에도 chitinase에 대한 효소활성이 계속 억제되고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

이상의 실험에 의해 선발된 S-11과 S-25 균주의 배양액이 실제 곤충의 탈피를 억제시키는 지의 여부를 알기 위해 누에를 대상으로 생물검정실험을 행하였다.

토사개시 2일째와 3일째의 누에에 각각 누에 마리당 20 μ 의 균 배양액을 주사하고 또 2일째와 3일째

Table 4. Chitinase Inhibitor Effects in Bioassay Experiment

	S2	S3	S2.S3
control	4	5	4
S-3	4	5	4
S-11	1	0	0
S-25	0	1	1

S2 and S3 represent 2 day- and 3 day-elapsed prepupa after spinning, respectively. Each number means ecdysed pupae among five treated silkworms. Each silkworm was injected with 20 μ of fermentation broth. Same amount of medium was also treated as control.

에 1회에 20 μ 씩 2회에 걸쳐 주사했을 때의 용화 탈피 성적을 보면 표 4와 같다. 즉 S-11 및 S-25 주사구는 순 시험구에 걸쳐 용화탈피가 극히 불량한 반면 억제효과가 없었던 S-3구나 미생물 배지성분만을 주사한 대조구에서는 대부분 용화탈피가 이루어졌다. S-11 및 S-25 주사에 의해 용화탈피가 억제된 누에는 유충의 표피를 유지한 채 수일간 생존하다가 마침내 폐사하였다(그림 1).

考 察

전국에서 수집된 200여 토양 미생물을 대상으로 colloidal chitin과 crude enzyme를 사용한 효소반응 실험을 통해 1차로 곤충의 chitinase의 활성을 억제하는 2개의 균주선발에 성공하였다. 선발된 이들 균주의 배양산물액을 시판의 chitin azure와 chitinase를 사용한 효소반응에 첨가하여 본 결과 역시 강력한 효소억제효과가 있음이 확인되었다. 다만 S-11과 S-25의 억제정도가 실험방법에 따라 달라 1차선발에서는 S-25(34.1%)가 S-11(45.1%)에 비해 효소억제능이 다소 강하였던 반면 chitin azure-chitinase 실험에서는 S-11(3.3%)가 S-25(15.5%)에 비해 월등히 높은 효소억제력을 보였는데 이것은 효소반응에 사용한 효소원의 차이에서 오는 것으로 생각된다. 즉 1차 선발의 효소원은 누에의 증장소화관에서 추출한 crude enzyme이고 구입한 시판의 chitinase는 *Streptomyces griseus*에서 추출한 정제품으로써 이들 양 효소의 분자구조 및 효소기능상의 차이 등이 효소활성에 대한 inhibitor 물질들의 효소저해작용에도 차이를 가져온 것으로 생각된다.

미생물 배양액의 pH가 누에의 용화억제에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 선발된 두 균주의 배양산물액의 pH가 3정도의 강한 산성을 나타냄으로써

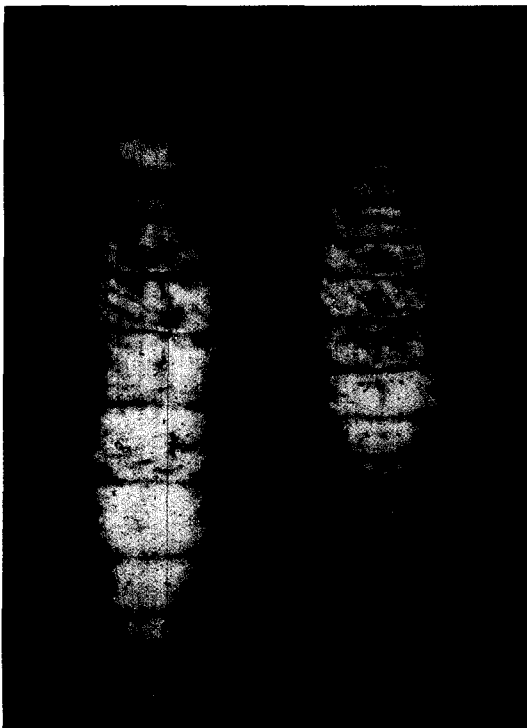


Fig. 1. Non-ecdysed silkworms. Culture supernatant of S-25 strain was injected into 2 to 3 day-elapsed prepupa after spinning.

이들 균 배양액의 용화탈피에 대한 억제능이 이와같은 낮은 pH에 원인이 있지 않나 생각되었으나 균 선발에 공시된 대부분 균주의 배양액들이 거의 같은 정도의 낮은 산도를 나타내었을뿐만 아니라 탈피 억제능이 극히 저조하였던 S-3 균의 배양액은 pH 1의 더욱 강한 산성을 나타냄으로써 배양액의 낮은 pH가 효소활성 저해에 직접 관여하였을 가능성은 배제되었다.

토사후 2-3일 경과한 누에에 배양산물액을 주사하여 용화탈피 여부를 조사한 생물검정 실험은 배양액 내에 chitinase inhibitor 물질이 존재하고 있음은 물론 그 억제정도가 곤충의 탈피억제라고 하는 발육 異常까지도 유도할 수 있는 강력한 것임이 판명되었다. 이와같은 생물검정에 관한 실험은 앞으로 누에의 공시두수를 확대하여 투여량 및 농도, 주사시기 등에 관해서도 보다 상세한 검토가 요구된다 하겠다. 또한 용화탈피 외에 유충탈피시에도 동일한 chitinase 억제작용을 나타낼 것인지에 대하여도 앞으로 연구할 과제로 남긴다.

현재, S-11이나 S-25는 균주의 정확한 균의 同定은 아직 되어 있지 않으나 균의 형태적 및 생리적 특성 등에 미루어 방선균의 일종으로 간주되고 있다. 이들 균주는 5일간의 배양에 의해 S-11은 담갈색을, S-25는 진한 갈색을 각각 나타내는데 아직 뚜렷하게 확인할 수 없는 배양조건에 따라서는 이와같은 색소형성이 안되는 경우도 있었다. 색소형성이 안된 배양액은 chitinase의 억제능이 없었던 사실에 미루어 배양액 내에 존재하는 효소억제 물질은 이들 색소와 밀접한 관계가 있을 것으로 예상되며 따라서 이 색소들은 금후 이 물질의 분리 및 동정과정에 유용한 marker로 이용될 가능성이 크다 하겠다. 앞으로 S-11 및 S-25 균의 동정, inhibitor 생산력 증대를 위한 균 배양조건의 검토, 돌연변이 유발에 의한 보다 강력한 inhibitor 생산균주의 육성 등에 관한 연구외에 chitinase inhibitor물질의 분리, 동정, 분자구조의 해명을 통해 현재 토양미생물로부터 동일한 효소활성 억제제로 그 분자구조가 밝혀진 Allosamidin(Sakuda et al., 1987) 및 이들 유사물질(Somers et al., 1987)과의 관계도 밝혀져야 할 것이다.

要 約

전국에서 수집한 토양시료로부터 약 200 여종의 미생물을 분리해내고 이들 균주의 배양 산물액을 대상으로 chitinase 억제능을 조사하였다. 그 결과 누에의 증장 소화관에서 추출한 chitinase crude enzyme과 시판의 정제된 chitinase에 대하여 공통으로

효소의 활성을 억제하는 2개의 균주 S-11과 S-25를 선발하는데 성공하였다. 이들 균주의 배양 산물액을 토사기의 누에에 주사한 결과 대부분의 누에가 용화탈피에 실패하였다.

感謝의 말

본 연구는 한국 학술진흥재단의 '88 학술연구조성비(대학부설연구소) 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

引用 文 獻

- Angela Belt, J. C. Hunter-Cevera, and M. E. Fonda (1986) Isolation of cultures. in, Manual of industrial Microbiology and Biotechnology, (Arnold L. D., N. A. Solomon). American society for Microbiology, Washington, D. C. pp. 3-23.
- Cohen, E. and J. E. Cashida (1982) Properties and inhibition of insect integumental chitin synthetase. Pestic. Biochem. Physiol. 17; 301-306.
- Kimura, S. (1973) The control of chitinase activity by ecdysterone in larvae of Bombyx mori. J. Insect Physiol. 19; 115-123.
- Kimura, S. (1981) The occurrence of chitinase in the alimentary canal of the silkworm, Bombyx mori. J. Sericult. 50(2); 101-108.
- Koga, D., A. Isogai, S. Sakuda, S. Matsumoto, A. Suzuki and S. Kimura (1987) Specific inhibition of Bombyx mori chitinase by allosamidin. Agric. Biol. Chem. 51(2); 471-476.
- Kramer, K. J. and D. Koga (1986) Insect chitin. Physiological state, synthesis, degradation and metabolic regulation. Insect Biochem. 16; 851-877.
- Sakuda, S., A. Isogai, S. Matsumoto and A. Suzuki (1987) Search for microbial insect growth regulators. II. Allosamidine, a novel insect chitinase inhibitor. J. Antibiotics 40; 296-300.
- Sakuda, S., A. Isogai, T. Makida, S. Matsumoto, K. Koseki, H. Komada, and A. Suzuki (1987) Structure of allosamidins, novel insect chitinase inhibitors produced by actinomycetes. Agri. Biol. Chem. 51(12); 3251-3259, 1987.
- Somers, P. J. B., R. C. Yao, L. E. Doolin, M. J. McGowan and D. S. Fukuda (1987) Method for the detection and quantitation of chitinase inhibitors in fermentation broths; Isolation and insect life cycle effect of A82516. J. Antibiotics 40; 1751-1756.
- Waterhouse, D. F., H. Hackman and J. W. McKellar (1961) An investigation of chitinase activity in cockroach and termite extracts. J. Insect Physiol. 6; 96-112.