

Bacillus subtilis JK-560이 생산하는 chitinase isozyme의 정제와 특성 규명

김낙원 · 정영기[†] · 전홍기*

부산대학교 자연과학대학 생명과학부 미생물학과
[†]동의대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification and characterization of the chitinase from *Bacillus subtilis* JK-56

Nak-Won Kim, Yong-Kee Jeong[†] and Hong-Ki Jun*

Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
[†]Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

Chitin, a β -1,4 polymer of *N*-acetyl-D-glucosamine, is one of the most abundant organic compounds in nature. Chitinase (EC 3.2.1.14) is an enzyme that degrades chitin to chito-oligosaccharides, diacetyl chitobiose and *N*-acetyl-D-glucosamine. An extracellular chitinase-producing bacterial strain was isolated from soil and named to as *Bacillus subtilis* JK-56. Optimum culture condition of *B. subtilis* JK-56 for the production of chitinase was 1% chitin, 0.5% polypepton, 0.1% KCl, 0.05% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 37°C, initial pH 7.0 and 40 hour culture time. When *B. subtilis* JK-56 was grown in the optimum medium, one major active band and two minor active bands were detected by native-PAGE and active staining of the gel. Among them, the major band was purified from the culture supernatant by 70% ammonium sulfate precipitation and native-PAGE with BIO-RAD Model 491 Prep-Cell and named as Chi-56A. Its molecular weight was estimated to be 53kDa monomer and the isoelectric point (pI) was pH 4.3. The pH and temperature for the optimum activity of Chi-56A were pH 6.0 and 65°C, respectively. Chi-56A was stable up to 65°C and in alkaline region. Its K_m value for colloidal chitin was 17.33g/L. HPLC analysis of the reaction products confirmed that Chi-56A was an exo type chitinase.

Key words – chitinase, chitin, *Bacillus subtilis*

서 론

Chitin은 *N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc)이 5,000개 이상 β -1, 4 결합으로 중합된 분자량 100만 이상의 천연 고분자 다당물질로서 게, 새우 등의 갑각류 및 연체류의 껍질과 근육 그리고 곤충류, 버섯류 및 사상균류의 세포벽 등에 함유되어 있다. 연간 생산량은 1,000억톤 이상으로 지

구상에서 cellulose 다음으로 많이 생산되고 있는 biomass 자원이며, 최근 chitin 및 chitin 유도체(chitin 올리고당 등)는 식품산업, 제약산업, 농업 및 환경분야 등의 많은 분야에 이용되고 있다[6,9,11]. Chitin의 화학구조는 식물의 섬유소인 cellulose와 비슷하지만 분자 내에 아세틸 아미노기를 가지고 있고 이들 상호간에 강한 수소결합을 하고 있기 때문에 화학약품에 대한 내성이 강하며 또한 물과 일반적인 유기용매에 녹지 않는다.

Chitinase (chitodextrinase; EC 3.2.1.14)는 chitin의 β -1, 4결합을 가수분해하며 작용기작에 따라 chitin 및 chi-

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : +82-51-510-2270, Fax : +82-51-513-4532
E-mail : hkjun@hyowon.cc.pusan.ac.kr

todextrin의 β -1, 4결합을 무작위로 분해하는 endo형 chitinase, chitobiose를 N-acetyl-D-glucosamine으로 분해하는 N-acetyl-D-glucosaminidase, 그리고 chitin 사슬의 비환원 말단으로부터 이당체인 diacetyl chitobiose 또는 그 이상의 단위체로 절단하는 exo형 chitinase 등 세 종류가 알려져 있다[7].

Chitinase는 다양한 곰팡이의 세포벽을 용해시켜 곰팡이를 protoplast화 시키는데 이용되고 있다[1]. 또한 식물에 병원성을 일으키는 곰팡이들을 저해하는 효과적인 생물조절인자로 이용되고 있다[14]. 그리고 chitinase는 갑각류의 폐기물(껍질 등)을 처리하는 생물전환과정에 효과적으로 이용되어 부가가치가 높은 물질을 생산한다. 상업적으로 여러 가지 다양한 시료로부터 chitinase 효소 자체를 정제해서 이용을 하기도 한다. 효소 10 units에 약 100달러 이상의 고가에 거래가 이루어지고 있다.

한편, 항생물질의 전구물질로 사용되는 glucosamine의 생산, 생변환에 의한 단세포 단백질의 생산, 그 외 식품 분야 및 의약품 분야에서 널리 이용되고 있는 chitin의 대량 생산을 위해서도 값싼 chitinase의 생산이 필수적으로 요구된다. Chitinase의 생산 미생물로는 곰팡이 등이 활성이 크지만, 대량생산을 위해서는 통기 및 교반이 용이한 세균이 적당하며, 또한 chitinase 유전자의 분리 및 조작 등에도 곰팡이보다는 세균이 유리하다. 따라서 본 연구에서는 지구 상에서 풍부한 생물자원의 하나인 chitin의 이용을 위하여 chitinase를 생산하는 세균을 토양으로부터 분리·동정하고, chitinase의 최적생산조건을 검토하였다. 또한 chitinase를 prep-cell system을 이용하여 정제하였으며, 정제된 효소의 물리학적 및 효소학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

Chitinase 생산균주의 분리

부산, 경남 일원의 논밭의 흙, 퇴비 및 바닷가 근처의 흙 등을 채집하여 시료로 사용하였다. 멸균수에 적당히 희석한 시료를 colloidal chitin을 함유한 고체배지에 도말한 후 37°C에서 2~3일간 배양한 다음 colloidal chitin을 분해해서 투명환을 생성하는 colony를 순수 분리하였다. Colloidal chitin을 만들기 위해서 Jeuniaux의 방법[8]을 따랐다. 1차로 순수 분리된 colony를 1% colloidal chitin, 0.5% yeast

extract, 0.5% peptone, 0.2% beef extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 함유한 효소생산용 액체배지에서 37°C, 200rpm의 조건하에서 2~3일간 진탕 배양한 후 chitinase 활성을 측정하여 활성이 높은 균주를 2차로 분리하였다.

Chitinase 활성 측정 및 단백질 정량

Chitinase 활성 측정을 위해서 효소 생산 배지에서 37°C, 200 rpm으로 48시간동안 진탕배양한 후에 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 반응은 pH 7.0, 100 mM phosphate buffer에 현탁한 1% colloidal chitin 1 ml에 조효소액 1 ml을 가하여 총부피 2 ml, 최종농도 0.5%가 되도록 하여 37°C에서 1시간 동안 150 rpm으로 진탕하면서 효소 반응을 시킨 후 끓는 물에 5분간 처리하여 반응을 정지시켰다. 반응 후 남아 있는 colloidal chitin을 제거하기 위해서 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 DNS (dinitrosalicylic acid) 법[13]으로 유리된 환원당을 정량하였다. 효소 1 unit는 1 시간 동안 1 μ M의 N-acetyl-D-glucosamine을 생산하는 효소의 양으로 정하였다. 단백질량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 법[12]으로 정량하였다.

분리균주의 분류 및 동정

분리 균주의 분류학적인 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적인 제반 특성을 조사하였으며[15], 16S rDNA의 염기서열을 통해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 gene bank database와 비교 분석하여 동정하였다.

효소생산 최적조건

분리 균주의 chitinase 생산을 위한 최적조건을 검토하기 위하여 탄소원, 유기질소원, 무기질소원, 무기염, 금속이온의 영향 및 각각의 농도와 초발 pH, 배양온도의 영향을 검토하고 최적조건에서 배양시간에 따른 균의 증식 및 효소 생산성을 검토하였다.

조효소액의 조제

효소생산 최적 조건에서 48시간 동안 배양한 배양액을 4°C, 12,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 조효소액으로

사용하였다.

Ammonium sulfate 침전

조효소액을 ammonium sulfate 30~70% 농도로 포화시킨 다음 4°C, 12,000 rpm에서 원심분리하여 침전된 단백질을 최소량의 100 mM phosphate buffer에 녹인 다음 동일한 완충액으로 3회 투석하고 polyethylene glycol (PEG) 6,000으로 농축하였다.

Model 491 Prep Cell을 이용한 Native-PAGE 정제

Native-PAGE의 조건은 Table 1과 같이 10% resolving (separating) gel 5 cm에 4% stacking gel 1 cm의 원통형 gel을 만들었다. 조효소액 240 µl에 5배 농축된 sample buffer 600 µl를 첨가한 다음 원통형 gel에 loading 하였다. 15 W의 일정한 전력으로 전기영동을 실시한 다음 선단지 시약(bromophenol blue; BPB)이 바닥까지 모두 내려간 다음 이후에 용출되는 용출액을 fraction collector를 통해서 회수하였다. 각 fraction을 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, chitinase 활성을 측정하였다.

Table 1. Model 491 Prep Cell running conditions

Resolving (separating) gel	10% acrylamide solution*
Resolving gel length	5.5 cm in the 28mm gel tube
Resolving gel buffer	0.375 M Tris-HCl, pH 8.8
Stacking gel	4% acrylamide solution
Stacking gel length	1 cm
Stacking gel buffer	0.125 M Tris-HCl, pH 6.8
Running buffer (Elution buffer)	0.025 M Tris-HCl + 0.192 M Glycine
Sample buffer	0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8 + 10% Glycerol + 0.5% Bromophenol blue(BPB)
Sample loading	3 ml
Elution rate	1 ml/min
Fraction size	3 ml
Power	constant 15 W

* Acrylamide solution (30% stock solution)
 - acrylamide/bis (N,N'-bis-methylene-acrylamide, 30%T/2.67%C)
 %T = The weight percentage of total monomer including cross-linker
 %C = The proportion of cross-linker as a percentage of total monomer

Native-PAGE와 활성 band 측정

정제된 단백질의 순도를 검정하기 위하여 7%의 polyacrylamide gel을 사용하여 Laemmli의 방법[10]에 따라 native-PAGE를 실시하였다[4]. Native-PAGE로부터 확인된 band가 chitinase 활성 band인지 확인하기 위해서 petri dish에 효소의 기질인 colloidal chitin을 1% 함유한 고체 agar plate를 만들어서 전기영동을 실시한 acrylamide gel을 plate 위에 얹고 효소 반응 온도인 65°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 투명화를 확인하였다. 활성 band와 비교하기 위해 동일한 조건으로 전기영동한 것을 Coomassie blue R-250으로 염색하여 서로의 band를 비교하였다.

SDS-PAGE

정제된 효소의 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli의 방법[10]에 따라 SDS-PAGE로 측정하였으며, 10% polyacrylamide gel과 Tris-glycine 완충액(25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3)을 사용하였다.

Isoelectric point(pI) 측정

정제효소의 pI (isoelectric point)는 isoelectric focusing (IEF)에 따라 ampholyte (pH 3.5~10)의 pH 구배로 실험하였다[4].

정제효소의 온도와 pH에 대한 안정성 최적 활성 측정

각각의 온도와 각각의 pH 완충액에 정제 효소를 30분 동안 방치한 후에 잔존활성을 측정하여 상대활성으로 안정성을 검토하였고 각각의 효소 반응 온도, pH 별로 효소활성을 측정하여 최적온도와 pH를 검토하였다.

정제효소의 금속이온에 따른 효소활성의 영향

효소활성에 미치는 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 효소액을 20 mM EDTA가 포함된 phosphate 완충액(pH 7.0)에 24시간 투석 후 다시 EDTA가 없는 동일 완충액에 24시간 투석 처리하였다. 처리된 효소에 각각의 금속이온을 10 mM 되게 첨가한 후 효소활성을 측정하여 상대적인 효소활성을 측정하였다.

효소의 기질특이성 실험

효소의 반응 특이성을 알아보기 위하여 여러 종류의 chito 올리고당들을 기질로 하여 효소반응을 한 뒤 반응 산

물을 HPLC를 통해 분석하였다. Column은 carbohydrate analysis P/N84038 (Waters社)을 사용하였고 용매는 acetonitrile : water (70 : 30, v/v)를 사용하였으며 유속은 0.5 ml/min으로 하여 RI (refractive index) 검출기를 이용해서 검출하였다.

결과 및 고찰

Chitinase 생산 균주의 분리

부산 경남 일원에서 채집한 토양 시료를 증류수에 현탁하여 적당히 희석한 다음 colloidal chitin이 함유된 분리용 배지에 도말하여 투명환을 생성한 균주를 1차로 100여 균주를 분리하였다. 그 중에서 chitinase 활성을 측정한 결과, 활성이 가장 높은 56번 균주를 2차로 선별하여 편의상 JK-56이라 명명하였다. Fig. 1(A)과 같이 JK-56 균주는 세포외로 chitinase를 분비한다는 것을 알 수 있다.

분리균주의 동정

JK-56 균주의 형태학적 · 특성을 검토한 결과를 Table 2에 나타내었다. Fig. 1(B)의 전자현미경(transmission electron microscope ; TEM)상의 사진으로 볼 때 그람양성균의 전형적인 막대 모양으로 포자는 한쪽으로 치우쳐 있었다. 세포의 크기는 JK-56 균주가 *Bacillus subtilis*에 비해서 조금 작은 것으로 나타났다. Table 2에서 보는 바와 같이 citrate 이용능과 gelatin 가수분해 외에 나머지 특성은 *Bacillus*

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of the isolated JK-56

Contents	Strain JK-56	<i>Bacillus subtilis</i>
Gram stain	+	+
Shape	rod	rod
Cell length	1.5~2.0 μm	2.0~3.0 μm
Cell width	0.4~0.7 μm	0.7~0.8 μm
Spore shape	elliptical	elliptical
Spore position	terminal	central
Indole test	-	-
Aerobic condition	areobes	areobes
Methyl red test	-	-
Voges-Proskauer test	+	+
Citrate utilization	-	+
Catalase	+	+
Casein hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	+	+
Gelatin hydrolysis	-	+
Fat hydrolysis	+	+
Decomposition of tyrosine	-	-
Dihydroxyacetone production	+	ND [*]
Phenylalanine deaminase	-	-
Growth in NaCl 0%	+	+
2%	+	+
4%	+	+
7%	-	+
10%	-	-

※ND : No data

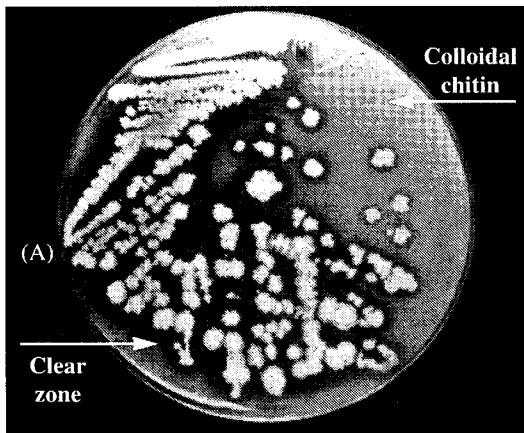


Fig. 1. Photograph of clear zone (A) and TEM (transmission electron microscope) photograph (B) of the shape of the isolated strain JK-56.

subtilis와 거의 흡사한 결과를 보였다.

분리 균주 JK-56로부터 genomic DNA를 분리하여 27f-1492r primer를 사용하여 16S rDNA 부위를 PCR로 증폭시킨 후 auto-sequence를 이용해 염기서열을 결정하고 균주의 결정된 425개의 염기서열을 Gene bank database와 비교한 결과 Bacillus subtilis strain 09와 100%의 상동성을 보였다.

JK-56 균주의 형태학적, 배양학적, 생화학적 특징 및 partial 16S rDNA sequencing 결과 등의 제반 분류학적 특징들을 비교해 볼 때 Bacillus subtilis strain 09와 가장 유사한 것으로 판명되었다. 따라서 본 균주를 Bacillus subtilis로 동정하고 편의상 Bacillus subtilis JK-56으로 명명하고 이후의 실험에 사용하였다.

Chitinase의 최적 생산조건 검토

Bacillus subtilis JK-56이 생산하는 chitinase의 생성 최적 조건을 결정하기 위하여 탄소원, 질소원, 무기염, 금속이온의 영향 및 각각의 농도 그리고 초발 pH, 온도의 영향을 검토하여 배양시간 경과에 따른 균의 증식 및 효소 생산성을 검토하였다. 그 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 효소 생산 최적 조건을 결정하였다.

배양시간에 따른 효소 활성 및 생육도

최적 생산 배지조건하에서 Bacillus subtilis JK-56의 진탕 배양 시간에 따른 균의 생육도와 효소생산량, 단백질량, pH 변화 등을 관찰하였다. 그 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 배양 시간은 약 10시간에서 30시간까지 대수증식기를 보였으며 30시간 이후에 정지기를 거쳐 약 40시간 정도에

Table 3. The optimum culture condition for the chitinase production

Contents	
Chitin	10 (g/ l)
Polypeptone	5 (g/ l)
KCl	1 (g/ l)
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.5 (g/ l)
Temperature	37 °C
Culture time	40 hr
pH	7.0

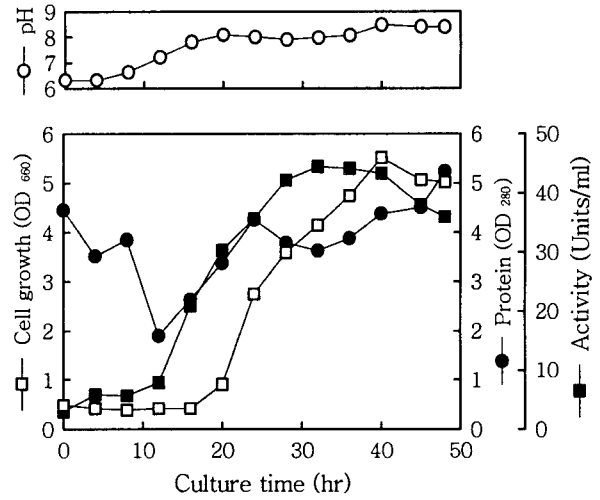


Fig. 2. Time courses of chitinase producton and cell growth by Bacillus subtilis JK-56 on the optimum culture condition.

Cell was cultivated in a optimum liquid medium containing 1% chitin (practical grade), 0.5% polypepton, 0.1% KCl, 0.05% MnSO₄ · 4H₂O at 37°C and pH 7.0 for 40 hr which agitation at 200 rpm. At regular intervals (4 hr), cell growth (OD₆₆₀, □), activity (units/ml, ■), the amount of extracellular proteins (OD₂₈₀, ●), and pH (○) were measured.

사멸기에 이르러 비교적 생장이 빠르다는 것을 알 수 있었다. Chitinase 효소생산 측면에서는 약 15시간까지 거의 효소생산이 없다가 15시간 이후에 효소생산이 급격하게 이루어지면서 40시간 때에 최고의 효소생산을 나타내었다. 따라서 배양 40시간을 효소생산 최적 시간으로 결정하였다 (Table 3). 배양액 내의 단백질량을 보면 균체가 성장하기 전까지 감소를 보이다가 균체가 성장하면서 전반적으로 증가하였다. 정지기에는 배양액 내의 단백질을 이용해 세포 증식의 준비를 하는 단계로 약 12시간까지 단백질이 줄어들다가 대수증식기가 시작되면서 활발한 대사가 이루어져 효소를 많이 생산한 것으로 추정된다. 사멸기에 접어들면서 단백질량이 증가하는 것은 cell autolysis로 인해 단백질량이 계속 증가하는 것으로 생각된다. 배양 시간의 경과에 따라 배양액의 pH 변화는 완만하게 상승해서 pH 8.5정도 까지 상승하였다.

Native PAGE를 이용한 활성 band 확인

효소정제를 위하여 40시간 동안 배양한 후 배양액을 원

심분리하여 상층액을 ammonium sulfate 70% 농도로 포화시킨 후 침전된 단백질을 원심분리하여 농축하였다. 농축된 단백질을 최소량의 100 mM phosphate buffer로 현탁하여 효소를 동일한 buffer로 투석한 후 native PAGE를 행하였다. 2개의 well에 동일한 sample을 loading하여 전기영동한 후 칼로 절단하여 하나는 colloidal chitin agar plate에 올려놓고 65°C에서 1시간 반응시키고 다른 하나는 Coomassie blue R-250으로 염색하여 어느 band가 활성 band인지를 비교, 확인하였다. 그 결과 3개의 서로 다른 활성 band를 확인할 수 있었다. 그 중 하나의 band는 아주 강한 활성을 보였고 나머지 두 개의 band는 비교적 약한 활성을 보여 *Bacillus subtilis* JK-56은 chitinase isozyme을 생산하는 것으로 확인되었다. 보고된 바에 의하면 몇몇의 세균이 chitinase isozyme을 생산한다고 한다[2,3,5]. 따라서 이 3개의 isozyme을 정제하기 위하여 Prep Cell을 이용하여 동일 조건으로 효소정제를 실시하였다.

Model 491 Prep Cell을 이용한 native PAGE 정제

Model 491 Prep Cell을 이용한 native-PAGE를 실시한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 21번째 fraction에서 chitinase 활성 peak를 보였다. 따라서 21번 fraction을 전후로 각각 10개의 fraction에 대하여 mini gel을 이용한 native-PAGE를 실시한 후 band를 염색하여 확인한 결과 16~25까지 1개의 band를 확인할 수 있었지만 전기영동 buffer에 상당히 희석이 되어 있었으므로 10개의 fraction을 농축하

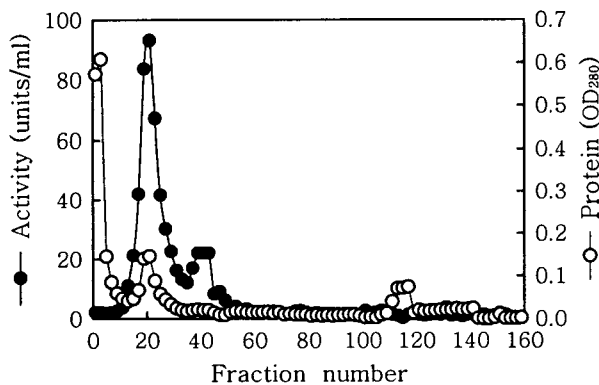


Fig. 3. Native PAGE purification of chitinase from *Bacillus subtilis* JK-56 with the Model 491 Prep Cell. The experimental details are described in the test. ○; chitinase activity, ●; protein.

여 band를 확인하기 위하여 centrifugal vaporizer CVE-200 (EYELA)으로 10배 농축한 후 다시 mini gel로 native-PAGE를 실시하여 1개의 band를 확인하였다. 단백질량은 1~10번 fraction까지 상당히 높은 값을 나타내었는데, 이것은 Prep Cell에 sample을 loading한 다음 전기영동을 하고 BPB가 원통의 gel 끝까지 내려갔을 때부터 fraction을 받기 시작했기 때문에 앞의 fraction에는 BPB가 많이 포함되어 있어 BPB의 색소에 의해서 높은 값을 나타낸 것으로 생각된다.

지금까지 정제된 chitinase band를 편의상 Chi-56A로 명명하였다. Chi-56A의 정제 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 최종 3.14배의 정제도로써 약 40%가량의 높은 수율로 정제가 이루어졌다. 이와 같이 높은 수율로 정제가 가능한 것은 ammonium sulfate으로 침전시킨 후 Prep Cell을 이용한 두 단계의 정제로 단백질의 손실을 최소화 할 수 있었고, 또한 염색, 투석 후의 sample에 Chi-56A의 band가 다른 효소의 band에 비해 상당히 진하게 나타나는 것으로 보아 원래 상층액 자체에서 Chi-56A가 차지하는 비율이 상당히 높은 것으로 생각되어진다. 따라서 본 균주로 정제 효소를 생산한다면 지금 시판되고 있는 고가의 chitinase를 대체하여 저렴하게 공급할 수 있을 것으로 기대된다.

분자량 측정

SDS-PAGE를 행하여 염색, 탈색을 행한 후 단백질의 Rf 값을 구하여 분자량을 측정하였다. Rf 값은 선단지시약 (BPB)의 이동거리에 대한 단백질의 이동거리의 비를 나타낸 값이다. 이 값과 단백질의 분자량의 상용 log 값에 비례한다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 정제된 효소 Chi-56A의 분자량은 약 53kDa이었다.

Table 4. Purification of chitinase from *Bacillus subtilis* JK-56

Step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Fold
Culture supernatant	16,786	57.79	290.47	100	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	14,601	43.95	332.22	86.98	1.14
Prep Cell	6,705	7.35	912.24	39.98	3.14

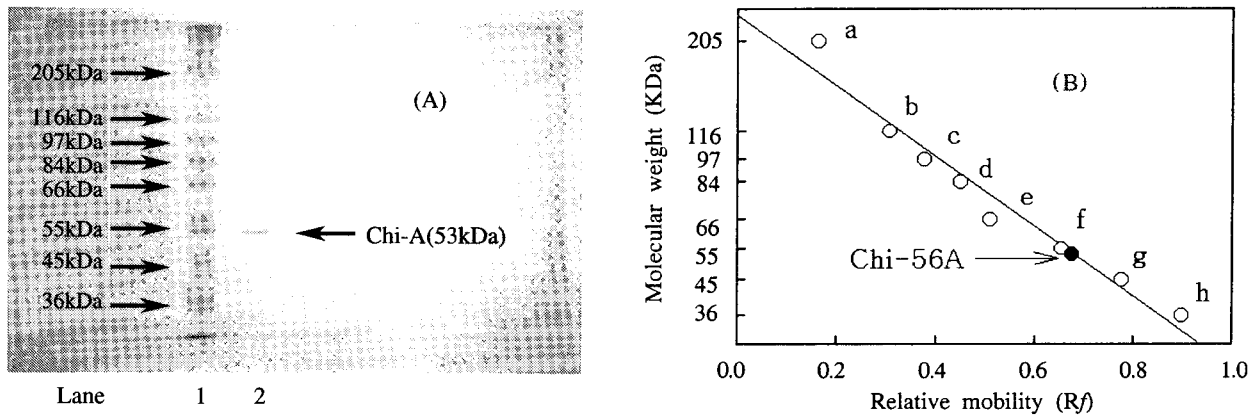


Fig. 4. SDS-PAGE of the purified chitinase A (Chi-56A)(A) from *Bacillus subtilis* JK-56 and determination of molecular weight of the Chi-56A with a graph of a semilogarithmic plot of the relative mobility (B).

Lane 1 : Standard Lane 2 : Chi-5A a : Myosin (MW; 205,000), b : β -Galacto-sidase (MW; 116,000), c : Phosphorylase b (MW; 97,000), d : Fructose- 6-phosphate kinase (MW; 84,000), e : Albumin (MW; 66,000), f : Glutamic dehydrogenase (MW; 55,000), g : Ovalbumin (MW; 45,000), h : Glycerlaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (MW; 36,000)

Isoelectric point (pI)

등전점 측정은 polyacrylamide gel isoelectric focusing (IEF)의 방법에 따라 증류수에 ultrapure urea를 녹인 후 ampholyte (pH 3.5~10)를 첨가하여 poly-acrylamide gel을 만들었다. 그 다음 gel을 150 V에서 30분간 prerunning 시킨 후에, 200 V에서 2시간 30분 동안 전기영동을 실시하였다. 이 때 음극액으로는 20 mM NaOH 용액, 양극액으로는 10 mM phosphoric acid 용액을 사용하였다. 전기영동 후에 gel을 빼내어 1 cm씩 잘라서 10 mM KCl 용액에 넣어 ampholyte를 30분 동안 용출시켜 pH를 측정 한 후 pH 구배 곡선을 작성하였다. Sample을 loading한 gel 부분은 10% trichloroacetic acid 용액에 10분 담근 후, 1% trichloroacetic acid 용액에서 하룻밤 방치하였다. Coomassie blue R-250 용액에 염색한 후 탈색하여 정제된 효소의 band 위치를 확인하였다. 그 결과 본 효소의 등전점은 Fig. 5에 나타난 것과 같이 약 4.3으로 측정되었다.

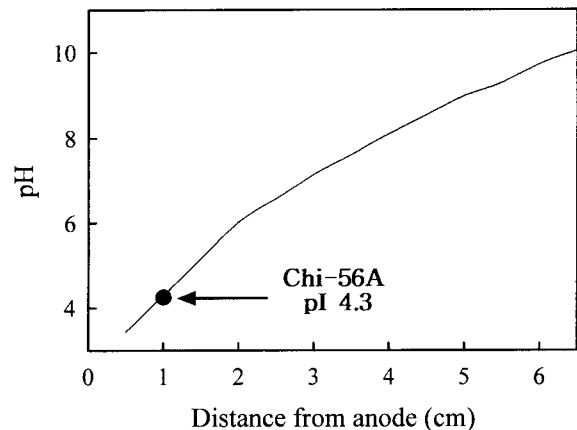


Fig. 5. Determination of isoelectric point (pI) of chitinase from *Bacillus subtilis* JK-56.

히 효소의 활성의 감소하는 결과를 보였다. 정제효소의 활성 최적 온도에 대한 효소의 영향을 알아보기 위하여 각각의 온도에서 효소반응을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6 (A)에서 보는 바와 같이 65°C에서 최대 활성을 나타내었다. 반면에 효소생산의 최적 조건인 37°C에서는 최대 활성의 60%의 효소활성을 나타내었다.

정제 효소의 열안정성 및 최적 활성 온도

온도에 대한 정제 효소 Chi-56A의 안정성을 알아보기 위하여 효소액을 각각의 온도에서 30분간 방치한 후 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6 (B)에서 보는 바와 같이 55°C까지는 거의 100%의 활성을 유지하였고 65°C에서도 약 90%의 활성을 유지하였다. 65°C 이상의 온도에서 급격

정제효소의 pH 안정성 및 최적 활성 pH

pH에 대한 정제 효소 Chi-56A의 안정성을 알아보기 위하여 pH 3~6은 citrate buffer, pH 6~8은 phosphate

buffer, pH 8~10은 borate buffer, pH 10~11은 NaHCO₃ · NaOH buffer를 그리고 pH 11~12는 Na₂HPO₄ · NaOH buffer에 각각 효소를 37°C에서 30분간 방치한 다음 효소의 잔류활성을 측정해 보았다. 그 결과 Fig. 6 (D)에서 보는 것과 같이 pH 6에서 가장 안정하였다. 특이한 것은 pH 11~12에서 상당히 안정함을 보였는데 이것은 아마도 phosphate의 영향이 아닌가 생각된다. 그리고 대체적으로 산성 쪽에서보다는 염기성 쪽에서 더 안정한 것으로 확인되었다. 효소 활성 최적 pH에 대한 결과는 Fig. 6 (C)에서 보는 바와 같이 pH 6의 phosphate buffer에서 가장 높은 활성을 보였다. 효소활성에서도 pH 안정성과 마찬가지로 염기성 쪽에서 더욱 높은 활성을 보였다.

정제효소의 금속이온에 따른 효소활성의 영향

효소활성에 대한 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 조효소액에 각각의 금속이온을 1 mM 되게 첨가하여 전술한 활성 측정법으로 비교하였다. 효소액은 20 mM EDTA

가 포함된 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7)에 효소를 4°C에서 24시간 투석한 후, EDTA가 없는 동일한 완충액에 24시간 투석하였다. 그 결과 Table 5에 나타난 것처럼 Co²⁺, Mg²⁺에서 비교적 높은 활성을 보였으며 Mn²⁺에서 가장 높은 활성을 보였고 Hg²⁺에서는 활성에 상당한 저해를 받는 것으로 확인되었다.

정제효소의 기질 농도에 따른 영향

정제된 효소에 대한 colloidal chitin의 농도에 대한 영향을 Lineweaver Burk plot으로부터 측정하여 K_m값을 구하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보는 바와 같이 본 효소에 colloidal chitin에 대한 K_m값은 17.33g/L로 확인되었다.

정제효소의 chito 올리고당의 분해 양상

Chi-56A가 chito 올리고당을 기질로 했을 때 어떤 분해 양상을 가지는지를 실험해 본 결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 (GlcNAc)₂는 거의 분해하지 않았다. 그리고 (GlcNAc)₄

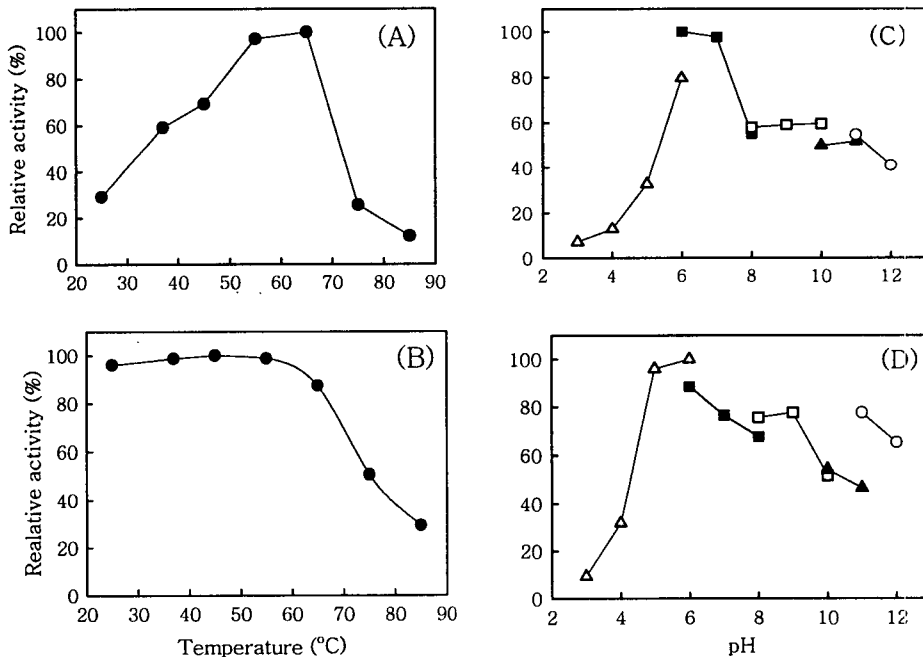


Fig. 6. Optimum temperature (A), temperature stability (B), optimum pH (C) and pH stability (D) of the purified Chi-56A from *Bacillus subtilis* JK-56.

A : The enzyme was reacted in various temperature for 1 hr at 150 rpm, B : After the enzyme was incubated in various temperature for 30 min, remaining activities were measured for determining the thermostability of the enzyme. C : Δ ; citrate buffer (pH 3.0~6.0), \blacksquare ; phosphate buffer (pH 6.0~8.0), \square ; borate buffer (pH 8.0~10.0), \blacktriangle ; NaHCO₃ · NaOH buffer (pH 10.0~11.0), \circ ; pH Na₂HPO₄ · NaOH buffer (11.0~12.0)

Table 5. Effect of the metal ions on the activity of the purified Chi-56A from *Bacillus subtilis* JK-56

Metal ion	Relative activity (%)
None	100
Pb(NO ₃)	82.54
CdCl ₂	50.29
CaCl ₂	77.81
CuSO ₄	44.67
CoCl ₂	100.89
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	83.73
FeSO ₄ · 7H ₂ O	44.67
MgCl ₂ · 4H ₂ O	108.58
MnCl₂ · 4H₂O	126.33
HgNO ₃	2.66
NiSO ₄ · 6H ₂ O	76.92

The enzyme activity was measured in the standard reaction mixture.

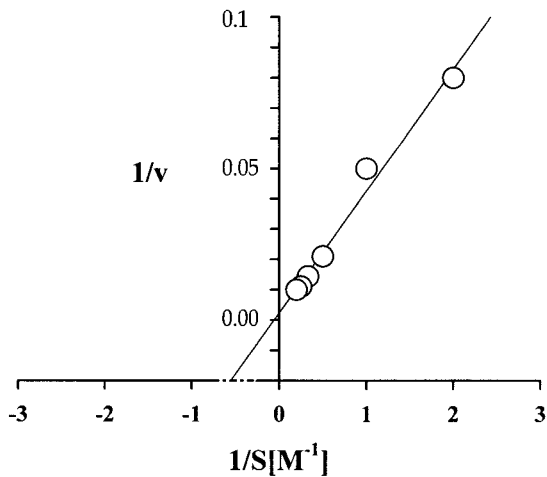


Fig. 7. Effect of the substrate concentration on the Chi-56A activity.

The effect of colloidal chitin concentration on enzyme activity was tested. The K_m value for colloidal chitin, calculated from the Lineweaver and Burk plots, was 100 mM in phosphate buffer (pH 7.0).

와 (GlcNAc)₆의 경우에도 Fig. 8 (D)와 (F)의 결과로 보아 분해산물로 (GlcNAc)₂만이 생성되는 것을 확인하였다. 또한 Fig. 8 (C)와 (E)의 결과에서 (GlcNAc)₃와 (GlcNAc)₅의 분해산물은 GlcNAc와 (GlcNAc)₂를 함께 생성하였다. 위의 두 가지 결과에 의해 Chi-56A는 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 이당체인 diacetyl chitobiose ((GlcNAc)₂)를 생

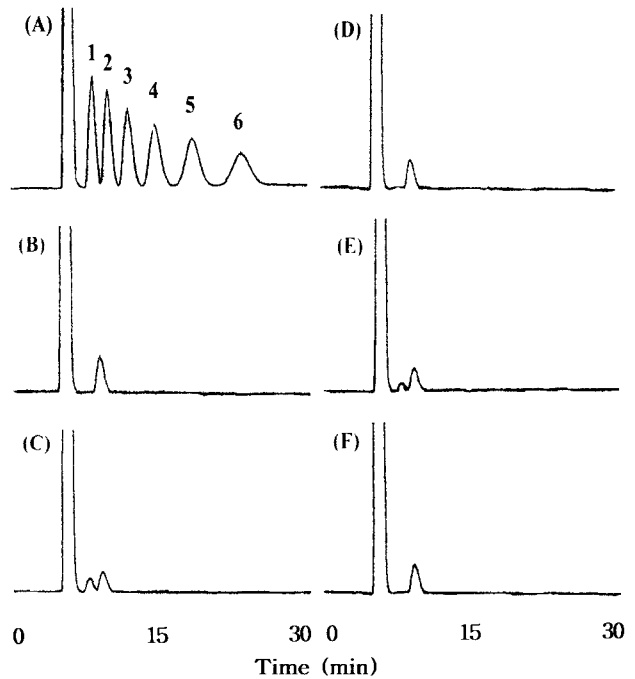


Fig. 8. Chromatogram of the reaction product of N-acetylchitooligosaccharides by purified Chi-56A. (A) Standard [1 : GlcNAc, 2 : (GlcNAc)₂, 3 : (GlcNAc)₃, 4 : (GlcNAc)₄, 5 : (GlcNAc)₅, 6 : (GlcNAc)₆, (B) (GlcNAc)₂ as substrate, (C) (GlcNAc)₃ as substrate, (D) (GlcNAc)₄ as substrate, (E) (GlcNAc)₅ as substrate, (F) (GlcNAc)₆ as substrate, GlcNAc : N-acetyl-D-glucosamine.

산하는 exo형 chitinase로 추정된다.

요 약

토양으로부터 chitinase를 생성하는 균주를 분리하여 동정한 결과 *Bacillus subtilis*로 판명되었으며, 분리한 균주를 *Bacillus subtilis* JK-56이라 명명하였다. *B. subtilis* JK-56의 chitinase 생산 최적 조건을 검토한 결과 1% chitin, 0.5% polypeptone, 0.1% KCl, 0.05% MnSO₄ · 4H₂O이며 초발 pH 7.0, 배양온도 37°C에서 가장 많은 효소를 생산하였다. 본 균주가 생산하는 chitinase를 정제하기 위해서 native-PAGE를 이용해 효소활성 band를 확인한 결과, 1개의 강한 활성 band와 2개의 약한 활성 band를 가지는 isozyme으로 확인되었다. 확인된 isozyme을 정제한 결과, isozyme 중 1개의 강한 활성 band를 정제하였고 정제된 효소를 Chi-56A라고 명명하였다. Chi-56A의 효소 특성에 관해서 실험한 결과 분자량은 약 53kDa, pI는 4.3으로 확인되었다.

본 효소는 65℃까지 상당히 안정하였으며 효소의 최대활성 온도도 65℃로 확인되는 등 열에 대해 상당히 안정한 효소로 확인되었다. Collidal chitin에 대한 정제효소 Chi-56A의 K_m 값은 17.33g/L였다. 그리고 pH 6.0에서 최대의 활성을 나타내었고, 산성범위보다 알칼리범위에서 안정한 것으로 나타났다. 또한 Mn^{2+} 존재 하에서 높은 활성을 나타내었고 Co^{2+} 와 Mg^{2+} 존재 하에서도 활성이 약간 증가한 반면에 Hg^{2+} 존재 하에서는 상당한 저해를 받았다. Chito 올리고당에 대한 분해 산물을 HPLC로 확인해 본 결과 짝수개의 올리고당의 분해산물은 $(GlcNAc)_2$ 만을 생산하였고 홀수개의 올리고당에 대해서는 $GlcNAc$ 와 $(GlcNAc)_2$ 를 생산하는 것으로 비환원성 말단으로부터 이당체인 diacetyl chitobiose ($(GlcNAc)_2$)를 생산하는 exo형 chitinase로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Ankani K. J. and T. Panda. 1992. Studies on critical analysis of factors influencing improved production of protoplast from *Trichoderma reesei* mycelium. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 241-248.
2. Han, B. K., J. K. Moon, Y. W. Ryu, Y. H. Park and D. H. Jo. 2000. Purification and Characterization of Acidic Chitinases from Gizzards of Broiler (*Gallus gallus* L.). *J. Biochem. and Molecular Biol.* **33**, 326-331.
3. Brinda M. and D. L. Crawford. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzyme and Microbial Technology* **20**, 489-493.
4. Daniel M. B. and J. E. Stuart. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss. New York.
5. Hiroshi T., N. Hatano, H. Endo, K. Miyamoto and Y. Inamori. 2000. Purification and Characterization of a Thermostable Chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and Cloning of the Encoding Gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 96-102.
6. Jeon, Y. J., E. H. Lee and S. K. Kim. 1996. Bioactivities of chitin and chitin-san (I). *Korean Journal of Chitin and chitin-san.* **1**, 4-13.
7. Jeong, E. T. and Y. H. Lee. 1995. Isolation of micro-organism producing chitinase for chito-oligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 187-196.
8. Jeuniaux, C. 1966. *Methods in Enzymology* 8, Academic Press, New York. pp. 644-650.
9. Kim, S. K. 1996. Synthetic Techniques of chitin and chitin-san derivatives and their analytical methods. *Korean Journal of Chitin and chitin-san.* **1**, 20-47.
10. Laemmli, J. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
11. Lee, H. S., H. J. Lee, S. W. Choi, S. Her and D. H. Oh. 1997. Purification and characterization of anti-fungal chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**, 107-113.
12. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Fan and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-271.
13. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
14. Reetarani. S., V. Ghormade and M. V. Deshpande. 2000. Chitinolytic enzymes: and exploration (Review). *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 473-483.
15. Staley, J. T., M. P. Bryant, N. Pfennig and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp 2010-2136. Williams and Wilkins. Baltimore, U.S.A.

(Received January 25, 2002; Accepted February 18, 2002)