

## N-아세틸 키토 올리고당[GlcNAc,(GlcNAc)<sub>2</sub>]의 미생물에 의한 생산

이은영, 이천우, 김 광  
동아대학교 화학공학과

### Production by microorganism of N-Acetyl chito oligomer[GlcNAc,(GlcNAc)<sub>2</sub>]

Lee Eun Young, Lee Cheon Woo, Kim Kwang  
Department of Chemical Engineering, Dong-A University

#### 서론

키틴은 올리고 다당의 일종으로 N-아세틸 글루코사민이 β(1,4)-결합한 천연 고분자로서 그 올리고마는 N-아세틸 키토 올리고당 [(GlcNAc)<sub>n</sub>,n은 중합도], 혹은 키틴올리고당이라고 불린다<sup>(1,2)</sup>. 키토산은 글루코사민이 β(1,4)- 결합한 것으로 그 올리고마는 키토산올리고당[(GlcN)<sub>n</sub>]이라고 불린다<sup>(2)</sup>. Mucor나 Phycomyces Strain 등 일부 곰팡이의 세포벽에 함유되어 있는데, 보통은 키틴을 탈아세틸화 하여 제조한다<sup>(3)</sup>.

이 키틴,키토산을 가지고 부분 가수분해를 하면,새로운 기능을 가진 키틴 올리고당과 키토산올리고당이 제조된다<sup>(3)</sup>. 최근 바이오매스 자원 이용의 일환으로서 키틴 올리고당의 이용이 식품<sup>(2)</sup>, 의약품<sup>(3)</sup>, 진단약 및 농약<sup>(4)</sup>의 분야에서 주목되고 있는 실정이다.

지금까지 이들의 올리고당은 다당을 부분적으로 산에 의해 가수분해하고, 각종 칼럼으로 분리하는 것에 의해 제조되어 왔다.그러나, 산분해법은 당사슬의 절단이 random하게 일어나기 때문에 단당 및 각종 중합도의 올리고당을 동시에 생성하여 분획조작이 복잡하고,각 올리고당 성분의 수율도 (GlcNAc)<sub>2</sub> - (GlcNAc)<sub>5</sub>의 각 성분의 수율이 각각 15, 10, 5 및 4%로 낮다<sup>(1)</sup>.

최근 산분해를 대신하는 방법으로서 세균을 사용한 (GlcNAc)<sub>2</sub>의 제법,키티나아제와 리소자임의 당전이 반응을 이용한 (GlcNAc)<sub>6</sub>~(GlcNAc)<sub>7</sub>의 제법이 개발되었다. (GlcNAc)<sub>2</sub>의 키틴에서의 수율은 중온성세균 V.anguillarum에 의한 수율이 53%,호기성 세균 B.licheniformis에 의하여는 72%까지 얻어진다<sup>(1)</sup>. 키틴분해효소로서 키틴의 β-1,4 결합을 무질서하게 가수분해하는 것에 따라 N-아세틸 키토 올리고당, N-아세틸 키토 비오스(GlcNAc)<sub>2</sub>와 단량체인 GlcNAc로 분해된다<sup>(4)</sup>.

키틴 올리고당 생성 공정에 적합한 미생물 선정은 신중을 기해야 한다. Serratia marcescens중 특히 균주 QMB1466은 키틴 존재 하에서 비교적 높은 수준(약 1mg/L)으로 키틴 용해성 효소(chitinase,chitobiase)를 생성한다<sup>(5)</sup>. 그러므로 본 연구에서는 S.marcescens를 이용하여 배양조건(pH, chitin 입자 크기에 따른 영향)을 최적화하여 최대 효소 생산과 chitin의 물성 변화(colloidal chitin,CM chitin)에 따른 chitin-oligomer 및 N-Acetyl glucosamine 생성에 대하여 조건 설정을 조사,검토하고자 하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 재료

#### 1) chitin제조

chitin은 crab shell(from SIGMA)로 부터 구입하여 Ball mill해서 53~300 $\mu$ m로 입자별로 분쇄하여 2% KMnO<sub>4</sub>에서 침적시킨 뒤 1% Oxalic acid에서 KMnO<sub>4</sub>와 MnO<sub>2</sub>를 제거하고, 물로 중성까지 씻은 후 ethanol-2N HCl-1N NaOH-Acetone-cthanol 과정으로 처리하여 순수 chitin을 얻었다.

#### 2) Alkali chitin 제조

0.2% SDS를 포함하는 40% NaOH에 현탁시킨 후 -20 $^{\circ}$ C에서 얼려 탈아세틸화를 일으키지 않은 상태에서 Alkali chitin을 제조하였다.

#### 3) Carboxymethyl chitin 제조

얼린 Alkali chitin을 Isopropyl alcohol에서 현탁시킨 후 Monochloroacetic acid를 가하여 알킬화 반응을 실시한 후 Acetone과 Ethanol에서 수세한 후 제조하였다 (fiber 생성).

#### 4) colloidal chitin제조

순수 chitin을 Acetone으로 반죽상을 형성시키고 conc.HCl을 가한후 Glass wool을 통과시킨 시럽액체를 50% Ethanol 수용액에서 침전시켰다.중성 부근까지 증류수로 세척한 후 3일간 투석하여 colloidal chitin을 제조하였다.

### 방법

#### 1) 미생물 배양

S.marcescens QMB1466의 최초 평판 배양은 고형화 된 2.3% nutrient agar(DIFCO Co.)에서 이루어졌고,YEPD 액체배지를 사용하여 균주를 배양하였다.배양온도는 30 $^{\circ}$ C이다.

#### 2) 효소 생산

회분 진탕 플라스크 실험은 chitin분말 15g/L,yeast extract 0.5g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g/L, MgSO<sub>4</sub> 0.3g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.36g/L가 함유된 250ml 플라스크에서 30 $^{\circ}$ C를 유지시키면서,8일간 지속되었다.

#### 3) chitinase 활성 측정

chitinase 활성은 Reissig등의 비색법<sup>(6)</sup>에 따라,BIO RAD사의 Micro plate reader를 사용하여, 540nm의 파장으로 각각의 well파장을 측정하였다.효소활성 1단위는 분당 1mM NAG를 유리시킬 수 있는 효소의 양으로 한다.

#### 4) chitobiase 활성 측정

chitobiase 활성은 상등액 또는 세포 추출물인 효소 용액의 분액을 P-Nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosamine(pNp-NAG)와 항온 처리했을 때 유리되는 P-Nitrophenol의 양을 측정하여 효소 활성을 정하였다. 5mM pNp-NAG 용액 50L와 효소 용액 20L 섞은 것을 효소 활성 1단위는 1mg P-Nitrophenol을 유리시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다<sup>(7)</sup>.

#### 5) 단백질 측정

단백질 농도는 BIO-RAD사의 Micro plate reader로 측정하였다. 본 연구에서는 540 nm파장에서 3회 반복 측정하였다.

### 결과 및 고찰

*S. marcescens*의 회분 배양과정에서 1.5% 농도로 포함된 키틴 분말의 크기를  $53\mu\text{m}$ 이하에서  $300\mu\text{m}$ 이상 까지 다양하게 변화시키면서 탄소원으로 사용하여 8일간 배양한 후, 단백질 1mg당의 chitinase 활성을 측정하였다. Fig 1.에서와 같이 키틴 분말의 입자 크기가  $180\sim 300\mu\text{m}$  일 때 시간적으로 안정하면서도 높은 활성을 나타내었으며, 지면 사정상 graph는 생략했지만 입자 크기가  $90\mu\text{m}$ 이하일 때는  $300\mu\text{m}$ 이상일 때와 비슷한 정도의 활성을 나타내었다.

Fig 2.는 Fig 1.에서 사용된 chitin 중 가장 활성이 높은  $180\sim 300\mu\text{m}$  ( $48\sim 80$  mesh)의 입자를 사용하여 50ml test tube내에서 shaking을 해주지 않은 상태에서의 chitinase 활성을 측정한 것으로서, 230rpm의 shaking을 가해준 Fig 1.의 결과와 비교해보면 그 수치가 상당히 낮은 것을 알 수 있으며, 효소 생산 시 적당한 shaking은 필수적임을 나타낸다.

Fig 3.은 균주를 최초 평판 배지에서 YEPD 액체 배지로 옮겨 16시간동안 배양한뒤, 다시 YEPD 액체배지로 transfer하여 배양시간을 3시간 간격으로 달리하여 그 결과 chitinase 활성을 측정한 것으로, 효소 반응에 있어서 NAG(GlcNAc) 생성에 미치는 적절한 접종시간을 결정할 수 있었다. 그림에 나타나듯이 3시간의 배양시간을 거친 균주가 가장 높은 활성의 chitinase를 생산함을 알 수 있었고, 그때의 NAG 농도는  $33.92\text{mg/hrL}$ 였다. 반면에 최대 NAG생성 기간을 단축시킬 수는 없었다.

Fig 4., Fig 5.와 Fig 6.은 Fig 1.과 같은 환경에서 탄소원으로서 chitin을 단백질과 칼슘분을 제거시켜 Ball mill한 것외에 colloidal chitin을 기질로 할 때의 단당류 생성과  $(\text{GlcNAc})_2$ 의 생성을 단백질 총량에 대한 것으로서 단당류(GlcNAc) 생산을 위한 탄소원으로는 단백질과 칼슘분을 제거한 뒤 Ball mill해 준 practical grade chitin이 가장 경제적이고 효과적인 소재임을 알 수 있었다.

### 참고문헌

1. 島原健三 BIO INDUSTRY. Vol.6, No.8, 616 (1989)
2. 坂井 和男. New Food Industry. Vol.31, No.6 17 (1989)
3. Keisuke Kurita. 化學工業. Vol.10 (1991)
4. 古賀大三. 纖維と工業. Vol.46. No.12 (1990)
5. Monreal, J., and Reese, E. T., Can. J. Microbiol., 15, 689-696, 1969
6. Reissig, J. L., Strominger, J. L., and Leloir, L. F., J. Biol. Chem. 217, 959 (1955)
7. Mori, H., Yano, T., Kobayashi, T., and Shimizu, S. (1979), J. Chem. Eng. Jap., 12, 313

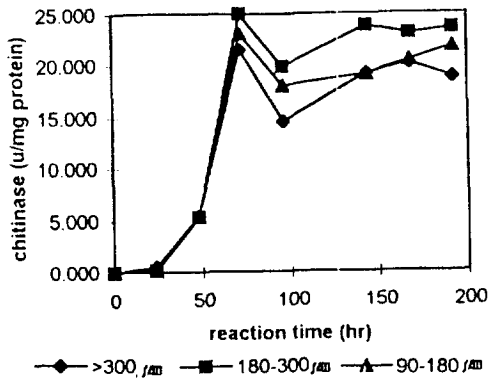


Fig 1. Effect of chitin particle size on chitinase production. Batch cultures of *S.marcescens*, 1.5% crab chitin, 30°C

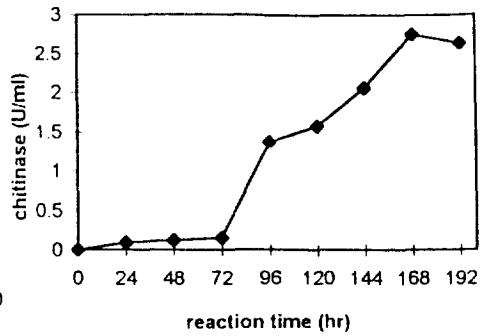


Fig 2. Chitinase activity in not shaken test tube

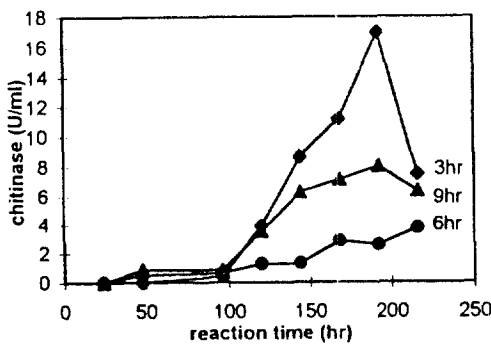


Fig 3. Effect of inoculum time on producing NAG for enzyme reaction

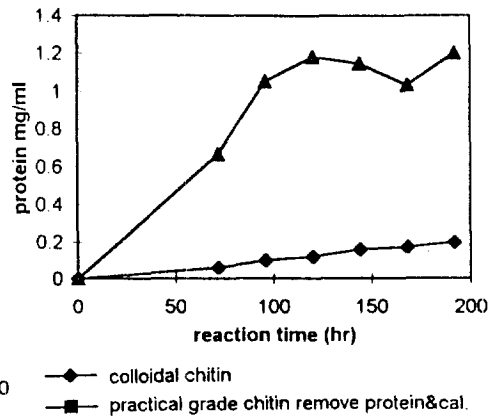


Fig 4. Effect of chitin on chitinase production

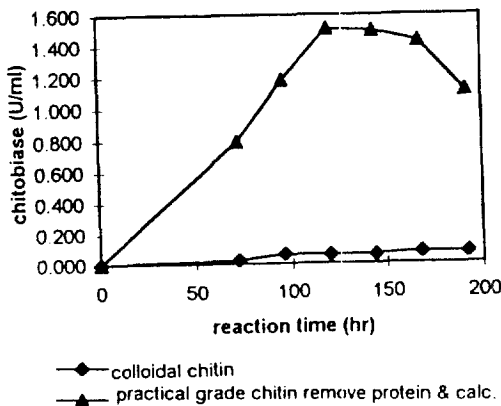


Fig 5. Effect of chitin properties on chitinase production

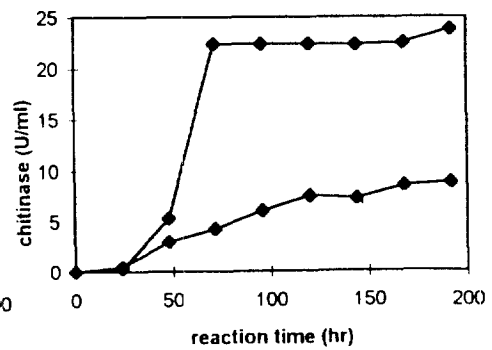


Fig 6. Effect of chitin properties on protein production