

갑각류 폐기물을 이용한 N-Acetyl- β -D-Glucosamine 생산

김 광, 전 소 영*, 선우 양 일*
동아대학교 화학공학과
*동아대학교 생물학과

Production of N-Acetyl- β -D-Glucosamine using shellfish wastes

Kwang Kim, So-Young Jun*, Yang-Il Sunwoo*
Department of Chemical Engineering, Dong-A University
*Department of Biology, Dong-A University

서 론

*Serratia marcescens*가 생산하고 분비하는 chitin분해성 효소인 chitinase(chitin glucano hydrolase, EC 3.2.1.14)와 chitobiase(acetylaminodeoxyglucohydrolase, EC 3.2.1.29)을 사용하여 chitin을 효소적으로 가수분해하여 N-acetyl- β -D-glucosamine(NAG)를 생산하는데 초점을 두었다. 많은 양의 값싼 chitin에서 NAG 생산 기술을 개발하고 또한 NAG는 궤양성 대장염과 다른 위장 염증 치료에 탁월하다는 새로운 증거들이 밝혀지고 있다⁽¹⁾.

자연계에서 cellulose다음 두번째로 가장 풍부한 중합체인 chitin은 NAG가 분지 없이 β -1,4로 결합된 중합체이다⁽²⁾. Cellulose같이 chitin은 외피 막구조를 구성하고 있는 방향성 미세섬유로서 특이한 공간적 배열로 결정화된 다당류이다. Chitin의 천연 소재는 절지 동물의 외골격과 곰팡이의 세포벽이다^(5,6). 이 중에서 chitin의 상업적 소재로 유용한 것은 게와 새우 및 가재이다. 이러한 갑각류 폐기물 중의 지구상의 전체 chitin의 양은 연간 1.2×10^8 으로서 폐기되고 있다. 현재 북미 해산 식품 포장 산업에서 이러한 폐기물의 대부분은 섬이나 바다에 폐기되고 있다. 일본은 매년 약 10^6 kg의 chitin을 산업용으로 생산 가공하고 있다⁽³⁾.

본 연구에서는 NAG의 효율적 생산을 위하여 미생물의 기질 중 탄소원으로 사용할 chitin source를 취하기 위해서 갑각류 외피를 화학적 처리(산화제, HCl, NaOH로 처리)와 물리적 처리(Ball-mill, Roller mill)를 통한 전처리에 의한 NAG생산에 미치는 영향, NAG발효에 사용된 *Serratia marcescens*균주에 의해 생성되는 chitinase/chitobiase 효소의 존재비에 따른 NAG생산성의 영향 및 시간 경과에 따른 NAG 생산성의 변화를 조사하여 chitin발효의 최적화를 연구 검토하였다.

재료 및 방법

미생물 배양 : *S. marcescens* Atcc13880의 도말 배양은 4°C 에서 nutrient agar(DIFCO)에 유지시켰으며 2달마다 계대하였다. 최초 평판 배양은 glycerol stock에서 마련하여 30°C에서 24시간 배양하였다. *S. marcescens*의 배지조성은 yeast extra 1 wt%와 pepton 2 wt%와 glucose 2 wt%의 농도가 함유된 YEPD배지(DIFCO)로서 접종 배양은 30°C, pH 7.0에서 배양하였다.

회분 진탕 플라스크 배양실험은 15g/L 계-껍질 chitin, 0.5g/L yeast extra, 1.0g/L(NH₄)₂SO₄, 0.3g/L MgSO₄, 1.36g/L KH₂PO₄이 함유된 125ml 진탕 플라스크에서 pH 7에서 배양하였다.

단백질 측정 : 단백질 농도는 Bio-Red protein assay로 측정하였다. 본 연구에서는 ELISA plate reader에서 595nm파장에서 3회 반복 측정하였다.

Chitinase와 chitobiase활성 측정 : Chitinase활성은 비색법^(4,5)에 따랐으며, ELISA Vmax analyzer(Molecular device)에서 545nm의 파장으로 각각의 well의 파장을 측정했다. 효소활성은 1단위는 분당 1mg NAG를 유리시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다. Chitobiase활성은 상등액 또는 세포 추출물인 효소용액의 분액을 p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosamine(pN-NAG)와 함께 처리했을 때 유리되는 p-nitrophenol의 양을 측정하여 효소활성을 정하였다. 5mM pN-NAG 용액 50 L과 효소용액 20 L을 섞은 것을 효소활성 1단위는 1mg p-nitrophenol을 유리시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다⁽⁶⁾.

결과 및 고찰

그림 1에는 chitin소재를 산화제와 산으로 전처리하여 *Serratia marcescens*를 회분배양 했을 때 경시적 chitinase생성의 경향을 나타내었다. 그 결과 회분 배양 후 7일째인 171시간 배양했을 때 효소 활성이 높은 탄소원으로는 SA와 PC이었으며, 효소활성은 SA가 16,203 U/ml이었고 PC는 10,407 U/ml로서 최대 chitinase활성을 나타내었고, 발효 7일 이후에는 효소활성이 일정하게 유지되는 plateau(안정기)를 나타내었다. WC와 NS와 SW를 탄소원으로 사용한 회분배양한 발효에서는 효소생산이 아주 낮았다.

그림 2는 *S. marcescens*의 발효에 미치는 chitin소재 전처리의 영향과 배양기기(Shaking water bath와 shaking incubator)에 따른 발효율의 차이를 나타내었다. 전처리한 시료 중에서 산화제 처리군(SC1, SC2)과 산 처리군(SA1, SA2)이 발효율이 높았으나, 완전 정제된 chitin으로 발효한 실험군(SW1, SW2)은 극히 낮았다. 한편 배양기기에 따른 차이를 보면 shaking water bath실험군(SA1, SC1, SW1)보다 shaking incubator실험군(SA2, SC2, SW2)의 발효율이 약간 높았다.

그림 3은 *S. marcescens*의 탄소원으로 SW(swollen crab chitin), DSW(dry swollen crab chitin), PC(practical crab chitin, ball milled)을 사용했을 때, 발효시간 경과에 따른 변화를 비교한 것이다. PC를 탄소원으로 사용하여 발효시켰을 때 chitinase와 chitobiase활성이 가장 높게 나타났고, 발효시작 5.5일 후에 최대값을 나타내고 그 이후는 plateau를 나타내었다.

그림 4에 *S. marcescens*를 10L용량의 발효기에 7L의 발효액을 채워 탄소원으로 CF3(입자크기 : 180 - 250 μm)crab chitin을 사용했을 때 발효시간 경과에 따른 효소 생산 경향을 나타낸 결과이다. 발효시작 4.5일 후에 chitinase와

chitinase의 비활성이 최대값을 나타내고 그 이후에는 plateau를 유지한다.

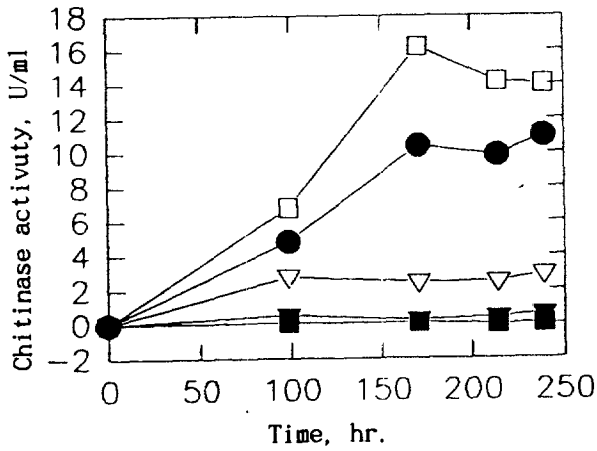


Fig. 1. Chitinase production with different chitin preparation. ● : PC, ▽ : WC, ▼ : NS, □ : SA, ■ : SW.

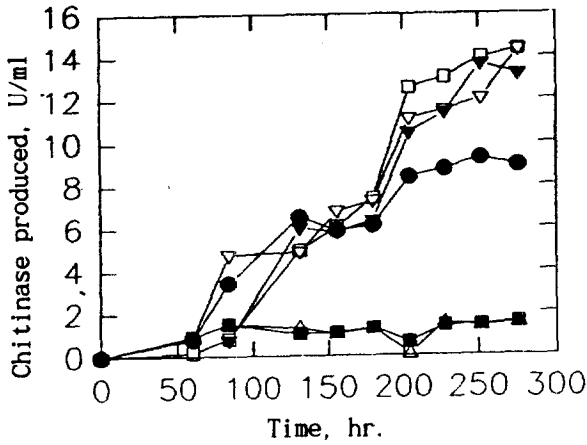


Fig. 2. Effect of pretreatment of chitin source on chitinase production in shaking water bath and shaking incubator. ● : SA1, ▽ : SA2, ▼ : SC1, □ : SC2, ■ : SW1, △ : SW2.

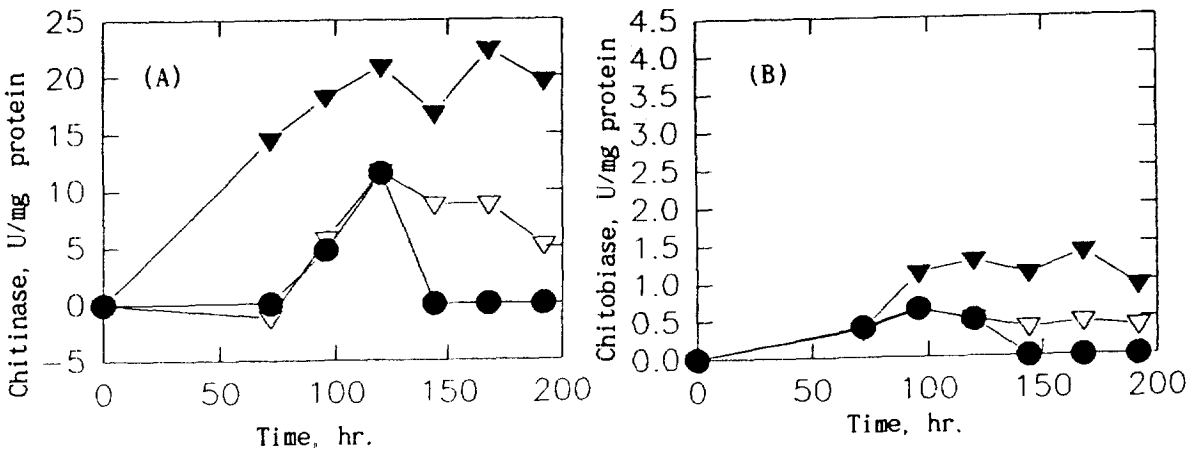


Fig. 3. Chitinase(A) and chitinase(B) production with different chitin preparation. A: ● : SW, ▽ : DSW, ▼ : PC, B: ● : SW, ▽ : DSW, ▼ : PC.

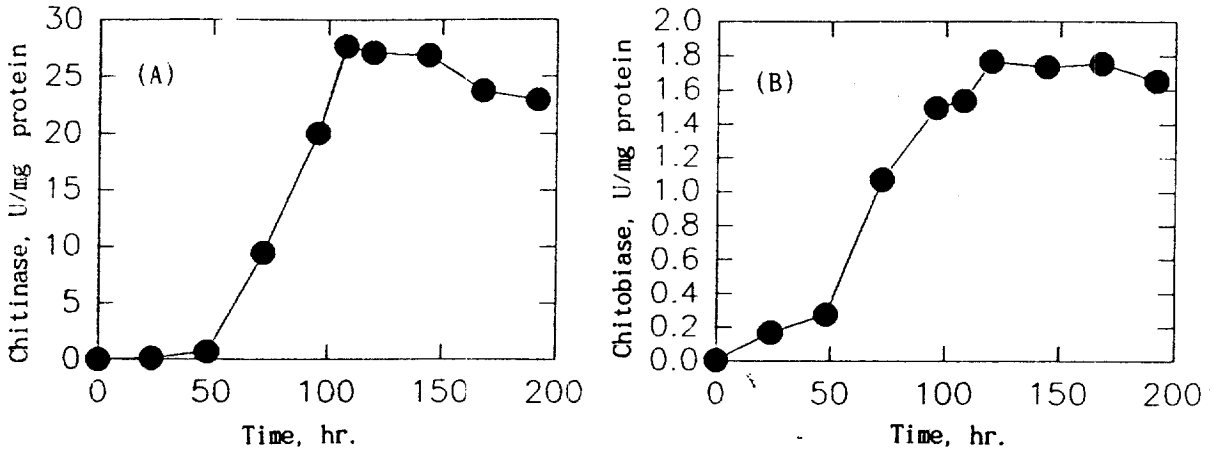


Fig. 4. Fermentation of *S. marcescens* for producing chitinase(A) and chitobiase(B).

참고 문헌

1. Freidman, S.J., and Skehan, P.(1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1172-1176.
2. Zikakis, J.P. (ed.)(1984), Chitin, Chitosan, and Related Enzymes, Academic Press, Orlando.
3. Muzzarelli, R.A.A. (1985), Ch. 6 in: Aspinall, G.O. (ed.) The Polysaccharides, Academic Press, N.Y.
4. Monreal, J., and Reese, E.T. (1969), *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689-696.
5. Reissig, J. L., Strominger, J.L., and Leloir, L.F., *J. Biol. chem.* **217**, 959 (1955).
6. Mori, H., Yano, T., Kobayashi, T., and Shimizu, S.(1979), *J. chem. Eng. Jap.*, **12**, 313.