

Chitinase 생성을 위한 배양 조건 최적화

차진명·¹석근영·[†]차월석
(주)환경과 생명 연구소, 조선이공대학 식품공업과¹, 조선대학교 공과대학, 화학·고분자공학부[†]
(접수 : 2001. 7. 11., 게재승인 : 2001. 8. 20.)

Optimization of Culture Conditions for the Production of Chitinase

Jin Myeong Cha, Keun Young Suk¹, and Wol Suk Cha[†]
Envita Co. Ltd., Gwangju 502-202, Korea

¹Dept. of Food Industrial Eng., Chosun College of Sci. & Tech., Gwangju 501-744, Korea

[†]Div. of Chemical & Polymer Engineering, Chosun Univ., Gwangju 501-759, Korea

(Received : 2001. 7. 11., Accepted : 2001. 8. 20.)

Chitinase producing microorganism, *Serratia marcescens* KY, was isolated from seashore mud around Beobseongpo in Chunnam province by selective enrichment culture. As the colloidal chitin concentration increased, chitinase production was increased. But chitinase production with addition of other carbon sources (glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, starch) was decreased. The effect of nitrogen sources on the chitinase production with *serratia marcescens* KY was as follows. The optimum mineral concentration for chitinase production was K_2HPO_4 0.2 g/L and $MgSO_4$ 0.20~0.25 g/L, respectively. The effect of nitrogen sources on chitinase production by *Serratia marcescens* KY was increased as follows, tryptone > yeast extract > beef extract > asparagine.

Key Words : *Serratia marcescens*, enrichment culture, chitinase production

서론

Chitinolytic 효소를 생성하는 미생물로는 Genus *Serratia*(1), Genus *Pseudomonas*(2), Genus *Bacillus* 등의 세균(3)과 Genus *Streptomyces* 등의 방선균(4), Genus *Aspergillus* 등의 사상균(5), Genus *Saccharomyces* 등의 효모(6)가 있다. 이들 미생물들은 chitinase를 생성하는데 있어서 그들의 성장과 증식을 위하여 주변 환경으로부터 여러 가지 종류의 영양원을 섭취하여 세포 성장과 효소를 생성하는데, 미생물의 영양원중 성장과 증식을 위하여 배지 성분 중 반드시 필요한 탄소원과 질소원이 다량 함유되어 있는 필수 영양원과 배지 성분 중 있는 경우 이용할 수 있으나 없어도 되는 비필수 영양원으로 구분할 수 있다. 또한 영양원 중 미생물이 이용하는 양에 따라 대량 영양원과 미량 영양원으로 구분할 수 있는데 이중 미량 영양원의 경우 미생물이 이용할 수 있는 정확한 필요량을 측정하기는 불가능할 정도로 적은 양이다. 따라서 이들 미량 영양원 중 특히 mineral로 미생물의 세포 증식을 위하여 요구되는 mineral은 S, P, K, Mg, Ca 및 Fe 등

이 있다(7-8).

Chitin을 분해하여 *Serratia marcescens*가 생성하는 효소는 chitinolytic 효소로 대부분 유도 효소이며 기질 첨가에 의해 쉽게 유도되는데 이러한 chitinolytic 효소 생성을 유도하는 유도 물질인 chitin을 직접 사용하거나 효소 생성 균주의 접종에 의한 식물 병원성 사상균 등을 방제하는 연구가 많이 알려져 있다(9-11).

따라서 본 연구에서 *Serratia marcescens*는 chitinase를 생성하기 위하여 미량 영양원이 필요하므로 K_2HPO_4 (K, P)와 $MgSO_4$ (Mg)의 농도에 따른 chitinase 생성을 조사하고자 한다. 또한 *Serratia marcescens*가 chitinase를 대량 생성하기 위한 영양 요구성을 조사하고자 maltose를 포함한 여러 가지 탄소원과 tryptone을 포함한 질소원의 종류에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 조사하여 chitinase 대량 생성을 위한 기초적인 연구 자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

배지 조성 및 균주의 배양

본 연구에서 사용한 균주는 영광 범성포 지역에서 분리한 *Serratia marcescens* KY 분리균주와 공시균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117을 이용하였다. Chitinase 생성을 위한 기본배지의 조성은 증류수 1 L에 chitin 1.2 g, yeast

[†]Corresponding Author : Division of Chemical & Polymer Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-7218, Fax : +82-62-230-7226
E-mail : wscha@mail.chosun.ac.kr

extract 0.5 g, tryptone 1.0 g, NaCl 1.0 g을 포함하며, 300 mL Erlenmeyer flask에 기본배지 100 mL를 주입한 후, 진탕배양기를 사용하여 30°C, 150 rpm에서 pH는 8.0으로 조절하였고, 기본배지에 보관중인 균주를 본 연구의 접종균주로 사용하였다. 균주의 보관은 LB 배지를 사용하였고, 배지의 조성은 증류수 1L에 yeast extract 5.0 g, tryptone 10.0 g, NaCl 10.0 g 및 agar 12.0 g을 녹여 사용하였다.

Mineral 농도에 따른 chitinase 생성

일반적으로 미생물은 효소 생성에 있어서 배지의 성분이 효소 생성에 영향을 미치기 때문에 분리용 배지의 기질인 chitin 이외의 배지 성분인 mineral의 영향을 조사하기 위하여 300 mL Erlenmeyer flask에 기본배지 100 mL를 주입한 후 접종균주 10mL를 접종하여, 30°C, 150 rpm에서 pH 8.0으로 4일간 배양하여 세포 성장과 chitinase 생성을 조사하였다. 즉, *Serratia marcescens*는 chitinase를 생성하기 위하여 미량 영양원이 필요하기 때문에 mineral 중 K_2HPO_4 (K, P)를 기본 배지에 0-0.3 g/L를 첨가하여 K와 P의 영향을 조사하였다 (12-13). 또한 mineral 중 최적 K_2HPO_4 가 포함된 기본 배지에 $MgSO_4$ 를 0-0.3 g/L 농도로 첨가하여 최적 chitinase를 생성하기 위한 mineral 중 Mg의 영향을 조사하여 최적 배양 배지 조건을 알아보았다.

질소원 및 탄소원의 영향에 따른 chitinase 생성

*Serratia marcescens*를 이용하여 chitinase를 대량 생성하기 위한 영양 요구성을 알아보고자 glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, starch, colloidal chitin의 탄소원과 beef extract, trypton, bacto peptone, urea, yeast extract, asparagine 등의 질소원을 이용하여 500mL Erlenmeyer flask에 기본배지 100 mL에 탄소원과 질소원 1g/L를 주입하여 30°C, 150 rpm으로 4일간 배양한 후 탄소원과 질소원의 종류에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 조사하였다(14-15). 또한 질소원 중 chitinase 생성이 우수한 질소원을 선정하여 0-3.0 g/L 농도로 기본 배지에 첨가하여 세포 성장과 chitinase 생성을 조사하여 질소원의 농도 변화가 chitinase 생성에 미치는 영향을 알아보았다.

Chitinase 생성 측정

Colloidal chitin이 포함된 배지에 접종균을 접종한 후 반응 시간의 경과에 따른 chitinase 생성을 조사하였다. 배양액 1.6 mL를 3,000 rpm에서 5 분간 원심분리한 후 colloidal chitin을 제거하고 원심분리 후 얻은 상등액 1.5 mL를 15,000 rpm으로 15분간 다시 원심 분리하여 얻어진 상등액을 chitinase 생성측정에 이용하였다. Chitinase 생성은 Miller(12) 방법을 변형하여 사용하였다. 상등액 300 μ L에 0.5% phosphoric acid가 포함된 colloidal chitin 500 μ L와 DNS(dinitrosalicylic acid)용액 750 μ L를 30°C에서 1시간 진탕 배양한 후 100°C수조에서 10분간 가열하고, 이 반응액을 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 550 nm 흡광도에서 상등액의 환원당을 DNS방법으로 정량 하였고, chitinase 생성은 N-acetyl-D-glucosamine (NAG)에 의해 작성한 표준 곡선과 비교하여 조사하였다. Sodium sulfite는 산화를 방지하기 위하여 chitinase 생성 측정

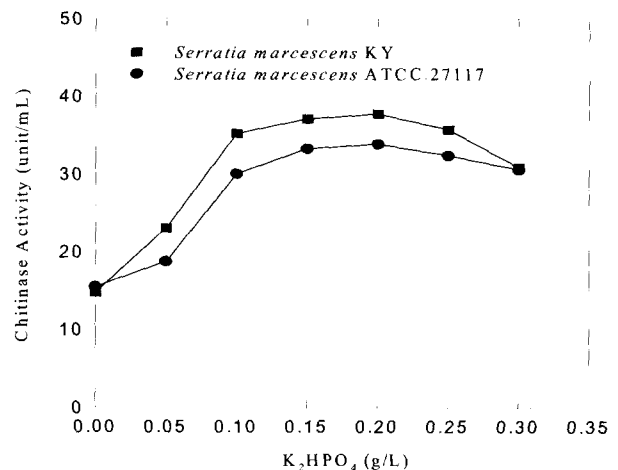


Figure 1. Effect of K_2HPO_4 concentration on the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0, 30°C and 150 rpm for 4 days.

직전에 첨가하여 사용하였으며, N-acetyl-D-glucosamine의 농도가 1 mg/mL 이상 일정 농도에서는 표준 곡선이 직선에서 벗어나므로 조효소액을 첨가하여 환원당을 정리하였다.

Chitinase 1 unit는 1시간 동안 1 μ mole의 N-acetyl-D-glucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

$$\text{Chitinase unit (unit/mL)} = 1.5 \times A_c / 0.221 = 6.79 \times A_c$$

A_c = The amount(mg) of N-acetyl-D-glucosamine in 1.5 mL supernatant

1.5 = Dilution factor

0.221 = Conversion factor of molecular weight

결과 및 고찰

Mineral 농도에 따른 chitinase 생성

Chitinase를 생성하기 위하여 *Serratia marcescens*는 미량 영양원이 필요하므로 기본 배지에 mineral 중 K_2HPO_4 를 0-0.3 g/L 농도로 첨가하여 K와 P의 영향을 조사하였다. 따라서, chitin이 포함된 기본 배지에 K_2HPO_4 를 첨가하여 배지에 첨가한 K와 P의 농도로 생각하고 이들 mineral에 따른 세포 성장과 chitinase의 생성을 조사하여 Figure 1에 나타내었다. 분리 균주인 *Serratia marcescens* KY와 비교 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 기본 배지에 K_2HPO_4 가 0.2 g/L 농도까지는 32~38 unit/mL까지 chitinase 생성이 증가하다가 K_2HPO_4 가 0.2 g/L 이상에서는 두 균주 모두 3~4 unit/mL까지 chitinase 생성이 감소되어 기본 배지에 K_2HPO_4 0.2 g/L로 첨가할 경우 최대 chitinase 생성을 나타내었다. 그러나 K_2HPO_4 농도 0.2 g/L 이상에서는 세포 성장에 따른 균체량은 약간 감소되거나 거의 유사하게 나타났다.

또한 1.2% colloidal chitin과 0.2 g/L의 K_2HPO_4 가 포함된 기본 배지에 $MgSO_4$ 를 0-0.3 g/L 농도로 첨가하여 최대 chitinase 생성과 세포 성장에서 mineral 중 Mg의 영향을 조사한 결과를 Figure 2에 나타내었다. 분리 균주인 *Serratia marcescens* KY와 비교 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 $MgSO_4$ 를 0.2-0.25 g/L로 첨가하였을 때 최대의

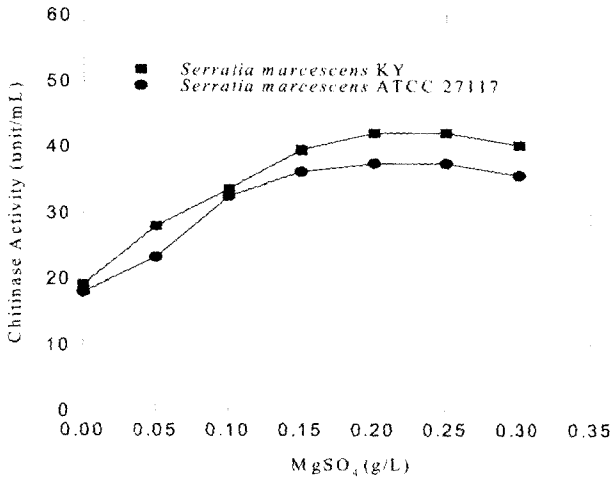


Figure 2. Effect of MgSO₄ concentration on the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0, 30°C and 150 rpm for 4 days.

chitinase 생성을 보였다. 또한 세포 성장에 따른 균체량은 기본 배지에 MgSO₄ 농도가 0.25 g/L 이상에서는 약 5 unit/mL의 chitinase와 0.03 g/L의 건조 균체량이 감소되었다.

따라서 본 연구에서 고찰한 바와 같이 chitinase 생성에 따른 세포 성장은 최적 mineral 농도에서 세포 성장은 chitinase 생성과 일치하나 최적 농도 이상에서는 세포 성장과 chitinase 생성은 일치하지 않았으며 오히려 세포 성장은 유사하였으나 chitinase 생성은 억제되고 있음을 보여 주었다. 이의 결과는 chitinase 생성에 영향을 미치는 몇 가지 종류의 미생물의 mineral의 영향에 대한 보고와 같이 *Vibrio*의 경우 mineral을 영양 요구 인자로 요구하지 않았으나(13), *Aeromonas*의 경우는 KH₂PO₄와 NaCl을 요구하였고(9) *Streptomyces*(4)와 *Aspergillus*(5) 등은 MgSO₄, KH₂PO₄ 및 K₂HPO₄ 이외에도 FeSO₄, ZnSO₄ 및 CaCl₂를 필요로 하고, 또한 이들 *Serratia marcescens*는 MgSO₄, KH₂PO₄를 요구한다는 연구결과와 일치하고 있다(11).

연구결과를 종합적으로 고찰해 보면 방선균, 곰팡이 및 세균들은 K, Mg 및 기타 mineral들이 영양 요구 인자로서 사용하고, 본 연구에서 사용한 *Serratia marcescens*는 K, P, Mg 및 기타 mineral을 영양 요구 인자로서 필요하다.

탄소원의 영향에 따른 chitinase 생성

*Serratia marcescens*는 탄소원이 chitinase의 생성에 영향을 미치기 때문에 colloidal chitin을 1.2% 함유하고 있는 기본 배지에 탄소원을 1 g/L 농도로 첨가한 후 탄소원의 종류에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 조사하여 Figure 3에 나타내었다.

Serratia marcescens KY는 colloidal chitin만을 첨가하였을 때는 38.5 unit/mL의 chitinase를 생성하였고, 비교 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 32.3 unit/mL를 생성하였다. *Serratia marcescens* KY는 colloidal chitin 이외에 탄소원 중 maltose는 15.4 unit/mL, 비교 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 14.4 unit/mL chitinase를 생성하였다. *Serratia marcescens* KY와 *Serratia marcescens* ATCC 27117의 여러

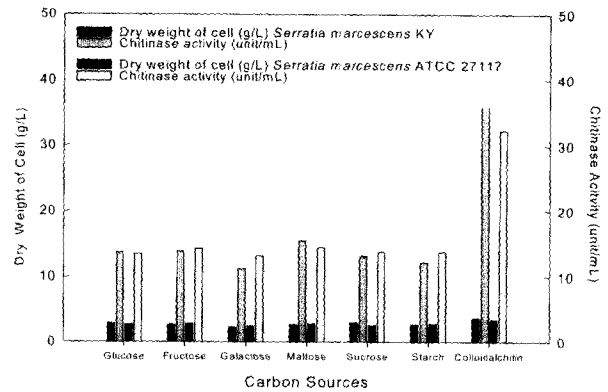


Figure 3. Effect of various carbon sources on the cell growth and the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0, 30°C and 150 rpm for 4 days.

가지 탄소원에 따른 세포 성장은 두 균주 모두 glucose, fructose, maltose, sucrose 및 starch에서는 비교적 세포 성장이 높게 나타났다. 즉, *Serratia marcescens*는 세포 성장이 높게 나타난 후 chitinase 생성이 활발하게 나타나므로 세포 성장에 있어서 배지의 성분을 적절히 조절하는 것이 chitinase를 대량으로 생성할 수 있을 것으로 생각되며(16), colloidal chitin에 탄소원을 첨가할 경우 *Serratia marcescens*는 모든 탄소원에서 chitinase 생성이 억제되었다. 이의 결과는 탄소원의 영향에 따른 chitinase 생성 결과는 Monreal과 Reese(11)가 보고한 *Serratia marcescens*에 의한 chitinase 생성 조건에서 1% chitin이 함유된 배지에 sucrose, NAG, glucosamine 및 glucose를 첨가한 경우 sucrose만 제외하고 모두 억제 현상을 보였고, Yabuki(9) 등은 *Aeromonas hydrophila*가 생성하는 chitinase에 관한 연구에서 glucose와 glucosamine을 첨가하면 두 탄소원에서는 chitinase 생성이 억제된다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서 이용한 *Serratia marcescens*는 탄소원을 첨가할 경우 feed back 저해를 받는 것으로 나타나 앞으로 chitinase 생성에 따른 탄소원의 저해 현상은 향후 더 세부적인 연구가 수행되어야 할 과제로 생각되어진다.

질소원의 영향에 따른 chitinase 생성

Serratia marcescens KY와 *Serratia marcescens* ATCC 27117의 질소원의 종류에 따른 chitinase 생성과 세포 성장은 기본 배지에 함유되어 있는 1.2% colloidal chitin 대신 질소원을 1 g/L 농도로 첨가하여 배양한 후 질소원의 종류에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 조사하여 Figure 4에 나타내었다. 세포 성장에 따른 chitinase 생성은 질소원의 종류에 따라 약간의 영향을 받았으며 두 균주 모두 질소원 첨가에 따른 chitinase 생성은 tryptone이 가장 우수하였고, 분리 균주인 *Serratia marcescens* KY는 40.8 unit/mL, 비교균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 36.5 unit/mL를 생성하였다. 또한 두 균주 모두 yeast extract, asparagine, nutrient, beef extract에서는 chitinase 생성이 우수하였고, bacto peptone이 가장 저조하였으며, 이들 균주는 tryptone, yeast extract, asparagine, beef extract 및 bacto peptone에서는 상대적으로 세포 성장이 높게 나타났다.

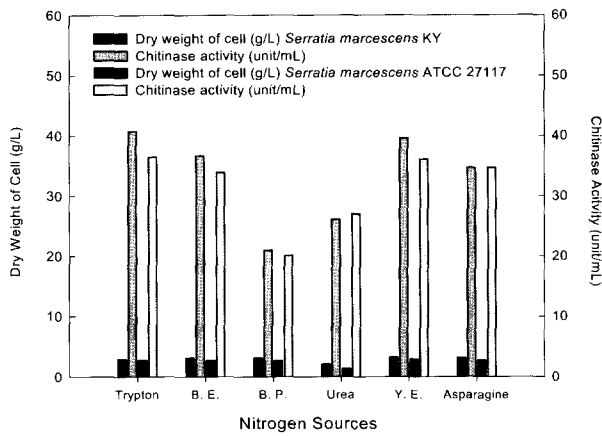


Figure 4. Effect of various nitrogen sources on the cell growth and the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0, 30°C and 150 rpm for 4 days.

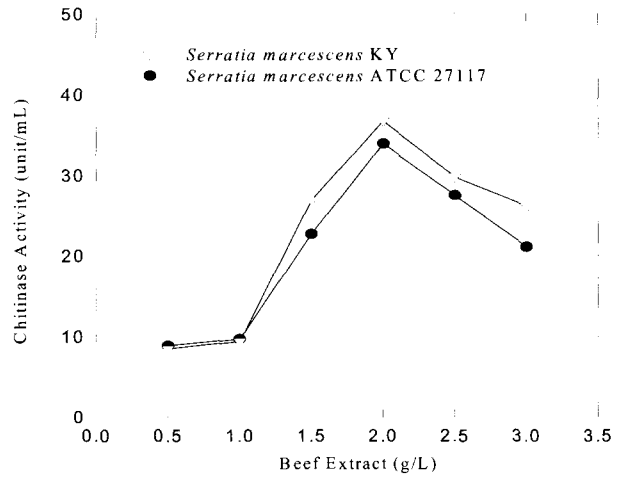


Figure 5-C. Effect of beef extract concentration on the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0, 30°C and 150 rpm for 4 days.

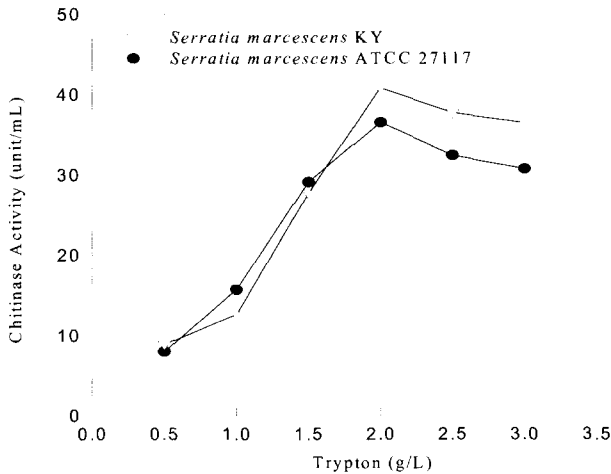


Figure 5-A. Effect of trypton concentration on the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0, 30°C and 150 rpm for 4 days.

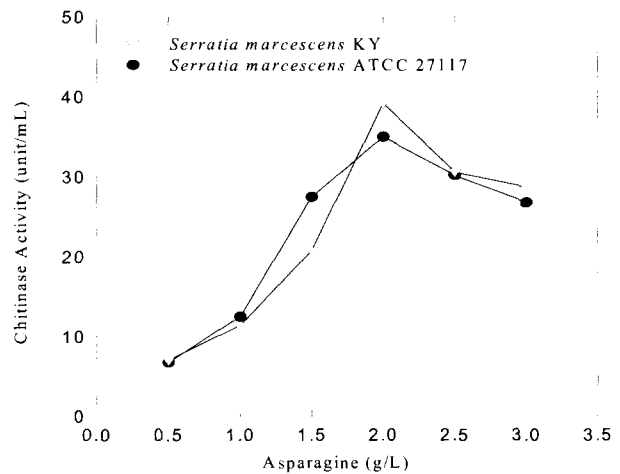


Figure 5-D. Effect of asparagine concentration on the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0 30°C and 150 rpm for 4 days

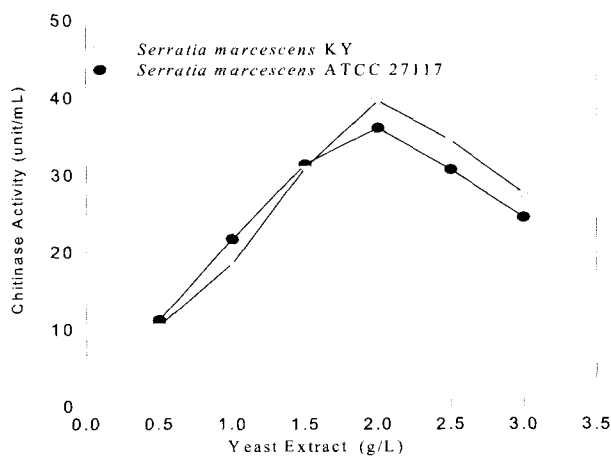


Figure 5-B. Effect of yeast extract concentration on the chitinase production by *Serratia marcescens*. *Serratia marcescens* were cultured by the shaking incubator at pH 8.0, 30°C and 150 rpm for 4 days.

따라서 세포 성장과 chitinase 생성이 우수한 질소원 중 tryptone, yeast extract, beef extract 및 asparagine을 선정하여 이들 질소원의 농도에 따른 chitinase 생성을 조사하여 Figure 5의 A, B, C, D에 나타내었다. 모든 질소원은 2 g/L 질소원 농도까지는 질소원 농도가 증가함에 따라 chitinase 생성은 증가하다가 2.0% 이상의 농도에서는 chitinase 생성은 감소하였다. 즉, 최적 질소원 농도 이상에서는 chitinase 생성은 질소원의 농도에 기질의 억제 현상을 나타냄을 알 수 있었다 (17-18). 이는 질소원의 영향에 따른 chitinase 생성 결과는 Monreal과 Reese(11)가 보고한 바와 같이 *Serratia marcescens*에 의한 chitinase 생성 조건에서 *Serratia marcescens*는 vitamin B군이 함유된 yeast extract와 같은 질소원을 첨가할 경우에 chitinase 생성에 영향을 미치므로 이 균주는 vitamin B군과 같은 질소원을 growth factor로 요구한다는 보고와 일치하였다.

요 약

Serratia marcescens KY와 *Serratia marcescens* ATCC 27117 두 균주 모두 기본 배지에 K_2HPO_4 농도를 0.2 g/L 농도 첨가할 경우 최대 chitinase 생성을 나타냈다. 그러나 세포 성장에 따른 균체량은 기본 배지에 K_2HPO_4 농도 0.2 g/L 이상에서는 균체량은 약간 감소한다. 1.2% colloidal chitin과 0.2 g/L의 K_2HPO_4 가 포함된 기본 배지에 $MgSO_4$ 농도에 따른 chitinase 생성과 세포 성장은 $MgSO_4$ 를 0.2-0.25 g/L를 첨가하였을 때 최대의 chitinase 생성을 보이고, 두 균주 모두 K, P, Mg 및 기타 mineral을 영양 요구 인자로서 필요하다. Colloidal chitin을 1.2% 함유하고 있는 기본 배지에 각종 탄소원의 종류에 따른 세포 성장과 chitinase 생성은 colloidal chitin만을 첨가하였을 때가 상대적으로 가장 우수하고, 탄소원을 첨가할 경우 *Serratia marcescens*는 모든 탄소원에서 chitinase 생성이 억제되었다. 또한 질소원에 따른 세포 성장과 chitinase 생성은 *Serratia marcescens* KY와 *Serratia marcescens* ATCC 27117 모두 tryptone이 가장 우수하였고, 2.0 g/L의 질소원 농도까지는 질소원 농도가 증가함에 따라 chitinase 생성은 증가하다가 2.0 g/L 이상의 농도에서는 질소원 농도가 증가함에 따라 chitinase 생성은 감소하였다. 이들 질소원 중 chitinase 생성은 tryptone > yeast extract > beef extract > asparagine 순서로 chitinase가 생성되므로, *Serratia marcescens*는 chitinase 생성에 있어 vitamin B군과 같은 질소원을 growth factor로 요구한다.

감 사

본 연구는 1998년 조선대학교 교내학술연구조성비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Nestle, M and W. K. Roberts (1969), Extracellular nuclease from *Serratia marcescens*, *J. Biol. Chem.* **244**, 5213-5218.
- Wang, S. L. and W. T. Chang (1997), Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium, *Appl. Envir. Microbiol.*, **63**, 380-386.
- Mitsutomi, M., H. Kidoh, H. Tomita, and T. Watanabe (1995), The action of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase on partially N-acetylated chitosan, *Biosci. Biotech. Biochem.* **95**, 529-531.
- Ohtakara, A., H. Matsunaga, and M. Mitsutomi (1990), Action pattern of *Streptomyces griseus* chitinase on partially N-acetylated chitosan, *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3191-3199.
- Mohamed, A. Abdel-Naby, Nefsia M. El-Shayeb, and A. A. Sherief (1992), Purification and some properties of chitinase from *Aspergillus carneus*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **37**, 141-154.
- Correa, J. U., N. Elango, I. Polacheck, and E. Cabib (1982), Endochitinase a mannon - associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **257**, 1392-1397.
- Hedges, A. and R. S. Wolfe, Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both B-1, 4-glucanase and chitosanase activities, *J. Bacteriol.* **20**, 844-853.
- Kim, Y. S., K. B. Lee, and R. J. Linhardt (1991), Detection of chitinase activity using fluorescence-labeled substrate on polyscrylamide gel, *Korean Biochem. J.* **24**, 466-471.
- Yabuki, M., K. Mizushima, T. Ando, T. Fugi, M. Sbinada, and M. Yamasbita (1986), Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *artarogenes* A-52, *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**, 25-31.
- Roberts, R. H. and E. Cubib (1982), *Serratia marcescens* chitinase : one-step purification and use for the determination of chitin, *Anal. Biochem.* **127**, 402-412.
- Monreal, J. and E. T. Reese (1969), The chitinase of *Serratia marcescens*, *Can. J. Microbiol.* **15**, 689-696.
- Miller, L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Ohtakara, A. and M. Mitsutomi (1979), Purification and some properties of chitinase from *Vibrio sp.*, *J. Ferment. Technol.* **57**, 169-174.
- Lee, D. H., E. L. Lee, and K. H. Lee (2000), Isolation and characterization of chitosanase-producing microorganism, *Aureobacterium sp.* YL, from crab shells, *J. Microbiol.* **10**(2), 208-214.
- Hadwiger, L. A., B. Fristensky, and R. C. Riggelman (1984), Chitin, chitosan and related enzyme, p291-302, *J. P. Zikakis*(ed.), New York, U.S.A.
- Wang, S. L. and W. T. Chang (1997), Purification and Characterization of two Bifunctional Chitinase/Lysozymes Extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a Shrimp and Crab shell powder medium, *Appl. Envir. Microbiol.*, **63**(2), 380-386.
- Hiroshi, T., Y. Yugio, and K. Miyamoto (1992), Purification, properties and partial amino acid sequence chitinase from a marine *Alteromonas sp.* strain O-7, *Can. J. Microbiol.* **38**, 891-897.
- Jones, J. D. G., K. L. Grady, T. V. Suslow, and J. R. Bedbrook (1986), Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*, *EMBO J.* **5**, 467-473.