

배양액중의 유기영양물이 Chitinase 생산에 미치는 영향

장지윤 · 김인철¹ · 장해춘*

조선대학교 식품영양학과, ¹목포대학교 식품공학과

Effects of Organic Nutrients on Chitinase Production in Minimal Media. Chang, Ji Yoon, In Cheol Kim¹ and Hae Choon Chang*. Department of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea, ¹Department of Food Engineering, Mokpo National University, Chonnam 534-729, Korea – Four chitinase producing bacteria, *Arthrobacter nicotinae* CH4, *Arthrobacter nicotinae* CH13, *Arthrobacter* sp. CH5 and *Micrococcus* sp. CH3, were isolated from small crabs and shrimps. We investigated the optimum medium condition for the production of enzyme and high cell mass. The preferable medium composition was as follows: colloidal chitin 0.1%(w/v), glycerol 0.25%(w/v) and yeast extract 0.05%(w/v) in minimal medium (K₂HPO₄ 0.7 g/l, KH₂PO₄ 0.3 g/l, MgSO₄·5H₂O 0.5 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l, ZnSO₄ 0.001 g/l, MnCl₂ 0.001 g/l, pH 7.0). This cell culture medium could be used directly as sample for measuring chitinase activity. Because it hardly contained reducing sugar such as glucose (blank value ≈ 0), the detected reducing sugar can be considered as a chitinase reaction product. The results can be used for easy preparation method for determination of enzyme activity and analysis of enzyme-substrate reaction in step of screening of chitinase producing bacteria.

Key words: Colloidal chitin, minimal media, chitinase, glycerol, yeast extract

N-Acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)의 β-1,4 중합체인 chitin은 지구상에 풍부하게 존재하는 biomass이며 chitin과 그 유도체, chitin 올리고당은 다양한 생리활성을 나타내어 식품·의약품의 중간원료소재로 이용되고 있다[12, 18]. 특히 chitin올리고당은 중합도에 따라 다른 생리활성을 나타내어 (GlcNAc)₁은 관절염이나 대장염 또는 다른 소화기관의 염증치료제로서 효능이 [6, 9], (GlcNAc)₆₋₇은 항종양활성 등의 생리활성을 지닌다고 알려지고 있다[18].

해양 무척추동물, 곤충, 곰팡이 등에서 해마다 수천억톤씩 새로이 생합성 되고 있는 chitin 물질의 이용성을 높이기 위한 방법 중 한 가지는 chitin 분해에 의한 부가가치가 높은 다양한 chitin 올리고당의 생산일 것이다. Chitin의 분해는 산 가수분해에 의한 화학적 방법과 효소적 가수분해 방법이 있다[20, 21]. 산가수분해법을 통한 chitin의 분해는 부식과 환경오염 등의 문제점이 있어 사용에 제한이 따른다. 이에 반해 효소를 이용한 chitin의 가수분해방법은 분해산물의 중합도를 효율적으로 조절할 수 있어 기능성 chitin 올리고당의 고순도 제조에 가장 이상적인 방법으로 제시되고 있다[21]. Chitinase 산업화의 가장 큰 경제적 장점으로 효소생산의 단가, 기질의 저장성, 낮은 당화율, 효소의 불활성화, 낮은 효소 회수율 등이 지적되고 있다[1]. 그러므로 내구성과 당화율이 뛰어나며 우수한 특성을 지닌 chitinase의 발굴과 함께 이를

쉽고 빠르게 분리, 회수하고 분석할 수 있는 보다 경제적이고 용이한 실험방법이 요구되어진다.

미생물은 우수하고 다양한 chitinase를 얻을 수 있는 자원 중 하나이며, chitinase를 생산하는 미생물에 관한 많은 보고가 있었다[2, 4, 5, 14, 19]. 미생물에서 유래되는 chitin 분해효소는 대부분 세포외 분해효소이고 기질(chitin)에 의하여 효소생산이 유도된다고 알려지고 있다[4, 10, 14, 19]. 기존에 세균유래 chitinase 관련 연구에서 효소생산을 위한 배지의 조성을 살펴보면 colloidal chitin과 무기염류(KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl 등)를 함유한 최소배지에 탄소원이나 질소원 등의 영양물을 첨가하였다(3% tryptone[14], 0.5% glucose+0.2% peptone[13], 0.1% yeast extract[2], 0.3% NaNO₃ or 0.5% polypeptone[12], 0.2% glucose+0.5% peptone+0.5% yeast extract[11]). 균체배양액으로부터 많은 균체생산과 함께 이로부터 분비되는 보다 많은 효소를 얻기 위해서는 colloidal chitin을 탄소원으로 하는 최소배지에 추가적으로 균체생육을 증강시킬 수 있는 다른 영양물질의 보충이 필요하였다. 그러나 보다 높은 농도의 영양물질 존재 하에서의 균체배양은 균체생산량을 증가시킬 수는 있지만, 경우에 따라 추가적인 영양물(탄소원 혹은 질소원) 자체가 feed back inhibition 작용으로 chitinase 합성을 저해시킬 수 있고[3, 7, 10, 15, 22], 효소의 분리와 정제에 보다 많은 시간과 비용을 소모하게 한다.

균주의 분리(screening)단계에서 우수한 chitinase 생산균 주로 선발될 가능성이 보이는 균주를 1차 분리용 agar plate 상에서 선별하였으나, 1차 분리 이후 최종 효소활성 확인단

*Corresponding author

Tel: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-222-8086

E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

계 및 효소-기질 반응산물 확인을 위한 분리균주의 액체배양 실험단계에서 chitin을 유일한 탄소원으로 하는 최소액체배지에서는 균체의 생육이 전혀 일어나지 않는 경우가 종종 발생한다. 이 분리균주를 액체영양배지(rich media)하에서 배양하면 균체생육은 잘 이루어지지만 chitinase 활성은 더 이상 관찰되지 않는 경우를 자주 접할 수 있다. Chitinase 생산균주를 배양하기 위한 배지조성 시 고려할 사항은 배지내 조성물은 효소생산의 최적조건이 되는 영양성분 조성도와 함께, 배지 조성성분 자체가 균체배양 후 배지내로 분비된 효소를 회수 할 때 분리정제 시료혼합물의 구성성분이 된다는 점이다. 즉, 적정 배지조성이 최대효소생산 달성과 함께 간편하고 손쉬운 분리 정제를 동시에 해결할 수 있는 핵심사항이 된다는 것이다.

본 연구에서는 colloidal chitin을 함유하는 최소배지(minimal media)에 최소량의 영양물질의 공급만으로 높은 균체 생육과 함께 높은 효소활성을 얻을 수 있는 배지조성을 찾아 이에 보고하고자 한다.

실험에 사용된 균주는 본 연구실에서 작은 게, 새우의 껍질로부터 높은 chitinase 활성을 보이는 균주 4종을 최종 분리하였다. 분리균주는 그람염색, 현미경관찰을 통한 형태학적 특성을 관찰하고 metabolic finger print(Biolog)분석결과 2종은 *Arthrobacter* sp.와 *Micrococcus* sp.로 동정되어 *Arthrobacter* sp. CH5 *Micrococcus* sp. CH3로 명명하였다. 이와 더불어 16s rDNA 염기서열 분석을 거친 2종은 *Arthrobacter nicotinae*로 동정되어 각각 *Arthrobacter nicotinae* CH4, 그리고 *Arthrobacter nicotinae* CH13로 명명하였다[5].

사용배지는 0.4%의 colloidal chitin을 함유한 mineral 배지를 최소배지로 삼았으며 그 조성은 colloidal chitin 4.0 g/l, K_2HPO_4 0.7 g/l, KH_2PO_4 0.3 g/l, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/l, $ZnSO_4$ 0.001 g/l, $MnCl_2$ 0.001 g/l, pH 7.0이 되도록 만들었다. 기질로 사용된 colloidal chitin은 Lockwood 방법[8]을 약간 변형시켜 전보[5]와 같이 제조하였다. Chitin은 Sigma Co.(St. Louis, Mo)의 기질용 chitin(Partial grade, Sigma Co., C7170)을 사용하였고, 효소활성은 Somogyi-Nelson방법[17, 22]으로 측정하였다. 분리된 균주는 colloidal chitin 최소배지 혹은 LB 액체배지에서 배양한 후 glycerol을 섞어 최종 glycerol 농도 25%가 되게 하여 -70°C에서 동결보관하면서 사용하였다.

배지 내 영양물질이 균체생육과 효소활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 영양물질(탄소원, 질소원)에 따른 균체생육도와 이때의 효소활성을 측정하였다.

1) colloidal chitin 최소배지에서의 배양은 5 ml 0.4% colloidal chitin 최소배지에서 30°C, 24시간 전배양한 후 0.4% colloidal chitin 최소배지 100 ml에 1% 접종하고 30°C에서 24시간 진탕배양하여 균체 생육도와 효소활성을 측정하여 Table 1-A에 나타내었다. 이 때 효소의 활성은 균체배양

Table 1. Chitinase activity and No. of viable cells in colloidal chitin mineral media with additional nutrient.

Media		Strain			
		CH3 ¹	CH4 ²	CH13 ³	CH5 ⁴
A	Enzyme Activity(mg/ml)	0.023	0.040	0.004	0.002
	No. of viable cell(CFU/ml)	4.6×10^7	1.9×10^7	2×10^6	1.6×10^7
B	Enzyme Activity(mg/ml)	0.016	0.09	0	0.007
	No. of viable cell(CFU/ml)	1.5×10^6	2×10^6	2×10^6	2×10^6
C	Enzyme Activity(mg/ml)	0.023	0.044	0.002	0.001
	No. of viable cell(CFU/ml)	5×10^6	1×10^6	1.1×10^7	4.2×10^7
D	Enzyme Activity(mg/ml)	0.013	0.032	0	0
	No. of viable cell(CFU/ml)	4.6×10^9	1.5×10^9	2.1×10^8	4×10^8
E	Enzyme Activity(mg/ml)	1.01	0.92	0.646	0.74
	No. of viable cell(CFU/ml)	1.6×10^9	4.1×10^{10}	6.7×10^{10}	5.5×10^9

A: Colloidal chitin 0.4% in minimal media*(K_2HPO_4 0.7 g/l, KH_2PO_4 0.3 g/l, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/l, $ZnSO_4$ 0.001 g/l, $MnCl_2$ 0.001 g/l, pH 7.0)

B: Colloidal chitin 0.4% + glycerol 0.25% in minimal media*

C: Colloidal chitin 0.4% + peptone 5% in minimal media*

D: Colloidal chitin 0.4% + yeast extract + 0.05% in minimal media*

E: Colloidal chitin 0.4% + glycerol 0.25% + 0.05% yeast extract in minimal media*.

¹*Micrococcus* sp. CH3, ²*Arthrobacter nicotinae* CH4, ³*Arthrobacter nicotinae* CH13, ⁴*Arthrobacter* sp. CH5

후 배양액 내에 검출되는 환원당(N-acetyl glucosamine, GlcNAc)의 양으로 표시하였다. 환원당의 정량은 N-acetyl glucosamine(Sigma Co. A8625)의 농도별 Somogyi-Nelson 법에 따른 표준곡선으로부터 구하였다. 균체생육은 배양액의 일정한희석비율에 따른 colony forming unit(CFU/ml)로 나타내었다.

어떠한 추가적인 영양물 공급 없이 0.4% colloidal chitin과 무기 mineral만을 함유한 최소배지에서 24시간동안 배양시켰을 때 분리균주 4종의 배지 내 생균수는 모두 10^{6-7} CFU/ml를 나타내어 어느 정도의 균체생육은 얻을 수 있었으나, 이 균체들이 분비하는 chitinase의 작용에 의한 24시간 동안 배양된 배지에서 환원당의 양은 거의 검출되지 않았다. 이는 동균주가 colloidal chitin만을 유일한 탄소원으로 하는 최소배지에서 chitinase 작용에 따라 뿌연 colloidal chitin 현탁액을 가수분해시켜, plate상에 형성된 colony 주변으로 확산하고 커다란 투명환을 형성하는 결과와는 크게 달랐다. 즉, chitin만을 유일한 탄소원으로 하는 최소배지만의 영양 조성으로는 균주 선별단계의 고체배양(plate)에서의 역가확인인 가능하지만 chitinase 효소활성이 확인된 분리균주로부터 효소를 얻기 위한 액체배양에서는 균체생육만 나타나고 효소활성은 관찰되지 않았다. 그러므로 어떠한 배지조성이 균체생육과 더불어 높은 chitinase 활성을 유지할 수 있는지 조사하였다.

2) Glycerol의 영향은, 전배양시는 5 ml의 0.4% colloidal

chitin 최소배지를 사용하고 본배양은 100 ml colloidal chitin 최소배지에 0.25% glycerol을 첨가하여 살펴보았다. 0.4% colloidal chitin 최소배지에 추가적으로 0.25% glycerol을 공급한 경우 균체 생육은 10^6 CFU/ml 정도였으며 배지 내에서 chitinase의 작용은 거의 확인되지 않았다(Table 1-B). 이러한 결과는 colloidal chitin만을 탄소원으로 하는 경우와 별다른 차이를 나타내지 않는 결과였다.

3) Peptone의 영향은 5 ml 0.4% colloidal chitin 최소배지에서 24시간 동안 전배양하고, 100 ml 액체 본배양 시 colloidal chitin 최소배지에 5% peptone을 첨가한 배지에 전배양된 균주를 1%(v/v) 접종하여 30°C, 24시간 배양한 후 균체생육과 배지 내에서 검출되는 환원당양을 효소활성으로 측정하였다(Table 1-C). Peptone 역시 앞의 두 경우의 결과와 같이 균체생육은 관찰되나 chitinase 활성은 거의 검출되지 않았다.

4) Yeast extract의 영향을 알아보기 위하여, 전술된 실험과 동일한 조건에서 0.05% yeast extract을 추가로 첨가하였다. 균의 생육은 10^{8-9} CFU/ml으로 다른 처리구에 비하여 높았으나 배지 내에서 chitinase 활성은 거의 검출되지 않았다(Table 1-D).

5) 0.4% colloidal chitin 최소배지에 0.25% glycerol과 0.05% yeast extract를 동시에 첨가하여 다른 처리구와 동일한 조건에서 배양하였을 때 높은 균의 생육과($10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml) 함께 높은 활성이 관찰되었다(Table 1-E).

기존에 보고된 많은 연구들[11, 13, 16]에서 glucose를 colloidal chitin배지에 첨가한 경우가 있었으나 본 연구에서는 glucose 첨가 실험은 수행하지 않았다. 그 이유는 glucose 첨가 없이 높은 효소활성을 유지할 수 있는 액체배양이 가능하였기 때문이다(Table 1-E). 또한 본 실험의 목적이 chitinase활성을 쉽고 간편하고 빠르게 액체배양을 통하여 알아보고자 함이기 때문이다. 본 연구에서는 매번 효소를 분리하여 효소기질을 반응시켜 효소역가를 측정하는 방법이 아닌, colloidal chitin(polymer)을 탄소원으로 하는 최소배지에 chitinase 분리균주를 배양하여 균주가 생육함에 따라 분비되는 효소작용에 의하여 공급된 영양물질인 chitin(polymer)이 분해되면서 생기는 환원당을 측정하도록 구성하였다. 이러한 실험설계에서 배지조성에 glucose와 같은 당의 공급은 Somogyi-Nelson법을 통한 환원당 정량 시 그대로 검출되어 chitinase의 작용이 없는 배양 0시간에도 높은 초기값(환원당 0.93 mg/ml)을 나타낸다. 배지내 존재하던 초기 환원당(glucose)양은 배양시간에 따른 chitinase 작용에 의한 환원당(GlcNAc) 생성량을 실제로 정확하게 측정할 수 없게 하기 때문에 배지에 glucose를 첨가하지 않고 실험하는 방법을 택하였다. Glycerol이나 yeast extract는 환원당 정량시 거의 환원당으로 정량되지 않으며, 단지 균주생육을 돕고 무엇보다 중요한 액체배양에서 효소의 활성을 극대화시킬 수 있음을 발견하였다. 그러므로 배지에 투입된

colloidal chitin이 배지성분으로 균주의 영양물이 되는 동시에 균체생육에 따른 효소생성과 생성된 효소와 배지내 chitin 기질과의 반응에 따라 동배지에서 그 대사산물을 효소기질반응의 생성물로(chitin 분해산물: 환원당) 검지할 수 있어 우량한 chitinase 분리균주 선별 시 효소활성을 확인할 수 있는 매우 효율적인 실험방법으로 쓰여 질 수 있다.

본 논문에서는 배양액으로 분비된 chitinase에 의하여 배지중의 colloidal chitin이 가수분해되어 생성된 환원당양을 정량하여 효소의 활성을 간접적으로 측정하는 방법을 사용하였다. 그러나 이때 가수분해된 GlcNAc 혹은 GlcNAc oligomer는 배지에 전량 잔류하는 것이 아니라 배양균주의 영양원으로 균체에 의하여 흡수되어 균체증식 및 에너지 대사에 이용될 것이다. Colloidal chitin배지에서 분리균주의 생육에 따라 chitinase작용에 의한 배양액내 chitin 환원당의 함량을 조사하였을 때, 효소작용에 따른 환원당의 생산량은 생균수 증가와 함께 증가하기 시작하여 배양 20시간 이후 인 정지기 때 최대에 도달함을 전보에서 보고한 바 있다[5]. 그러므로 본 실험의 효소역가 측정 시기는 균주의 생육시점에서, 당의 소진이 더 이상 기대되지 않는 정지기 무렵인 배양 24시간 이후를 택하였다.

이와 같은 실험을 통하여 colloidal chitin 최소배지에 yeast extract와 glycerol이 본 분리균주들의 chitinase 활성화에 필요한 중요한 인자임을 확인하였다. 그러므로 chitin, yeast extract와 glycerol 세 가지 영양물질들의 배지 내 최적 농도를 조사하였다.

1) 우선 효소생산을 위한 배지 내 최적 chitin 농도를 구하기 위하여 0.25% glycerol과 0.05% yeast extract를 함유한 최소배지에 colloidal chitin을 0, 0.05, 0.1, 0.4%(w/w) 가하여 colloidal chitin 농도에 따른 균체생육과 효소활성을 측정하였다(Fig. 1). 이때도 효소활성측정법은 상기조건의 최소배지에서 24시간 균체를 배양하여 균체생육에 따른 chitinase 분비의 결과로 배지 내 공급된 colloidal chitin이 가수분해 되어 생성된 환원당의 양을 Somogyi-Nelson법으로 검출하는 방법을 사용하였다. 이때 동일한 배양조건에서 균체를 접종하지 않은 구를 대조구로 삼았으며, 대조구에서는 거의 환원당이 검출되지 않았다. Fig. 1의 결과와 같이 colloidal chitin이 전혀 공급되지 않은 배지에서는 chitin 첨가구보다 균체생육이 낮아지기는 하였지만(약 10^{-1} 배) $10^8 \sim 10^9$ CFU/ml의 확연한 균체생육을 나타내었다. 그러나 이 균체생육과 함께 분비된 chitinase 작용에 의한 환원당생성은 거의 검출되지 않았다. 이는 기존의 연구들[4, 10, 14, 19]에서 chitinase가 유도효소임을 보고하는 바와 일치하는 결과이다. 분리균주 4종 모두 효소활성이 0.1%(w/v)에서 가장 높은 것으로 나타났으며 0.05%나 0.4%는 거의 비슷한 정도로 나타났었다(Fig. 1). 0.1% colloidal chitin을 최적농도로 정하여, 이후의 실험에서는 배지 내 colloidal chitin은 0.1%로 사용하였다.

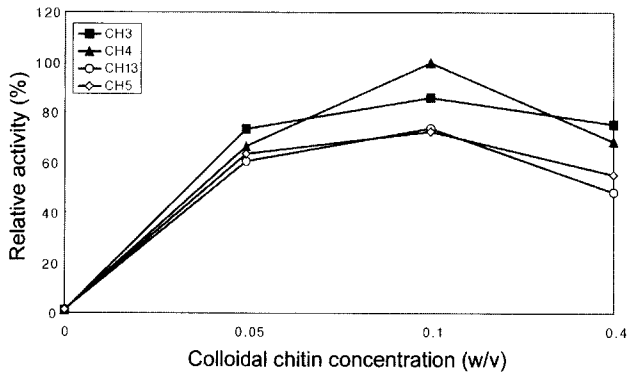


Fig. 1. Effect of colloidal chitin on chitinase production. Actual enzyme activity is 1.34 mg/ml when relative activity is 100%. ■: *Micrococcus* sp. CH3, ▲: *Arthrobacter nicotianae* CH4, ○: *Arthrobacter nicotianae* CH13, ◇: *Arthrobacter* sp. CH5.

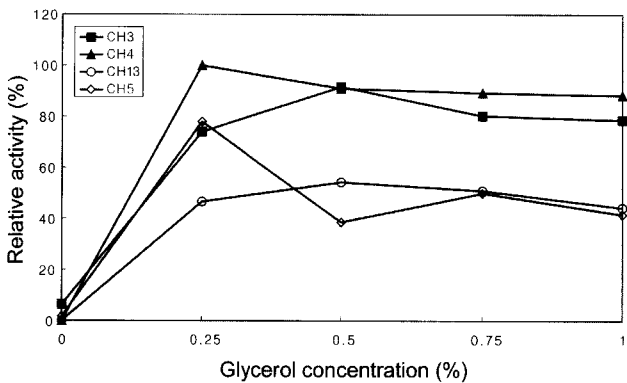


Fig. 2. Effect of glycerol on chitinase production. Actual enzyme activity is 1.78 mg/ml when relative activity is 100%. ■: *Micrococcus* sp. CH3, ▲: *Arthrobacter nicotianae* CH4, ○: *Arthrobacter nicotianae* CH13, ◇: *Arthrobacter* sp. CH5.

2) 최적 glycerol 농도를 구하기 위하여 0.1% colloidal chitin +0.05% yeast extract를 함유한 최소배지에 glycerol을 0, 0.25, 0.75, 1.0%(w/v) 첨가하여 균체를 배양하고 균생육과 효소활성을 측정하였다(Fig. 2). 균의 생육은 colloidal chitin과 yeast extract 기본배지에 glycerol을 첨가한 경우나 첨가하지 않은 경우 별 차이가 없었다($10^8 \sim 10^9$ CFU/ml). Chitinase 활성은 glycerol 0%에서는 전혀 검출되지 않았으며, 0.25% 첨가만으로도 효소활성이 최대로 활성화 되었으며, 그 이상의 glycerol농도(0.5%, 0.75%, 1.0%)에서는 오히려 약간 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 이상의 결과로부터 최적 glycerol 농도는 0.25%(w/v)로 정하여 이후의 실험은 glycerol 0.25%에서 시행하였다.

3) 최적 yeast extract 농도를 구하기 위하여 0.1% colloidal chitin +0.25% glycerol를 함유한 최소배지에 yeast extract 0, 0.05, 0.1, 0.2%(w/v) 첨가하여 그 영향을 살펴보았다(Fig. 3). 0.1% colloidal chitin과 0.25% glycerol만이 탄소원으로 공급된 배지(yeast extract 0%: $0.5 \sim 2 \times 10^6$ CFU/ml)에서는 yeast extract가 보충된 구(yeast extract 0.05~

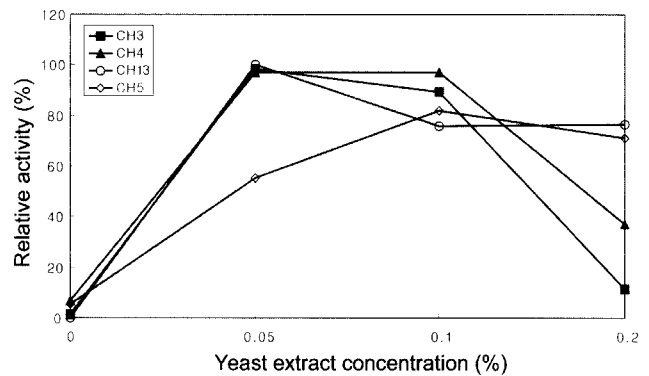


Fig. 3. Effect of yeast extract on chitinase production. Actual enzyme activity is 1.32 mg/ml when relative activity is 100%. ■: *Micrococcus* sp. CH3, ▲: *Arthrobacter nicotianae* CH4, ○: *Arthrobacter nicotianae* CH13, ◇: *Arthrobacter* sp. CH5.

0.2%: $1.0 \sim 9.1 \times 10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml)보다 균체 생육이 확연히 저하되었다($10^3 \sim 4$ 배). 이로부터 yeast extract는 glycerol과 달리 효소활성화의 기능뿐 아니라 본 분리균주들의 growth factor로도 작용함을 알 수 있었다. 0.1% colloidal chitin +0.25% glycerol 최소배지에 아주 작은 양(0.05%)의 yeast extract만을 첨가하여도 균체생육의 증가($10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml)와 함께 높은 chitinase 활성을 회복하였다(Fig. 3). Yeast extract 최적농도는 분리균주 4종 중 3종은 0.05%, 1종(*Arthrobacter* sp. CH5)은 0.1%로 나타났으며, 그 이상의 yeast extract 농도에서는 효소활성이 오히려 감소하는 것으로 나타났다.

결론적으로 0.1% colloidal chitin, 0.25% glycerol, 0.05 (~0.1%) yeast extract를 함유한 최소배지에 chitinase 생산균주로부터 최대효소 생산을 얻을 수 있었다. 위 배지조성으로 기존의 보고(3% tryptone[14], 0.5% glucose + 0.2% peptone[13], 0.1% yeast extract[2], 0.3% NaNO_3 or 0.5% polypeptone[12], 0.2% glucose+0.5% peptone+0.5% yeast extract[11])와 달리 높은 농도의 질소원 또는 glucose와 같은 당원의 첨가 없이 colloidal chitin외에 최소량의 영양물의 보충(0.05% yeast extract & 0.25% glycerol)만으로 rich media에서와 같은 정도의 높은 균체생육($10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml)을 24시간 이내의 짧은 시간 내에 얻을 수 있을 뿐 아니라, 이때 높은 효소활성을 얻을 수 있었다. 또한 배지 내에 다른 환원당을 공급하지 않아 검출되는 환원당은 모두 배지 내 chitin에서 유래되므로 배양이 끝난 배양액을 효소 역가 측정이나 HPLC 등의 분석을 통한 chitinase 효소반응산물 분석 시 복잡한 전처리과정 없이 시료로 사용하여 빠르고 손쉬운 분석시료준비와 결과를 얻을 수 있다는 장점을 지닌다. 본 연구결과는 chitinase 균주분리단계에서 효소활성 검증 및 효소기질 반응산물의 분석을 위한 효소의 '쉬운 분리정제법(easy preparation method)'으로도 활용될 수 있리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003년 조선대학교 교내학술연구조성비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Abdel-Naby, M. A. and D. Y. Kwon. 1992. Enzymatic hydrolysis of pretreated chitin by *Aspergillus carneus* chitinase. *J. Microbiol. Biochem.* **2**: 197-203.
2. B. Hang, H. Yoon, D. Shin and H. Cho. 1996. Purification and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* KFB-C14. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **24**: 567-573.
3. B. Hong, H. Yoon, D. Shin and H. Cho. 1996. Isolation of microorganism producing thermostable chitinase and some cultural characteristics for chitinase production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **24**: 560-566.
4. Berger, L. R. and D. M. Reynolds. 1958. Chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta.* **29**: 522-534.
5. Chang, J. Y., I. C. Kim and H. C. Chang. 2003. Microbial production of N-acetylglucosamine by *Arthrobacter nicotianae*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **35**: 1188-1192.
6. Friedman, S. J. and P. Skehan. 1980. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. *Proc. Nat Acad Sci. USA.* **77**: 1172-1176.
7. Hong, B. S., H. G. Yoon, D. H. Shin and H. Y. Cho. 1996. Isolation of microorganism producing thermostable chitinase and some cultural characteristics for chitinase production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 560-566.
8. Hsu, S. C. and L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of Actinomycetes in water soil. *Appl. Microbiol.* **29**: 422-429.
9. <http://www.iherb.com/ngg.html>
10. Jeong, E. and Y. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing of chitinase and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 187-196.
11. K. Kim, C. Lee and K. Lee. 1997. Isolation of *Aeromonas hydrophila* and chitinolytic properties. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **25**: 151-158.
12. Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* **38**: 85-97.
13. Lee, J., D. Kim, J. D. and S. Kim. 1998. Purification and characterization of chitinase from antagonistic bacteria *Pseudomonas* sp. 3098. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **26**: 515-522.
14. Lee, K., C. Kim, J. Yu and D. Oh. 1990. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **26**: 515-522.
15. Lee, K.P., C.N. Kim, J.H. Yu and D.H. Oh. 1990. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 599-606.
16. Lee, S.M. 1993. Identification and cultural characterization of *Streptomyces lydicus* G-23 for producing chitinase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 187-196.
17. Nelson, N.A. 1944. A photometric adsorption of somogyi method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 376-380.
18. Patil, R.S., V. Ghormade and M.V. Deshpande. 2000. Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microbiol Technol.* **26**: 473-483.
19. Reynolds, D.M. 1954. Extracellular chitinase from a *Streptomyces* sp. *J. Gen. Microbiol.* **11**: 150-159.
20. Rupley, J.A. 1964. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low molecular weight substrates for lysozyme. *Biochem. Biophys. Acta.* **83**: 245-255.
21. Sauki, K., T. Uchiyama, Y. Matahira and F. Nomjo. 1991. Immobilization of chitinolytic enzymes and continuous production of N-acetylglucosamine with the immobilized enzyme. *J. Ferment. Technol.* **72**: 168-172.
22. Somogyi, A.M. 1952. A new reagent for determination of sugar. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-24.

(Received Nov. 18, 2004/Accepted Dec. 13, 2004)