

## *Aeromonas salmonicida* YA7-625 에 의한 Chitinase 의 생산 및 정제

이강표\* · 김창남 · 유주현 · 오두환

연세대학교 식품공학과

## The Production and Purification of Chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625

Lee, Kang-Pyo\*, Chang-Nam Kim, Ju-Hyun Yu and Doo-Hwan Oh

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

A chitinase-producing bacterium, *Aeromonas salmonicida* YA7-625, was isolated from domestic seashore muds. The preferable medium composition for the production of chitinase was as follows: colloidal chitin 1.26% (w/v), tryptone 2.95% (w/v),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.15% (w/v) and  $K_2HPO_4$  0.15% (w/v) (pH 8.5). The highest enzyme production was observed after cultivation of 48 hours at 27°C. The chitinase of *Aeromonas salmonicida* YA7-625 was purified successively by ammonium sulfate precipitation, affinity adsorption, hydroxylapatite column chromatography and gel filtration. The optimal temperature and pH for the activity of purified chitinase were 50°C and 7.0, respectively. The molecular weight of purified chitinase was ca. 200,000 daltons and apparent  $K_m$  value of it was 1.276 mg/ml on colloidal chitin.

Chitin은 지구상에 섬유소 다음으로 풍부하게 존재하는 biomass로서 매년  $1 \times 10^9$ 톤 정도가 해양 무척추동물, 곤충, 곰팡이 등에서 생합성되고 있으며(1), 절족류, 강장동물, 연체동물 및 선충류 등 하등동물 껍질에 20-50%, 균류와 조류 등의 하등식물 세포벽에 45%까지 함유되어 있는 것으로 알려지고 있다(2, 3). 따라서 부존량이 많은 chitin을 새로운 물질이나 유용물질의 생산에 이용하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 절족류인 게와 새우껍질 등 일부 chitin이 산업적으로 이용되고 있다.

최근에는 chitin 물질의 이용성을 높이기 위해 chitin 및 chitosan의 분해에 관여하는 chitinolytic enzyme의 생산에 대한 관심이 높아지고 있다(4). Chitin 물질은 N-acetyl-D-glucosamine이  $\beta$ -1,4 결합을 하고 있는 polymer이며, 이들 chitin 및 chitosan의 분해에 관여

하는 효소에는 chitin과 chitodextrin의 N-acetyl- $\beta$ -1,4-glucosamine linkage를 무작위로 가수분해하는 endo형 chitinase(EC 3.2.1.14), chitobiose를 가수분해하는 chitobiase(EC 3.2.1.30), chitin을 chitosan으로 변형시키는 chitin deacetylase(EC 3.5.1.41), chitosanase(EC 3.2.1.99) 및  $\beta$ -glucosaminidase 등이 보고되고 있으며(1, 4), chitin을 구성성분인 N-acetyl-D-glucosamine으로 분해하는 과정에는 chitinase와 chitobiase가 함께 작용하는 것으로 알려지고 있다(5).

지금까지 chitinolytic enzyme을 생산하는 미생물에는 *Serratia*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Vibrio*, *Arthrobacter*, *Benedea*, *Aeromonas*, *Streptomyces* 등의 세균들(6-10)과 *Trichoderma*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Mucor*, *Beauveria*, *Lycoperdon*, *Aspergillus*, *Myrothecium*, *Conidiobolus*, *Agaricus* 등의 곰팡이들(11-15)이 알려지고 있으며, 식물체(16, 17)와 원생동물, 선충류, 절족류 등의 무척추동물 그리고 물고기, 양서류, 파충류, 조

류 등의 소화액 및 포유류의 혈청에서도 chitinolytic enzyme 들이 존재하는 것으로 보고되고 있다(18,19).

이러한 chitinolytic enzyme 은 장내세균 중 *Bifidobacteria* 의 생육을 촉진하는 chito-oligosaccharide 의 제조(1,4)와 항생물질 전구체인 glucosamine 의 생산 등 식품, 의약품, 농축산 분야 등에서 이용하고 있다. 그러나 chitin 물질의 활용 및 chitinase 의 산업적 이용을 위해서는 먼저 chitinolytic enzyme 의 생산능이 높은 균주의 탐색과 탐색된 균주에 대한 유전자 조작이나 물리화학적 처리를 통한 생산성 향상 등 효율적인 전처리 과정의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 chitin 분해효소의 생산능이 높은 세균을 분리하여 효소를 생산하고자 자연계로부터 chitinase 의 활성이 높은 세균을 분리, 선정, 동정하고 선정된 균주의 최적 효소생산 조건을 검토하였으며, 효소의 분리, 정제 및 물리화학적 특성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### Colloidal chitin 의 제조

Crude chitin 100g 에 진한 염산 2,000 ml 를 가하여 4°C에서 12 시간 동안 교반하고 glass wool 로 여과한 여액을 4°C 증류수에 가해 교반하여 흰색의 colloidal chitin 을 얻었다. 이를 8,500×g에서 15 분간 원심분리(Hitachi 20PR-52D)하고 이 때의 침전물에 증류수를 가해 분산시킨 후 5N NaOH 로 중화하였다. 위의 중화 과정에서 생성된 NaCl 을 제거하기 위해서 3-4 회 증류수로 반복 세척하고 원심분리에 의해 침전물을 회수하여 colloidal chitin 으로 하였다.

### Chitinase 활성 측정

Colloidal chitin 용액(5mg/ml, dry base) 1 ml 와 0.2M 인산염 완충액(pH7.0) 1 ml 에 효소액 1 ml 를 가해 40°C에서 1 시간 동안 반응시키고 100°C에서 10 분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 그 후 반응액을 원심분리하고 상등액의 환원당을 DNS 방법으로 정량하여 효소의 활성을 비교 측정하였다.

Chitinase 의 1 unit 는 1 시간 동안 1 μmole 의 N-acetyl-D-glucosamine 을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### Chitinase 의 정제

배양액을 10,000×g에서 20 분간 원심분리하여 균체를 제거하고 4°C에서 ammonium sulfate 를 60% 포화농도

가 되게 가해 overnight 한 뒤 원심분리하여 조효소액을 분리하였다. 이 조효소액에 일정량의 colloidal chitin 을 가한 다음 0°C에서 1 시간 동안 반응시켜 chitinase 를 colloidal chitin 에 흡착시킨 후, 5,000×g에서 15 분간 원심분리하였다. Colloidal chitin 에 흡착된 chitinase 는 인산염 완충액(pH7.0)으로 세척하고 40°C에서 3 시간 반응시켜 chitinase 를 탈착시켰으며 4°C에서 12 시간 동안 투석하였다. 투석한 효소액은 0.02M 인산염 완충액(pH6.5)으로 평형시킨 hydroxylapatite column(Bio Rad, φ1.6×10.0 cm)에 흡착시킨 후 0.4M 인산염 완충액(pH6.5)으로 gradient elution 하여 탈착하였으며, Sephadex G-200 column(φ1.8×80.0 cm)을 사용하여 정제하였다.

### 분자량의 측정

Chitinase 의 분자량은 HPLC 용 MicroPak TSK gel type 3,000SW column 을 사용하여 0.1M KCl 을 포함한 0.067M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용액(pH6.8)으로 용출시켜 측정하였으며, 표준 marker 로는 carbonic anhydrase(Mw 29,000), bovine serum albumin(Mw 66,000), alcohol dehydrogenase(Mw 150,000), apoferritin(Mw 443,000), blue dextran(Mw 1,000,000)을 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Chitinase 생산균의 분리 및 동정

토양으로부터 chitin 을 분해하는 세균을 분리하기 위하여 분리용 고체배지(colloidal chitin 0.6%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.03%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.07%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001%, ZnSO<sub>4</sub> 0.0001%, MnCl<sub>2</sub> 0.0001%, agar 1.5%, pH7.0)에서 clear zone 을 나타내는 200 여 균주를 1 차로 분리하였으며 이를 다시 분리용 액체배지를 사용하여 30°C에서 3 일간 배양하여 가장 높은 chitinase 활성을 나타내는 YA7-625 를 본 실험의 균주로 선정하였다.

선정한 YA7-625 의 형태학적 특성은 Fig.1 에서와 같이 0.2-0.3×0.7-1.1 μm 크기의 간균이었으며, 운동성이 있고 통성 호기성이며, 최적 생육온도 24-27°C의 Gram 음성 세균이었다(Table 1). 이상의 결과를 통해 시판중인 API kit 중 Gram 음성의 rod type 을 동정할 수 있는 API 20NE kit 를 사용하여 YA7-625 의 생화학적, 배양학적 특성을 조사하였으며(Table 1), API 20NE Analytical Profile Index 에 의해서 분석한 결과 분리균주 YA7-625 는 *Aeromonas salmonicida* 일 확률이 98.5

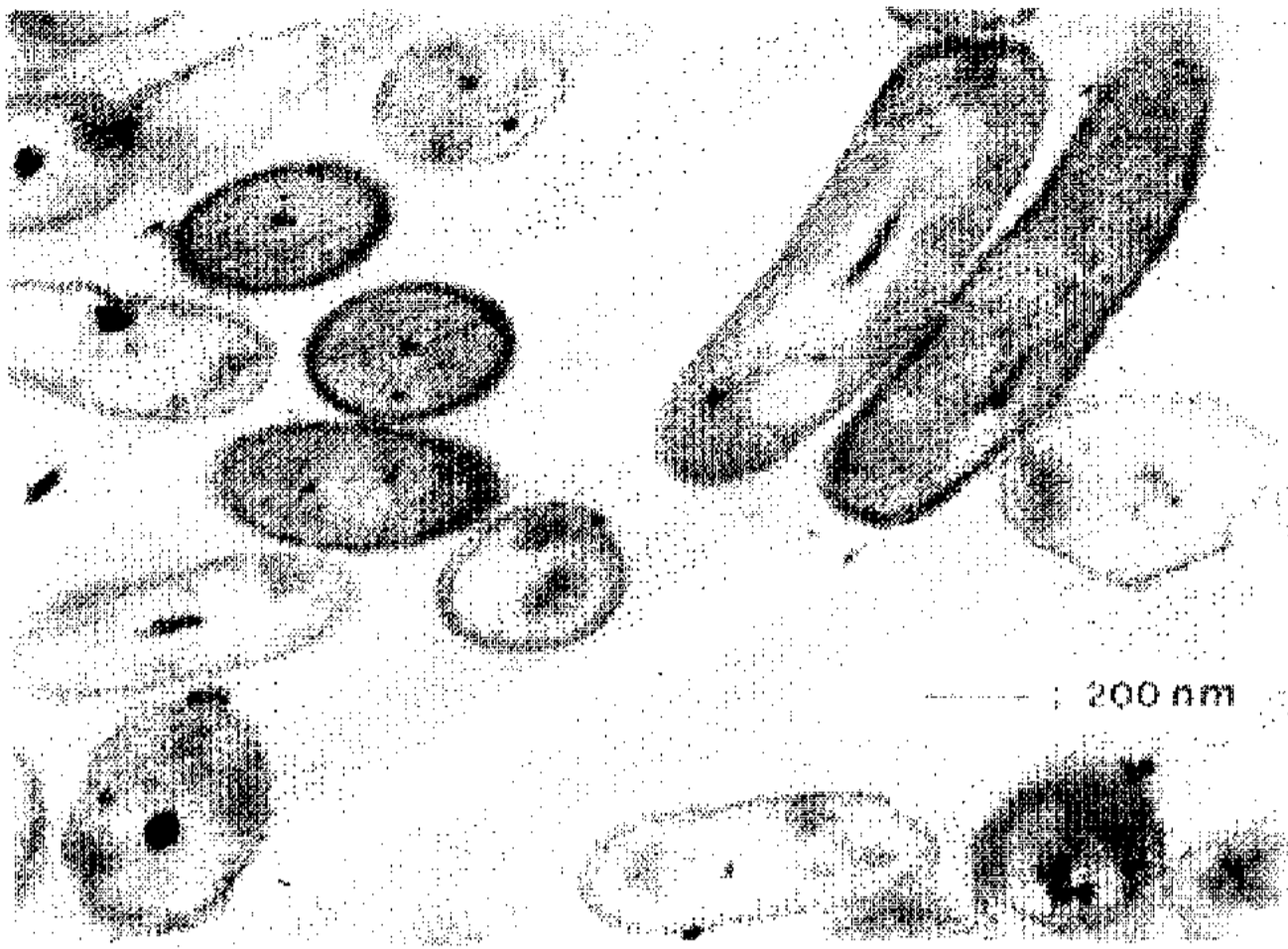


Fig. 1. Transmission electron micrograph of the strain YA7-625 ( $\times 20,000$ ).

%이었다. 그러므로 본 실험에 사용한 분리균주를 *Aeromonas salmonicida* YA7-625로 명명하였다.

**최적 배양조건**

효소생산을 위한 최적 pH를 검토하기 위해 초기 pH를 5.0-12.0까지 조절한 기본배지 (colloidal chitin 0.6%, nutrient broth 1.0%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05%,  $KH_2PO_4$  0.03%,  $K_2HPO_4$  0.07%,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001%,  $ZnSO_4$  0.0001%,  $MnCl_2$  0.0001%)에 종배양액 2%(v/v)를 접종하고 30°C에서 48시간 진탕배양한 결과 pH 8.5-9.0의 약 alkali 부근에서 최대 활성을 보였으며, 기본배지의 초기 pH를 8.5로 조절한 다음 20-37°C 범위에서 배양한 결과 27°C에서 최대의 활성을 나타내어 최적 온도는 27°C임을 알 수 있었다.

Colloidal chitin의 농도에 따른 영향을 알아보기 위해서 기본배지에 0-3%(w/v)의 colloidal chitin을 첨가하여 27°C에서 48시간 배양한 결과 1.2%를 첨가하였을 때 최대 활성을 나타내었으며, 1.5% 이상에서는 저해를 나타내었고 colloidal chitin을 첨가하지 않았을 경우에는 효소의 생산이 없었으므로 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase는 inducible enzyme임을 알 수 있었다. 이는 Reynolds(20), Berger와 Reynolds(21)의 *Streptomyces griseus*, Skujins 등(22)의 *Streptomyces* sp. 2B 및 Yabuki 등(23)의 *Aeromonas hydrophila*가 생산하는 chitinase가 유도효소라는 보고와 일치하였다.

Colloidal chitin을 1.2% 가한 기본배지에 xylose, glucose, galactose, fructose, glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, sucrose, cellobiose, maltose, lactose 등

Table 1. Cultural and biochemical characteristics of strain YA7-625

Morphological characteristics	
Size ( $\mu m$ )	0.2-0.3 $\times$ 0.7-1.1
Shape	Rod
Motility	+
Gram stain	-
Colony shape	Circular, raised, translucent
Colony color	White
Cultural characteristics	
Oxygen requirement	Facultative aerobic
Optimum temperature	24-27°C
Nutrient broth	+
Glucose nutrient broth	++
Biochemical characteristics	
Hydrolysis of gelatin	-
Hydrolysis of esculin	-
Nitrate reduced to nitrite	+
Indole test	-
Urease test	-
Oxidase test	+
Catalase test	+
Arginine dihydrolase test	-
Gas from glucose	+
p-Nitrophenylglucose	-
Assimilation of sugars	
Glucose	+
Arabinose	-
Mannose	+
Mannitol	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+
Maltose	-
Gluconate	-
Caprate	-
Adipate	-
Malate	-
Citrate	-
Phenylacetate	-

의 탄소원을 각각 1%(w/v)되게 가해 배양한 결과 당을 첨가한 경우 모두 효소생산에 저해를 보였으며 chitinolytic enzyme의 최종 분해산물인 N-acetyl-D-glucosamine과 이의 analogue인 glucosamine을 첨가한 경우에는 52.7% 및 54.0%의 저해를 보여 Monreal과 Reese(6), Yabuki 등(23)의 보고에서와 같이 최종분해산물에 의해 feed back repression을 받는 것으로 생각되었다.

유기질소원의 종류에 따른 효소생산의 효과를 검토하

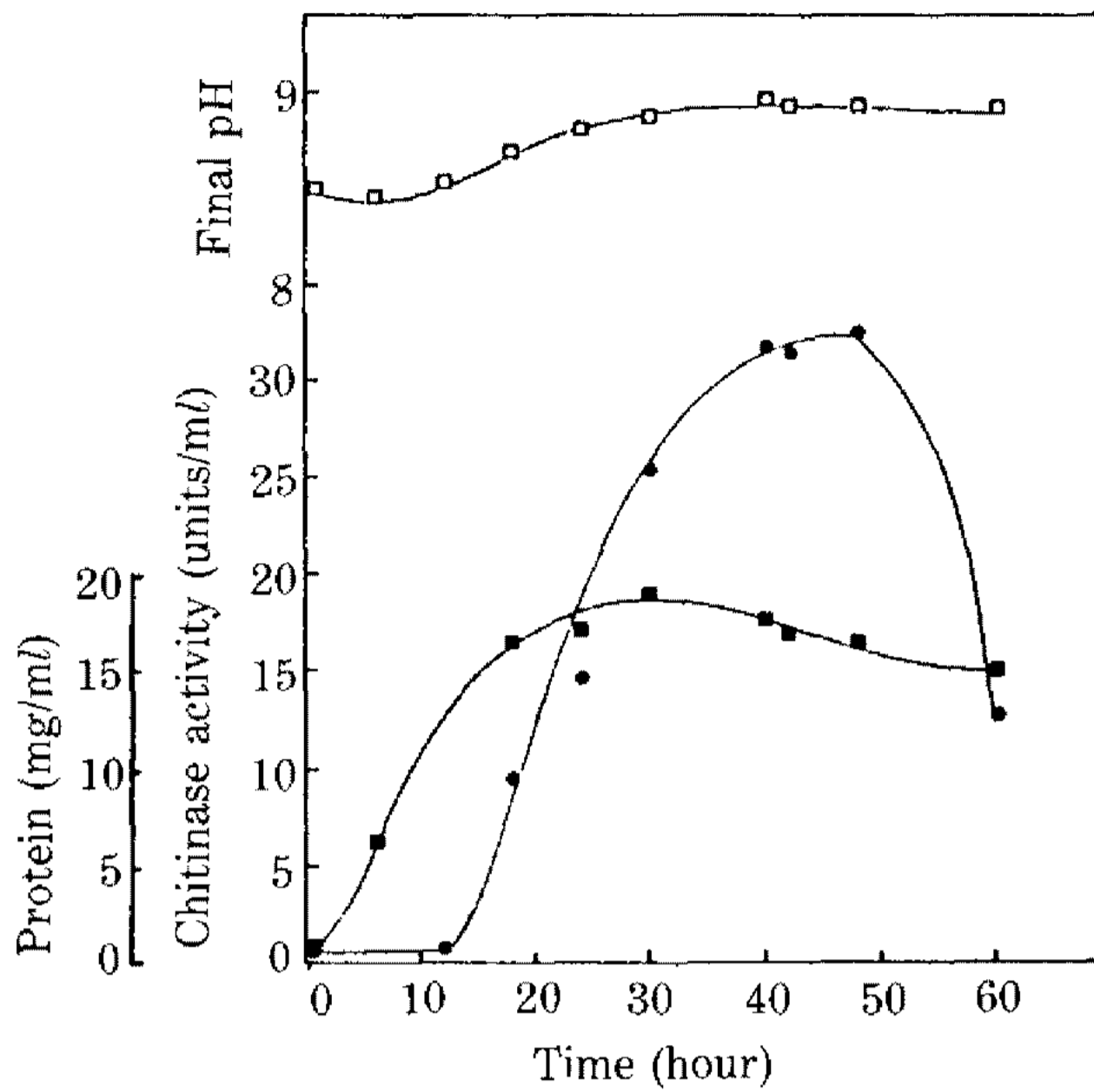


Fig. 2. Time course for the production of chitinase. ●—●: Chitinase activity, ■—■: Protein, □—□: pH

기 위해서 polypeptone, nutrient broth, tryptone 및 beef extract 등의 농도를 0-5% (w/v) 까지 첨가시켜 효소의 생산을 살펴본 결과 3% tryptone에서 최대의 활성을 나타내었다.

Colloidal chitin 1.2% (w/v), nutrient broth 대신 tryptone 3% (w/v)를 첨가한 기본배지에  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 를 각각 0-0.2% (w/v)까지 첨가하여 chitinase의 활성을 검토한 결과 0.15%의  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 에서 최대 활성을 나타내었으며,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0-0.2%까지 가해 배양한 결과  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0.15%를 첨가하였을 때 가장 높은 활성을 보여주었다. 이밖의  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  등의 mineral들은 chitinase 생산에 영향을 주지 않았다. 이는 *Serratia marcescens*의 경우  $\text{MgSO}_4$ 와  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 를 영양인자로 요구한다는 Monreal과 Reese (6)의 보고와 유사하였으나  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와  $\text{NaCl}$ 을 요구하는 것으로 보고된 *Acromonas hydrophila* (23),  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  및  $\text{CaCl}_2$ 를 요구한다는 *Streptomyces* (20, 22)와 *Aspergillus* (24)의 결과와는 차이가 있었으며 이는 각 균에 따른 특성으로 생각되었다.

이상에서 얻은 최적 배양조건을 이용하여 배양시간에 따른 chitinase의 활성변화를 검토한 결과 균체생육은 28시간이 경과하였을 때 최대이었고 chitinase의 활성은 48시간 배양하였을 때 최대 활성을 나타내었다 (Fig. 2).

Table 2. Stationary point and the estimated response at stationary point

Variables	Stationary point	Calculated value (%)
Colloidal chitin	0.186	1.26
Tryptone	-0.097	2.95

\*The estimated responses at stationary point = 28.01 units/ml

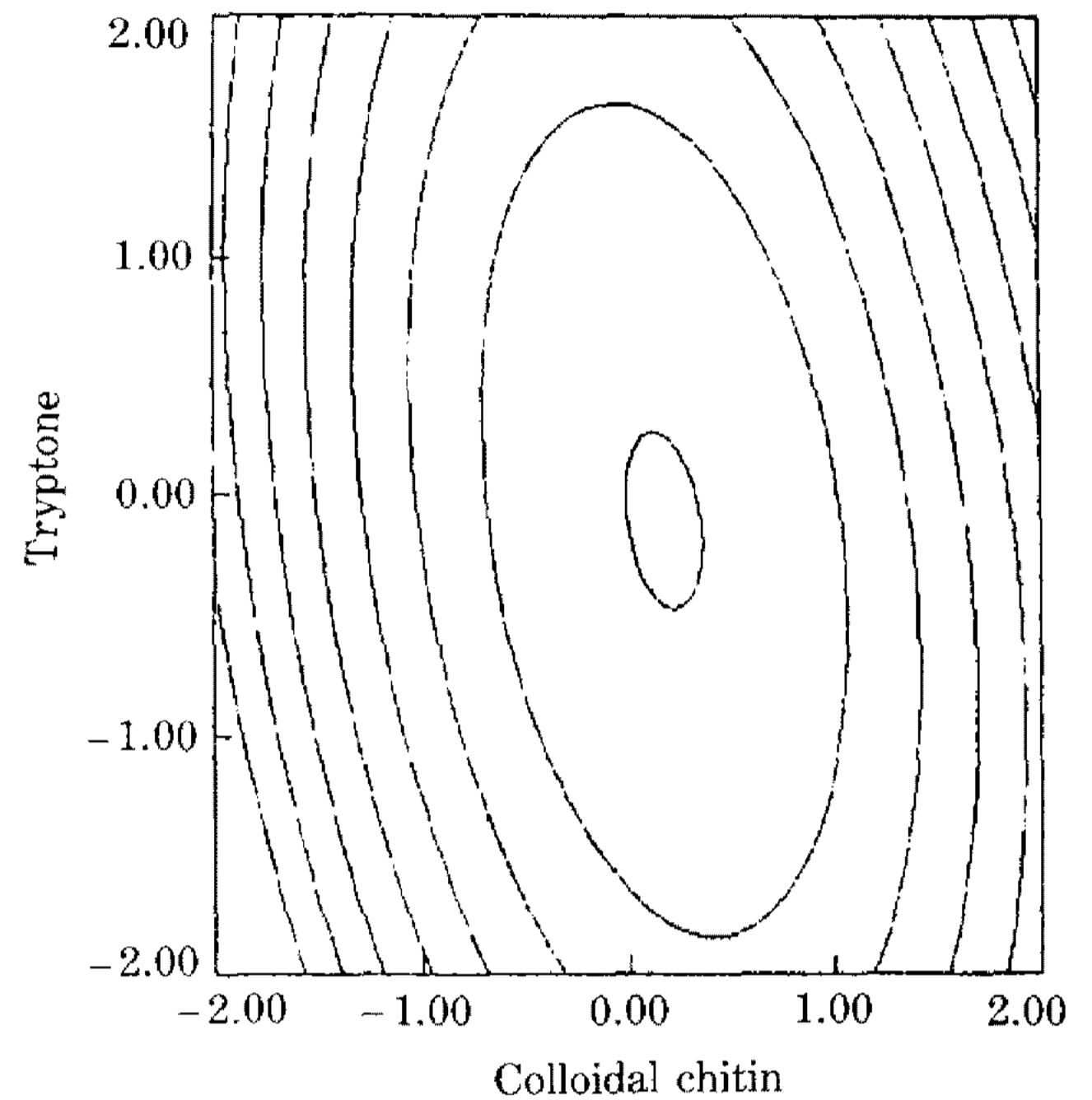


Fig. 3. Response surface plotting of the effect of colloidal chitin and tryptone on the production of chitinase.

#### 반응표면 실험계획법에 의한 colloidal chitin과 tryptone의 최적 첨가농도 결정

*Acromonas salmonicida* YA7-625의 chitinase 생산에 크게 영향을 주는 인자는 colloidal chitin과 tryptone이었으며, 이들은 복합적이고 복잡한 양상을 나타내었다.

따라서 본 연구에서는 반응표면분석(response surface analysis)을 통하여 chitinase 생산을 위한 colloidal chitin과 tryptone의 첨가농도를 최적화하였다. 반응표면분석법에 의한 chitinase 생산 실험계획은 중심합성계획(central composite design)에 의하여 실험구간을 선정하였으며, colloidal chitin과 tryptone의 농도를 선형화(linearization)하여 새로운 독립변수로 만들어 실험한 다음 computer를 사용하여 회귀분석하고 최대값을 갖

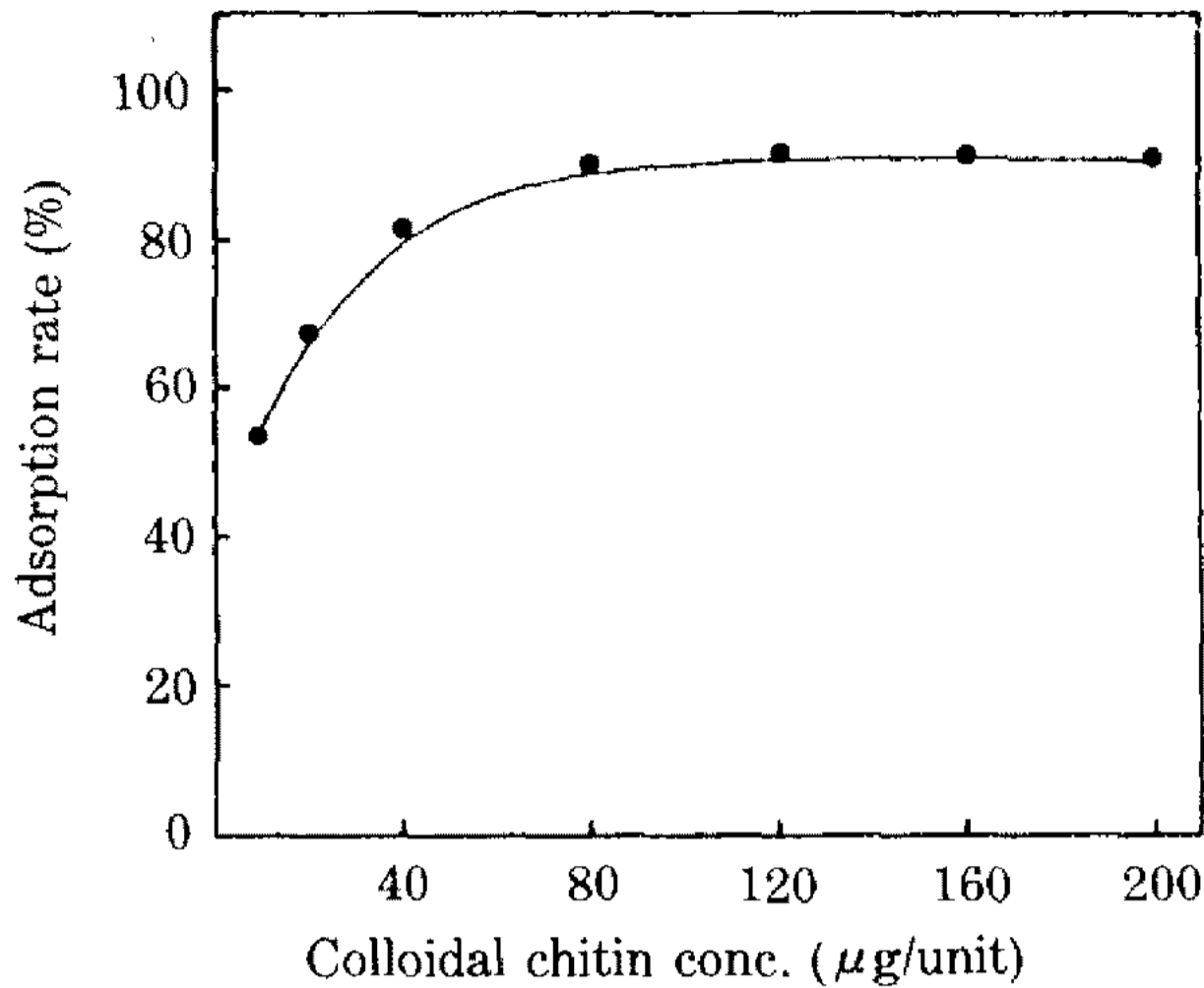


Fig. 4. Effects of colloidal chitin concentration on the adsorption rate of chitinase.

는 변수들의 값을 계산한 결과 colloidal chitin 1.26%, tryptone 2.95%가 최적농도이었으며, 이 때 chitinase의 생산량은 배양액 ml 당 28.01 units 이었다 (Table 2, Fig. 3).

이상에서와 같이 chitinase의 생산을 위한 *Aeromonas salmonicida* YA7-625의 최적 배양조건은 colloidal chitin 1.26%, tryptone 2.95%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.15%,  $K_2HPO_4$  0.15%, pH 8.5, 27°C에서 48시간 배양할 때이었으며, 이러한 최적 배양조건에서 배양할 경우 chitinase 생산은 broth ml 당 28.01 units로서 기본배지를 사용하였을 때의 broth ml 당 11.13 units에 비해 2.52배의 생산증대를 얻을 수 있었다.

#### Chitinase의 정제

Chitinase를 분리, 정제하기 위해 최적 배양조건에서 *Aeromonas salmonicida* YA7-625를 배양하고 원심분리하여 얻은 상등액에 ammonium sulfate를 60% 포화농도가 되게 가해 염석하고 원심분리하여 chitinase 조효소액을 얻었다. 그 후 이 조효소액에 chitinase unit 당 20-200 µg (dry base)되게 colloidal chitin을 첨가하여 0°C에서 1시간 동안 교반하면서 affinity adsorption을 행한 결과 효소 unit 당 colloidal chitin을 80-200 µg 가했을 경우 89%의 chitinase를 흡착시킬 수 있었다 (Fig. 4). 이는 chitinase unit 당 33 µg의 colloidal chitin을 사용한 결과 84%의 chitinase를 흡착시킬 수 있었다는 Yabuki와 Mizushima(25)의 보고 및 효소 unit 당 1.3mg의 colloidal chitin을 사용하여 chitinase의 90%를 흡착시켰다는 Roberts와 Cabib(26)의 보고에서와 같이 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산

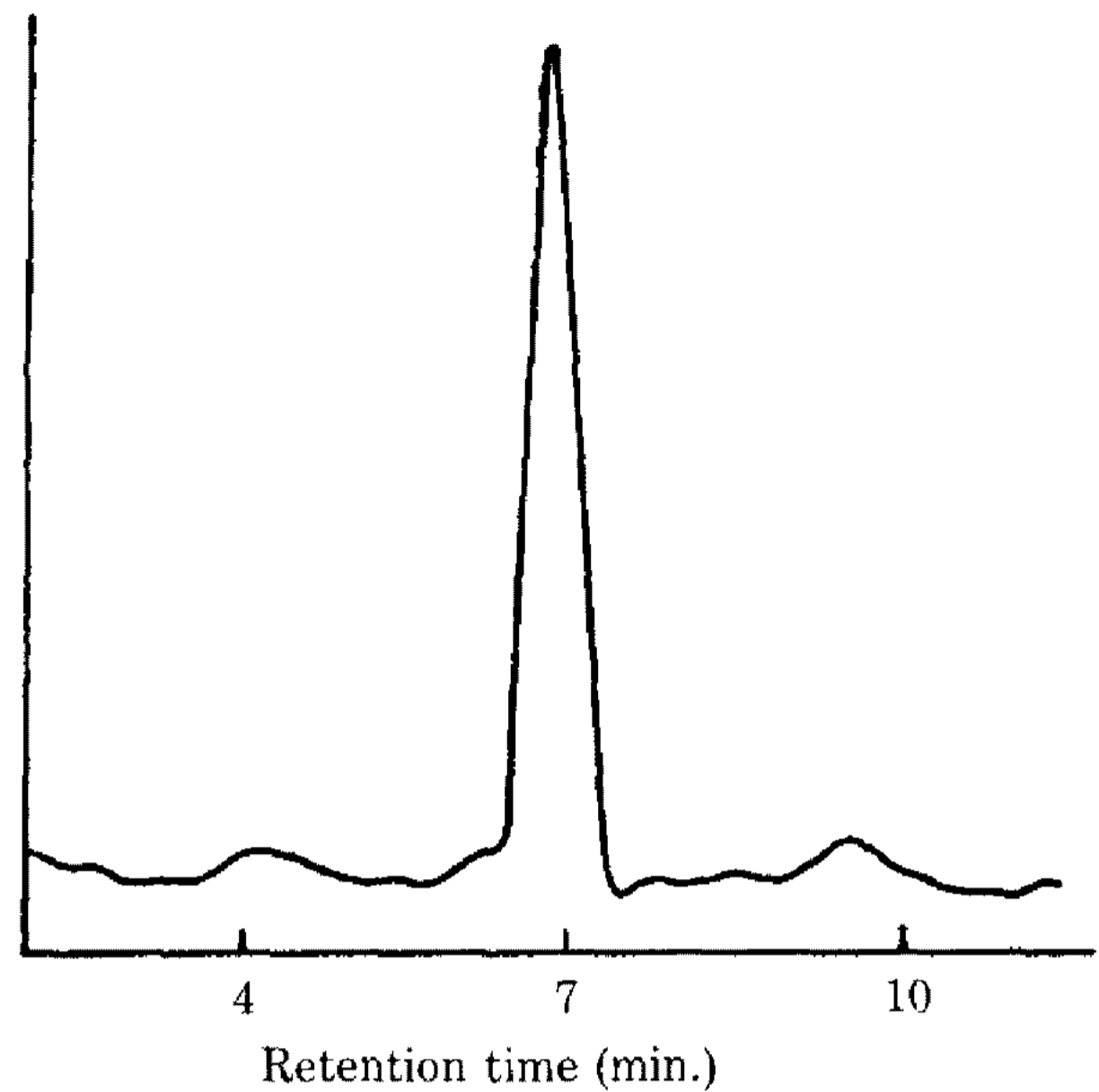


Fig. 5. HPLC chromatogram of the purified chitinase.

하는 chitinase도 colloidal chitin을 이용한 affinity adsorption이 가능하였다.

Affinity adsorption을 통해 분리한 chitinase는 다시 0.02M 인산염 완충액 (pH 6.5)으로 평형시킨 hydroxylapatite column을 통과시켜 효소단백질을 흡착시킨 후 0.4M 인산염 완충액 (pH 6.5)으로 elution하여 chitinase 용출물 (0.05-0.1M 농도)을 얻었다. 그 후 용출된 chitinase를 4°C에서 reverse osmosis (Spectra/Con sample concentrator, Sepetra Medical Inc.)를 이용하여 농축하고 미리 0.01M 인산염 완충액 (pH 7.0)으로 평형시킨 Sephadex G-200 column에 주입하여 동일 완충액으로 elution (7 ml/hr.)하여 tube 당 3 ml씩 분획하였다. 그 결과 fraction No.16-23에서 순수한 chitinase를 분리할 수 있었으며, 이 분획을 HPLC (Micro Pak TSK gel type 3,000SW column, mobile phase : 0.067M  $KH_2PO_4$  + 0.1M KCl (pH 6.8))로 검토했던 결과 단일 peak를 나타내었으며 (Fig. 5), SDS-PAGE에서도 single band를 나타내어 순수하게 정제되었음을 알 수 있었다. 이와 같이 하여 정제한 chitinase의 수율은 29.7%, 비활성 66.7 units/mg, 정제도는 18.5배이었다 (Table 3).

이러한 결과는 수율 34.8%, 정제도 23.1배로 *Aeromonas hydrophila*의 chitinase를 정제하였다고 보고한 Yabuki와 Mizushima(25)의 보고와 *Vibrio*가 생산하는 chitinase를 수율 32.6%, 정제도 19.3배로 정제하였다고 보고한 Otakara와 Mitsutomi(27)의 보고와 비슷한 결과이었다.

Table 3. Summary of purification procedures of chitinase

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Sp. activity (units/mg)	Yield (%)	Purification folds
Culture broth	1,770.0	6,296.0	3.6	100.0	-
Ammonium sulfate fractionation	498.6	5,286.4	10.6	84.0	3.0
Affinity adsorption	149.3	3,538.4	23.8	56.4	6.6
Hydroxylapatite chromatography	48.2	2,664.5	55.3	42.3	15.4
Sephadex G-200 gel filtration	28.1	1,870.0	66.7	29.7	18.5

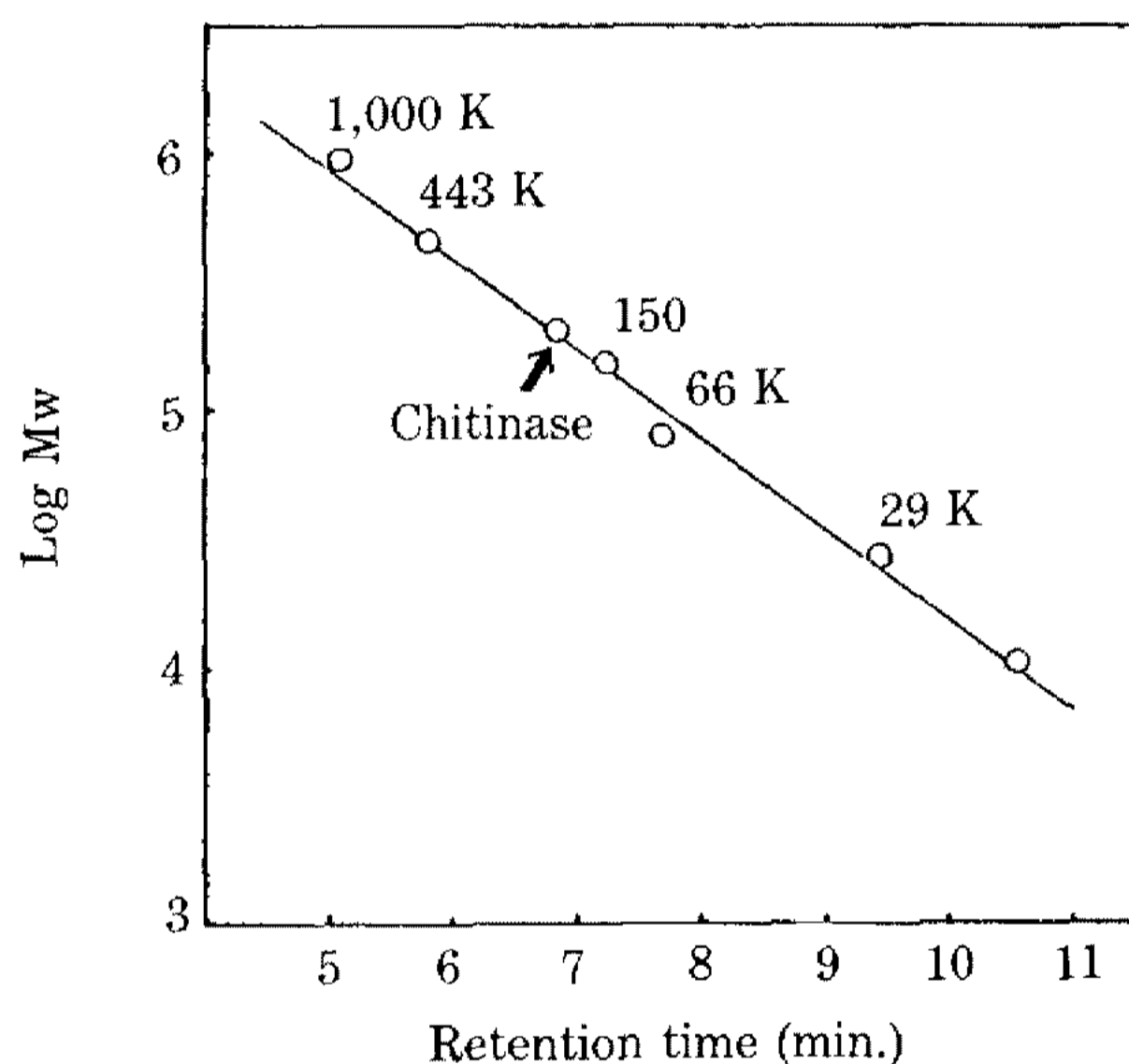


Fig. 6. Molecular weight determination of the chitinase by HPLC.

#### Chitinase의 분자량

정제된 chitinase를 표준단백질과 함께 HPLC를 이용하여 분자량을 측정하는 결과 본 실험에 사용한 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase의 분자량은 약 200,000 daltons 정도이었다(Fig. 6). 이러한 결과는 지금까지 알려지고 있는 *Streptomyces* (22)가 생산하는 chitinase의 분자량(30,000 daltons)과 *Serratia* (6), *Vibrio* (27), *Aeromonas* (21) 등의 분자량(60,000-120,000 daltons)에 비해서 그의 분자량이 상대적으로 크다는 것을 알 수 있었다.

#### Chitinase 활성 및 안정성에 미치는 pH의 영향

Chitinase의 반응에 대한 pH의 영향을 40°C에서 60분간 각 pH로 반응시킨 다음 검토한 결과 pH 7.0에서 최대활성을 나타내었으며, pH 안정성 검토를 위해 상온

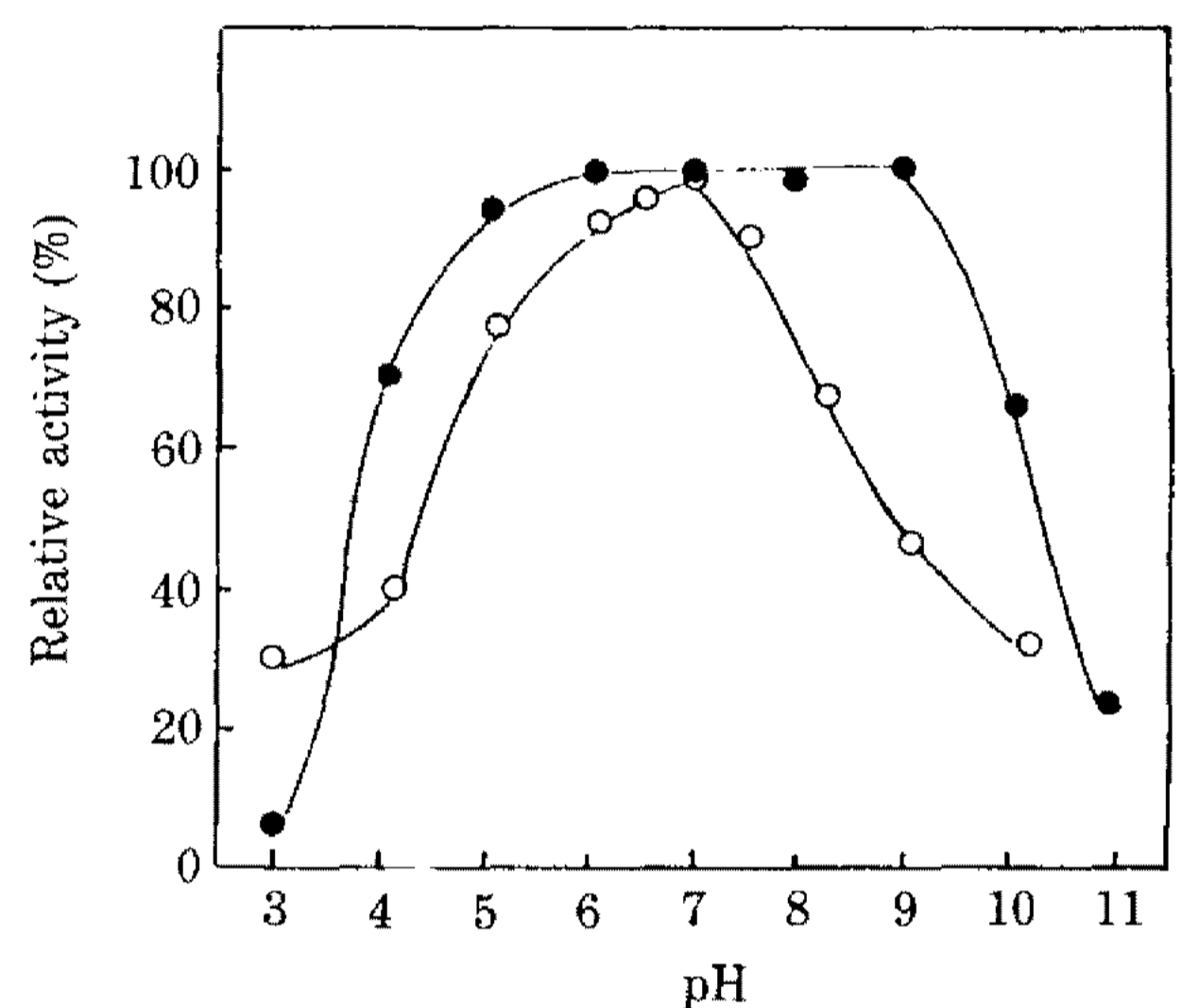


Fig. 7. Effects of pH on the activity and stability of chitinase.

○—○: Activity, ●—●: Stability

에서 60분간 방치하고 잔존활성을 검토한 결과 pH 5.0-9.0 사이에서 안정하였다(Fig. 6). 이러한 결과는 Lundblad 등(28)이 bovine serum에 존재하는 chitinase의 안정성이 pH 3.0-6.5라는 보고와는 차이가 있었으나 Tsukamoto와 Koga(17)가 보고한 Yam의 경우 pH 5.0-11.0, Skujins 등(22)이 보고한 *Streptomyces*의 pH 4.5-9.0과 Yabuki와 Mizushina(25)가 보고한 *Aeromonas hydrophila*의 chitinase가 pH 6.0-9.0 사이에서 안정하였다는 결과와 유사하였다.

#### Chitinase 활성 및 열안정성에 미치는 온도의 영향

Chitinase의 최적 작용온도를 알아보기 위해 10-70°C 사이의 각 온도에서 효소활성을 측정하여 본 결과 Fig. 8에서와 같이 50°C 부근에서 가장 높은 활성을 보여주었으며, 60°C에서 85%의 활성을 보였고 그 이상의 온도

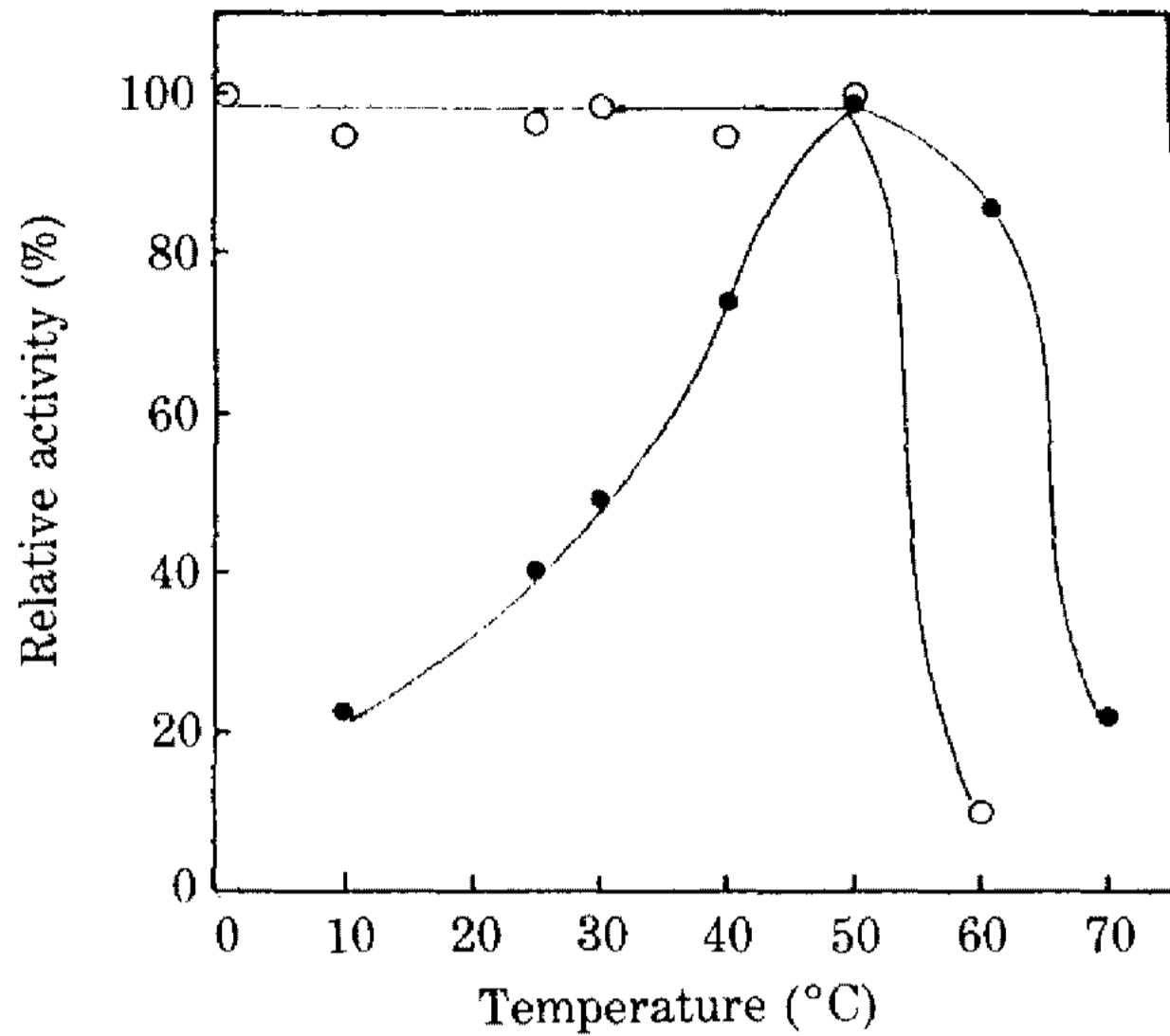


Fig. 8. Effects of temperature on the activity and stability of chitinase.

●●: Activity, ○○: Stability

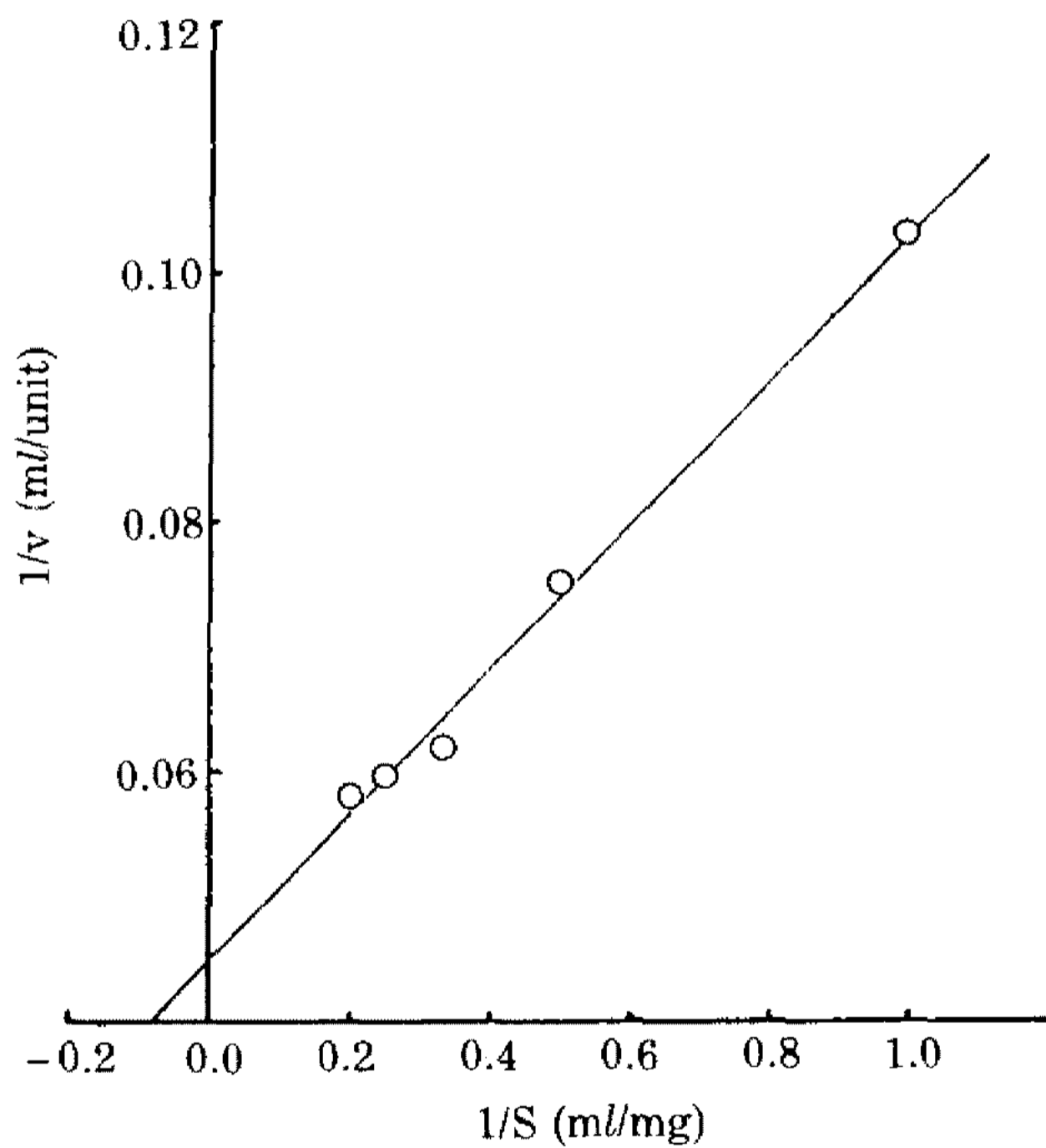


Fig. 9. Lineweaver-Burk plots for the determination of Km value of chitinase.

에서는 효소활성이 급격히 감소되었다. 한편, 효소의 열 안정성을 검토하기 위해 0-60°C 사이의 온도에서 각각 60분 동안 열처리한 다음 잔존활성을 측정된 결과 50°C까지는 안정성을 유지하였으나 60°C 이상에서는 거의 실패되었다. 이는 Yabuki와 Mizushima(25)가 보고한 *Aeromonas hydrophila*의 최적온도 40°C에 비해서는 최적온도가 10°C 정도 높았고 50°C까지 안정하였다는 *Vibrio*(27)와 *Streptomyces*(29)의 chitinase들과 유사한 결과이었다.

한편, 온도에 따른 chitinase의 반응속도를 Arrhenius plot하여 활성화에너지를 구한 결과 7.03 Kcal/mole로 나타났다.

**Chitinase의 기질친화력**

정제된 chitinase와 colloidal chitin을 반응시켜 Km값을 구한 결과 1.276 mg/ml이었다(Fig.9). 이의 결과로부터 *Aeromonas hydrophila*가 생산하는 chitinase의 colloidal chitin에 대한 Km값이 2.8 mg/ml이었다는 Yabuki와 Mizushima(25)의 보고와 비교할 때 *Aeromonas salmonicida* YA7-625가 생산하는 chitinase는 colloidal chitin에 대한 기질친화력이 큰 것을 알 수 있었다.

**요 약**

근해 연안 토양으로부터 chitinase 활성이 우수한 균주를 분리하여 *Aeromonas salmonicida*로 동정하였으며, 분리균주의 효소생산 최적조건은 colloidal chitin 1.26%, tryptone 2.95%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15%, pH 8.5, 27°C에서 48시간 진탕배양하였을 때였다. 효소의 정제는 배양액으로부터 ammonium sulfate 침전, affinity adsorption, hydroxylapatite chromatography, gel filtration을 통해 수율 29.7%, 정제도 18.5배의 정제효소를 얻었다. 정제된 chitinase의 최적온도와 pH는 50°C와 7.0이었고 pH 안정성은 pH 5.0-9.0 사이였고 50°C까지 안정하였으며, Km값은 1.276 mg/ml, 분자량은 200,000 daltons으로 확인되었다.

**감사의 말**

본 연구는 1989년 연세대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 연구입니다.

**참고문헌**

1. 石川文保, 大寶明, 島原健三, 戸倉 清一, 平野茂博: 最後のバイオマスキノ, キトサツ, 技報堂出版 (1988).
2. Muzzarelli, R.A.A.: "Chitin", Pergamon Press (1977).
3. Deshpande, M.V.: *J. Sci. Indus. Res.* **45**, 273-281 (1986).
4. 平野茂博, 瀧口泰之, 島原健三: 別冊フードケミカル, キチン/キトサツの科學, 食品化學新聞社 (1987).
5. Dixon, M. and E.C. Webb: *Enzymes*, 3rd ed., Longman, 860 (1979).
6. Monreal, J. and E.T. Reese: *Can. J. Microbiol.* **47**, 22 (1984).

7. Iverson, K.L. and M.C. Bromel: *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 22 (1984).
8. Clarke, P.H. and M.V. Tracey: *Gen. Microbiol.* **14**, 150 (1956).
9. Jeuniaux, C.: *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **67**, 597 (1959).
10. Oranusi, N.A. and A.P. Trinci: *J. Microbiol.* **43**, 17 (1985).
11. Tjunova, N.A.: *Microbiology* **52**, 723 (1983).
12. Hou, H.H. and S.C. Jong: *J. Ferment. Technol.* **63**, 189 (1985).
13. Monaghan, R.L. and D.E. Eveleigh: *Nature New Biol.* **245**, 78 (1973).
14. Vessey, J.C. and G.F. Pegg: *Trans. Brh. Mycol. Soc.* **60**, 133 (1973).
15. Elango, N., J.U. Correa and E. Cabib: *J. Biol. Chem.* **257**, 1398 (1982).
16. Boller, T. and A. Gehri: *Planta*, **157**, 22 (1983).
17. Tsukamoto, T. and D. Koga: *Agric. Biol. Chem.* **48**, 931 (1984).
18. Jeuniaux, C.: *Nature* **192**, 135 (1961).
19. Spindler, M. and B.E. Shaaya: *Insect. Biochem.* **16**, 187 (1986).
20. Reynolds, D.M.: *J. Gen. Microbiol.* **11**, 150 (1954).
21. Berger, L.R. and D.M. Reynolds: *Biochem. Biophys. Acta.* **29**, 522 (1958).
22. Skujins, J., A. Pukite and A.D. Melaren: *Enzymologia* **39**, 353 (1970).
23. Yabuki, M., K. Takayama, A. Ando, and T. Fujii: *Tech. Bull. Faculty Haticulture, Chiba University*, **34**, 21 (1984).
24. Otakara, A.: *Agric. Biol. Chem.* **25**, 54 (1961).
25. Yabuki, M. and K. Mizushina: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**, 25 (1986).
26. Roberts, R.L. and E. Cabib: *Anal. Biochem.* **127**, 402 (1982).
27. Otakara, A. and M. Mitsutomi: *J. Ferment. Technol.* **57**, 169 (1979).
28. Lundblad, G. et al: *Eur. J. Biochem.* **100**, 455 (1979).
29. Tominaga, T. and Y. Tsujisaka: *Agric. Biol. Chem.* **40**, 2325 (1976).

(Received November 23, 1990)