

## 공업적 이용을 위한 식물성 키틴분해효소의 탐색

한범구 · 이우진<sup>1</sup> · 유탁 · 박인호 · 조도현\*

아주대학교 생물공학과, <sup>1</sup>삼아벤처

**초록** : 키틴을 효소적인 방법으로 분해하여 키틴 올리고머를 생산할 수 있는 값싸고 안정적인 효소원을 확보하기 위하여 벼, 콩, 참다래, 아몬드, 粗과파인 등의 식물체로부터 키틴분해효소를 탐색하였다. 왕겨, 콩깍질, 참다래의 외피 등에서 키틴분해효소의 활성이 나타났으며 껍질을 제거한 콩, 쌀기울, 백미, 탈지 대두분 등에서는 활성이 없었다. 이들 키틴분해효소는 exochitinase와 endochitinase 형태의 두종류 활성을 갖는 것이 관찰되었으며, 참다래와 粗과파인에서 endochitinase의 활성이 높았다. pH의 영향은 exochitinase의 경우 효소원에 따라 pH 5~7 사이에서 최대활성을 나타내었고 endochitinase는 모두 pH 3과 pH 5~6의 두 곳에서 최대활성을 나타내었다. 온도변화에 의한 exochitinase의 활성은 50°C에서도 비교적 안정했다. 반면에 endochitinase는 종류에 따라 다양한 최적 온도를 갖는 것이 관찰되었다. 또한 이들 조효소는 키토산분해 활성을 갖고 있었으며 왕겨가 가장 높고 콩깍질, 참다래의 순서였다. 키틴을 이용한 키틴올리고머의 생산을 위한 가장 적합한 효소원으로는 exochitinase의 활성이 가장 적으며 endochitinase의 활성이 높은 粗과파인이 가장 적합한 것으로 사료되었다.(1996년 9월 13일 접수, 1996년 10월 24일 수리)

### 서 론

키틴은 N-acetylglucosamine이  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4)결합한 polymer로서 분자량이 수백만에 이르고 있으며 천연자원 중에서 셀룰로오스 다음으로 지구상에 많이 존재하는 biomass이다. 1970년 후반부터 키틴과 키틴의 탈아세틸화로 얻어지는 키토산의 용도에 대하여 연구가 매우 활발히 진행되고 있다. 최근에는 키틴 및 키토산의 올리고머가 다양한 생리활성을 나타냄이 밝혀져서 이들 올리고머의 공업적 생산이 중요한 연구과제가 되고 있다.<sup>1,2)</sup>

키틴의 올리고머를 얻기 위해서 키틴분해효소에 대한 활발한 연구가 이루어지고 있으며, 키틴분해효소의 중요 생산원으로 미생물을 들 수 있으나 이들 미생물이 생산하는 분해효소는 거의 대부분이 분해양상이 exochitinase type으로 N-acetylglucosamine이나 N-acetylglucosamine의 dimer를 생산하고 있으며<sup>3-5)</sup> 올리고머를 생산하는 균주에 대하여서는 현재 *Bacillus*계통<sup>6)</sup>에서 연구가 활발히 진행되고 있다. 한편 식물체에서도 키틴분해효소가 발견되었는데, 식물체의 키틴분해효소는 pathogen related protein,  $\beta$ -1,3-glucanase, protease inhibitor 등과 함께 systematic acquired resistance (SAR)에 속하는 효소로 병원균이 침입하거나 비생물학적 자극에 대하여 유도되는 단백질로서 대부분이 endochitinase로 비교적 열과 산에 안정한 것으로 알려져 있다.<sup>3,7,8)</sup> 그러나 이들 효소의 공업적 이용에 대하여서는 거의 연구된바 없다.

본연구에서는 키틴의 올리고머를 공업적으로 생산하기 위하여 endochitinase 형태의 값이 저렴하고 안정적인 효소

원을 탐색하여 이들 효소의 최적pH, 최적온도, endochitinase활성과 exochitinase활성의 비율을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

벼(*Oryzae sativum* L)의 경우에는 수원근교의 방앗간에서 벼를 도정하여 왕겨와 쌀기울을 얻었으며 cutting mill을 이용하여 20 mesh이하로 분쇄하여 사용하였다. 콩나물 콩(*Glycine max* Merrill)은 시장에서 구입하여 전기맷돌로 1차 분쇄하여 껍질과 나머지 부분으로 분리 후 cutting mill을 이용하여 20 mesh이하로 분쇄하여 사용하였다. 대두분은 저온에서 유기용매로 지방성분을 제거한 제품(동방유량)을 사용하였다. 참다래(*Actinidia chinensis*)는 제주도 농장에서 구입한 것을 껍질과 과육부위로 나누어서 사용하였다. 콩나물은 시장에서 구입한 제품을 머리부위와 줄기부위로 나누어서 사용하였다. 粗과파인은 비전상사의 상품(Collupulin)을 구입하여 사용하였다.

#### 효소액의 제조

Cutting mill로 분쇄한 콩, 백미, 왕겨는 4°C에서 pH 5.2, 40 mM citrate-phosphate 완충액을 1:5 (w/v)로 가하여 16시간 이상 진탕하였고, 참다래의 표피에는 소량의 과육부분이 함유된 상태로 사용하였다. 이들 시료를 3,000 g에서 10분 원심분리하여 얻은 상정액을 다시 20,000 g에서 20분 원심분리 후 상정액을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 100%로 포화시켜 염석하여 사용하였다. 탈지 대두분은 유기용매로 탈지한 대두분

찾는말 : chitin, chitinase, plant, oligomer, chitosanase

\*연락처자

을 분쇄시키지 않고 상기 완충액에 녹여서 사용하였다. 아몬드  $\beta$ -glucosidase (Sigma사, 미국)는 상기 완충액으로 희석하여 사용하였으며 비전상사로 부터 구입한 粗과파인은 완충액에 녹여서 그대로 사용하거나 혹은 12시간 이상 투석 후 사용하였다. 각 효소액을 Lowry 등의 방법<sup>9)</sup>으로 단백질 농도를 정량하였다.

**효소활성 측정**

**(1) Exochitinase 활성 측정**

표준분석법은 염산을 처리하여 제조한<sup>10)</sup> colloidal chitin 2 mg에 단백질 1 mg 해당량의 효소액을 가하고 부피를 4 ml이 되도록 pH 5.2, 40 mM citrate-phosphate 완충액으로 조정한다. 37°C에서 2시간 진탕하면서 반응시킨 후 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 중지시키고 냉각하여 3,000 g에서 20분 원심분리하여 미반응의 colloidal chitin을 제거한 후 상정액을 Reissig 등의 방법<sup>11)</sup>으로 N-acetylglucosamine을 정량하였다.

**(2) Endochitinase 활성 측정**

Exochitinase 활성 측정 상정액 500  $\mu$ l를 취하여 달팽이내장  $\beta$ -glucuronidase (Sigma사, 미국) 100  $\mu$ l(1U)를 가하고 pH 5.2, 40 mM citrate-phosphate 완충액으로 1 ml이 되도록 조정하고 37°C에서 1시간 진탕 반응한 후 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 중지한 후 냉각하여 Reissig 등의 방법<sup>11)</sup>으로 정량하여 total activity를 측정 한 후 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Endochitinase activity} = \text{total activity} - \text{exochitinase activity}$$

**키틴산 분해효소의 활성 측정**

탈아세틸화 80%의 키틴산 초산용액<sup>12)</sup>을 중화하여 제조한 colloidal chitosan 2 mg에 단백질 1 mg 해당량의 효소액을 가하고 부피를 4 ml이 되도록 pH 6, 40 mM citrate-phosphate 완충액으로 조정한다. 37°C에서 2시간 진탕하면서 반응시킨 후 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 중지하고 냉각하여 3,000 g에서 20분 원심분리하여 상정액을 Tsuji 등의 방법<sup>13)</sup>으로 hexosamine을 정량하였다.

**온도 및 pH의 효과 측정**

온도는 pH 5.2에서 30~70°C까지 10°C간격으로 2시간씩 반응시키고, pH는 2.5~7까지는 citrate-phosphate, 7~8까지는 phosphate 완충액으로 37°C에서 2시간 반응 후 exochitinase와 endochitinase활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**키틴 및 키틴산 분해효소의 분포**

Table 1에서 보는 바와 같이 콩나물의 경우 줄기에서 약하게 키틴 분해효소 활성을 보였으나 머리부분에서는 효소 활성을 측정할 수 없었다. 콩나물 콩은 껍질에 높은 효소활

Table 1. Distribution of the total chitinolytic activity of some crude enzymes from plants

Source	Part/treatment	Total activity
Soybean sprout	head	UD
	stem	+
Soybean for sprouting	seed coat	++++
	bean after the removal of seed coat	UD
Defatted soybean powder		UD
Rice	bran	+++
	integument + germ	UD
	polished rice	UD
Almond	$\beta$ -glucosidase	++
Crude papain	no-treatment	+
	dialysis	+++
Kiwi fruit	pericarp	+++
	pulp	++

UD : undetectable

성을 보였으나 껍질을 제외한 부분에서는 키틴분해효소의 활성이 검출되지 않았다. 또한 탈지 대두분에서는 효소활성을 검출하지 못하였다. 벼의 경우에는 왕겨에 집중적으로 분해효소가 존재하며 쌀기울과 백미에서는 활성도를 찾을 수 없었다. 아몬드의  $\beta$ -glucosidase에서는 높은 활성을 보였으며 粗과파인은 그대로 사용한 경우에는 활성이 미미했으나 12시간 이상 투석시킨 후 사용한 경우 아주 높은 활성을 보였다. 참다래에서도 높은 활성이 나타났으나 껍질부분에서 더 높았으며 껍질을 취할 때 과육이 약간 존재했기 때문에 좀더 연구해야 될 것으로 생각된다.

키틴분해효소가 쌀겨와 콩껍질, 참다래의 껍질에서 많이 존재하는 대신에 쌀기울이나 백미, 껍질을 제거한 콩에서 검출이 되지 않은 것은 식물이 키틴을 갖고있지 않음에도 불구하고 식물체의 키틴분해효소가 존재하는 것이 종자를 보호하기 위한 것임을 말하여주고 있다<sup>14)</sup>. Wadsworth와 Zikakis<sup>15)</sup>가 콩에서 키틴분해효소를 분리·정제한 것을 본 연구결과로 미루어 볼 때 콩 껍질에 기인한 것으로 생각된다. 한편 단백질 분해효소원으로 주로 사용되고 있는 粗과파인에서 키틴분해효소의 활성이 발견된 것은 Howard 등<sup>16)</sup>이 papaya에서 lysozyme 및 키틴분해활성을 검출했을 뿐 아니라, 시판되는 단백질분해효소와 지방분해효소 등에서 키틴의 점도를 감소시킨다고 보고한 것과 일치한다.

이상의 실험결과로 본 실험에서는 키틴분해효소의 활성이 높고 값싸게 얻을 수 있는 왕겨, 콩나물 콩 껍질과 상업적으로 이용하고 있는 粗과파인을 중점적으로 연구하였다.

**추출 단계에 따른 키틴분해효소의 회수와 specific activity**

콩껍질과 왕겨의 3,000 g 상정액과 이를 다시 20,000 g에서 원심분리한 후에 침전과 상정액으로 나누고 상정액의 단백질 농도가 낮아서(0.3 mg/ml 이하) 상정액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 단백질을 회수한 후에 이들에 대하여 키틴분해효소의 분포를 조사하였다.

Table 2a. Enrichment of the total chitinolytic activity of rice bran during the preparation of the crude enzyme

Treatment	Protein (mg)	Specific activity (μg/mg)	Yield (%)	Purification
3,000 g supernatant	630	32.54	100	1
20,000 g supernatant	461	42.33	95	1.3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt	125	100.68	61	3.1

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to 100% saturation

The reaction mixture contained 2 mg of the colloidal chitin and the volume of each fraction equivalent to 1 mg of protein.

Table 2b. Enrichment of the total chitinolytic activity of soybean seed coat during the preparation of the crude enzyme

Treatment	Protein (mg)	Specific activity (μg/mg)	Yield (%)	Purification
3,000 g supernatant	3536	37.76	100	1
20,000 g supernatant	3048	43.55	99	1.15
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt	839	133.06	83	3.52

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added to 100% saturation

The reaction mixture contained 2 mg of the colloidal chitin and the volume of each fraction equivalent to 1 mg of protein.

Table 2a에서 보는 바와 같이 왕겨의 경우에는 20,000 g 상징액이 3,000 g 상징액보다 specific activity는 30%가 증가하였으며 수율면에서는 5%만 감소하였다. 20,000 g 상징액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 얻은 침전물에서는 specific activity는 3,000 g 상징액보다 3배 이상 증가하였고 수율은 60%정도가 되었다.

콩깍질의 경우에는 Table 2b에서와 같이 20,000 g 상징액이 3,000 g 상징액보다 specific activity는 15%가 증가하였으며 수율면에서는 거의 감소가 없었다. 20,000 g 상징액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 얻은 침전물에서는 specific activity는 3,000 g 상징액보다 3.5배 이상 증가하였고 수율은 83%가 되었다.

이는 Boller 등<sup>17)</sup>의 강낭콩 잎에서 키틴분해효소를 분리하는 과정에서 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 침전에서 얻은 분획이 specific activity가 2.1배이고 수율이 94%인 것과 Wadsworth와 Zikakis<sup>15)</sup>가 콩에서 키틴분해효소를 분리하였을 때 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 침전분획의 경우 specific activity가 1.8배이며 수율이 85%인 것과 비교할 때 수율면에서는 60~80%로 약간 떨어졌으나 specific activity 면에서는 약간 향상된 것으로 나타났다.

**pH의 영향**

**(1) Exochitinase**

Fig. 1에서 보는 바와 같이 왕겨, 콩깍질, 참다래, 粗과파인, 아몬드 β-glucosidase가 최적 pH를 달리함을 보여주고 있다. 콩깍질의 경우는 pH 5에서, 쌀겨의 경우에는 pH 7에서 최대 효소활성을 보였고 참다래는 pH 6~7에서 최대의

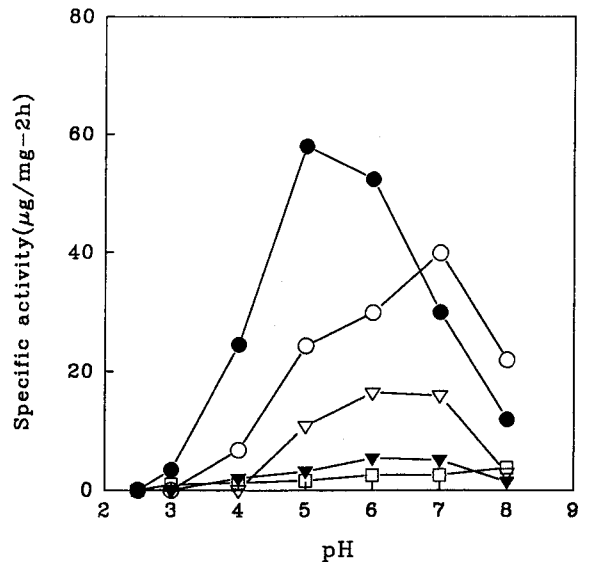


Fig. 1. Effect of the pH on the exochitinolytic activity of some crude enzymes. citrate-phosphate buffer : pH 2.5-7, phosphate buffer: pH 7-8 rice bran ○—○; soybean seed coat ●—●; kiwi fruit ▽—▽; crude papain ▼—▼, almond β-glucosidase □—□.

활성을 나타냈다. 아몬드 β-glucosidase는 활성이 매우 낮으며 pH 6~8까지 안정한 것으로 보인다.

활성도에서는 콩깍질이 가장 높고 그 다음이 쌀겨, 참다래의 순서이며, 粗과파인과 아몬드 β-glucosidase가 낮은 활성을 보였다.

**(2) Endochitinase**

아몬드 β-glucosidase를 제외한 모든 효소가 pH 3에서 가장 높은 활성도를 보이고 있다(Fig. 2). 아몬드 β-glucosidase는 pH 6에서 최대활성을 보이며, 참다래의 경우에는 pH 4까지 안정적인 효소활성을 유지하고 나머지 효소들은 활성이 감소한뒤에 다시 pH 6에서 제2의 높은 활성도를 보인다. 따라서 이들 조효소액은 두 종류 이상의 효소 혼합물이거나 아니면 한가지 효소가 다른 pH에서 제2의 활성도를 갖는 것으로 생각된다.

본 실험에서 나타난 최적 pH를 보면 쌀겨, 콩깍질, 粗과파인은 pH 3에서 최고의 활성도를 나타내고 참다래는 pH 4에서 최대활성도를 나타내는 반면에 아몬드 β-glucosidase는 pH 6에서 최적 pH로 나타냄으로 두가지 부류로 나누어짐을 보이고 있다. Zikakis와 Castle<sup>18)</sup>은 콩에서는 순수분리된 키틴분해효소의 최적 pH가 3.5, 말뚝버섯의 경우에도 최적 pH가 3.5로 보고하였다. 또한, 임과 김<sup>19)</sup>은 벼세포 현탁배양액에서 분리된 산성 단백질은 pH 3에서 최적 pH를 나타냄을 보고하였었다. 반면에, Cabib 등<sup>20)</sup>은 밀 배아에서 분리한 키틴분해효소의 최적 pH를 6으로 보고하였고, 김 등<sup>21)</sup>은 양파에서 분리한 키틴분해효소는 pH 5.5에서 최적 pH를 갖고, 박 등<sup>22)</sup>은 강낭콩 잎에서 순수분리한 키틴분해효소의 최적 pH는 6으로, 임 등<sup>23)</sup>은 벼 현탁배양액에서 분리한 염기성 단백질의 최적 pH가 5.2로 보고하였다. 이들의 보고를 종합하여 보면 pH 3~4 부근에서 최적 pH를 나타내는 키틴분해효소군과 pH 5.5~6에서 최적 pH를 보이는

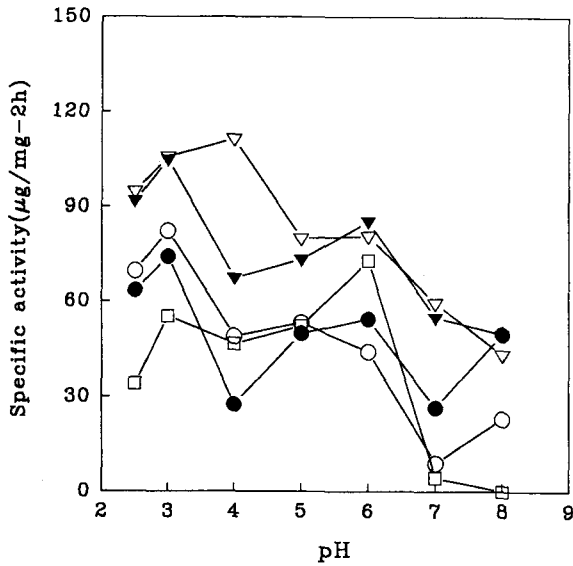


Fig. 2. Effect of the pH on the endochitinolytic activity of some crude enzymes. citrate-phosphate buffer : pH 2.5-7, phosphate buffer : pH 7-8 rice bran ○—○; soybean seed coat ●—●; kiwi fruit ▽—▽; crude papain ▼—▼, almond β-glucosidase □—□.

키틴분해효소군의 두 종류로 구별됨을 보여주어 본 실험에서 사용된 조효소액은 효소의 혼합용액으로 생각된다.

온도의 영향

(1) Exochitinase

Fig. 3에서와 같이 60°C정도까지는 아몬드 β-glucosidase를 제외하고는 모두 효소활성을 유지하는 결과를 보였으며 50°C에서 가장 높은 활성을 보였고 70°C에서는 효소활성이 급격히 감소함을 보였다. 粗과파인의 경우에는 70°C까지도 완만한 효소활성의 증가를 보이고 있다.

(2) Endochitinase

Endochitinase의 온도에 의한 영향은 3가지 유형을 나타내고 있다(Fig. 4). 우선 콩껍질에서는 40°C가 최적온도였으며 粗과파인과 아몬드 β-glucosidase는 50°C에서 최적온도를 왕겨와 참다래는 60°C에서 최적온도를 보였다. 또한 70°C에서도 모든 종류의 효소가 상당한 안정성을 나타내었다. 이와같이 endochitinase는 exochitinase에 비해 비교적 고온에서도 활성이 안정한 결과를 보였다. 粗과파인의 경우 70°C에서도 최대 효소활성의 80%를 나타내고 콩껍질에서는 최대활성의 70%정도를 나타냄으로서 비교적 고온에서도 안정한 활성을 보였다.

염과 김<sup>19)</sup>은 벼 현탁배양액에서 산성단백질의 최적 온도가 50°C이며 온도의 변화에 예민하다고 보고하였다. 염 등<sup>20)</sup>은 벼 현탁배양액의 염기성 단백질의 최적온도가 60°C이나 70°C에서는 효소활성이 검출되지 않는다고 보고하였다. 박<sup>21)</sup>은 강낭콩의 잎에서는 50~60°C에서 최적온도를 보였으며 김 등<sup>20)</sup>은 파에서 분리한 효소의 최적온도가 50°C로 보고하였다. 본 실험에서 endochitinase의 활성이 70°C에서도 최대활성의 50% 이상을 유지하여 비교적 안정한 것으로 나타났고 특히, 粗과파인과 콩껍질이 70°C에서도 최고활성

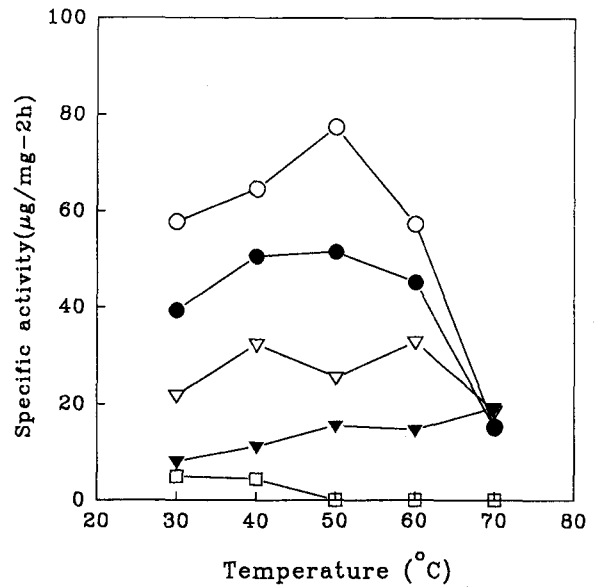


Fig. 3. Effect of the temperature on the endochitinolytic activity of some crude enzymes. rice bran ○—○; soybean seed coat ●—●; kiwi fruit ▽—▽; crude papain ▼—▼, almond β-glucosidase □—□.

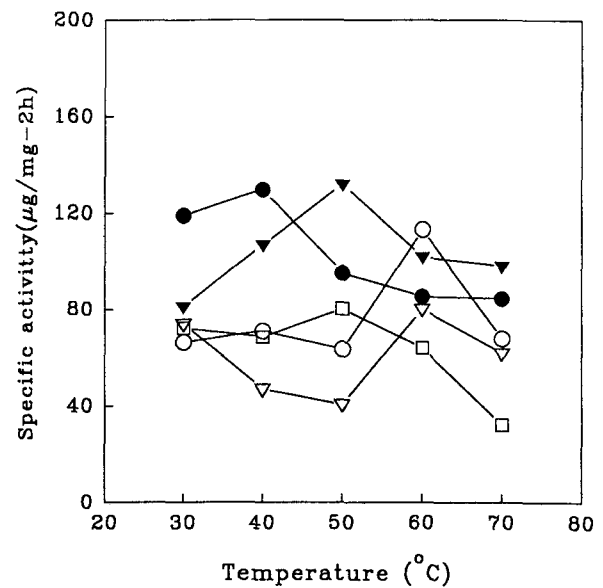


Fig. 4. Effect of the temperature on the endochitinolytic activity of some crude enzymes. rice bran ○—○; soybean seed coat ●—●; kiwi fruit ▽—▽; crude papain ▼—▼, almond β-glucosidase □—□.

도의 70% 이상을 유지하는 것은 이효소들이 정제되지 않았기 때문에 고온에서 효소를 안정화하는 요소를 포함하고 있는 것으로 추측할 수 있으나 열에 대한 안정성을 주는 인자에 대하여서는 더 연구가 진행되어야 하겠다.

키토산에 대한 분해력

이들 조효소의 키토산에 대한 분해능력을 Table 3에 표시하였다. 표준 반응조건인 pH 6에서 효소활성을 측정할 결과 왕겨가 가장 높은 활성을 보였으며 왕겨의 활성을 100으로 하였을 때 콩껍질은 25%, 참다래껍질은 25%, 粗

Table 3. Comparison of the chitosanalytic activity of some crude enzymes from plants

Source	Specific activity ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Relative activity
Rice bran	106.63	100
Soybean seed coat	68.46	64.2
Kiwi fruit	26.98	25.3
Crude papain (Collupulin)	5.69	5.34
Almond $\beta$ -glucosidase	0	0

The reaction mixture contained 2 mg of the colloidal chitosan and the volume of each fraction equivalent to 1 mg of protein.

과파인은 3%, 아몬드  $\beta$ -glucosidase는 전혀 작용하지 않음을 보여주고 있다. 이와같이 실험한 대부분의 조효소액이 키토산에 대하여 분해능력을 갖는 것은 동일효소가 두가지 기질에 대하여 작용을 하는 것인지 아니면 조효소액이므로 키토산분해효소와 키틴분해효소가 공존하는지는 좀더 연구해야 하겠다.

이상의 결과를 종합하면 키틴을 이용한 키틴올리고머의 생산을 위한 가장 적합한 효소원으로 exochitinase의 활성이 가장 적으며 endochitinase의 활성이 높은 粗과파인이 가장 적합한 것으로 고려되었다. 또한 粗과파인은 상업적으로 이미 저가로 이용되고있는 효소이며 게겍질이나 새우껍질로부터 키틴의 제조시 약알칼리의 처리에 의한 단백질 제거대신에 粗과파인의 사용으로 대처할 수 있는 장점을 지니고 있다. 한편 농산폐기물로 부터 이용한 고부가가치 물질을 얻는다는 관점에서 보면 왕겨에서 키틴분해효소를 얻을 수 있다는 것은 주목할 점이다. 위에서 탐색한 각 식물체의 키틴분해효소를 정제·순수분리하여 비교한다면 더욱 정확한 결과를 얻을 것이며 이에대한 연구가 진행중에 있다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 '95 산학협력연구 지원과제(과제번호 : 95-1-15-03-01-3)에 의하여 수행된 연구결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- Zikakis, J. P. (1984) Chitin, chitosan, and related enzymes. Academic Press, New York.
- Austin, P. R., C. J. Brine, J. E. Castle, and J. P. Zikakis (1981) Chitin : new facets of research. *Science*, **212**, 749-753.
- Flach, J., P. E. Pilet and P. Jollès (1992) What's new in chitinase research? *Experientia*, **48**, 701-716.
- Ohtakara, O., Y. Uchida and M. Mitsutomi (1978) Chitinase systems in microorganisms and the commercial use of chitin. in "Proceedings of the first international conference on chitin/chitosan." edited by Muzzarelli R.A.A., E.R. Pariser, pp.587-600.
- Cabib E. (1989) Chitinase from *Serratia marcescens*. *Meth. Enzymol.*, **161**, 460-470.
- Uchida, Y. and A. Ohtakara (1989) Chitosanase from *Bacillus* species. *Meth. Enzymol.*, **161**, 501-505.
- Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vögeli and T. Boller (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature*, **324**, 365-367.
- 박노동, 송경숙, 정인용 (1992) 강낭콩 잎에서 정제한 키틴분해효소의 항균활성. *한국농화학회지*, **35**, 191-195.
- Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Shimahara, K. and Y. Takiguchi (1989) Preparation of crustacean chitin. *Meth. Enzymol.*, **161**, 417-423.
- Reissig, J. L., J. L., Strominger, and L. F., Leloir (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 965-968.
- 이우진, 한범구, 박인호, 박승현, 오훈일, 조도현 (1995) 키토산 제조시 반응 온도와 시간 및 입자크기가 키토산의 물리화학적 특성에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **27**, 997-1002.
- Tsuji, A., T. Kinoshita, and M. Hoshino (1969) Analytical chemical studies on amino sugars. II. Determination of hexosamines using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloride. *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1505-1510.
- Ryals, J., E. Ward, P. Ahl-Goy and J. P. Metraux (1992) Systematic acquired resistance : an inducible defence mechanism in plants. in "Inducible plant proteins : Their biochemistry and molecular biology." edited by Wray, J.L., Soc. Exper. Biol. Seminar Series 49, Cambridge University Press, pp.205-229.
- Wadsworth, S. A. and J. P. Zikakis (1984) Chitinase from soybean seeds : purification and some properties of the enzyme system. *J. Agric. Food. Chem.*, **32**, 1284-1288.
- Howard J. B., and A. N. Glazer (1967) Studies of the physicochemical and enzymatic properties of papaya lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5715-5723.
- Boller, T., A. Gehri, F. Mauch, and U. Vögeli (1989) Chitinase from *Phaseolus vulgaris* leaves. *Meth. Enzymol.*, **161**, 479-484.
- Zikakis, J. P. and J. E. Castle (1989) Chitinase-chitobiase from soybean seeds and puffballs. *Meth. Enzymol.*, **161**, 490-497.
- 엄성연, 김수일 (1993) Chitinase/ $\beta$ -1,3-glucunase 활성 동시 보유 벼잎단백질 분획의 성질. *한국농화학회지*, **36**, 370-375.
- Molano, J., I. Polacheck, A. Duran, and E. Cabib (1979) An endochitinase from wheat germ : activity on nascent and preformed chitin. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4901-4907.
- 김영식, 이미연, 박영목 (1992) 파로부터 Chitinase의 정제 및 성질. *한국생화학회지*, **25**, 171-177.
- 박노동, 이춘명, 박남용 (1991) 에틸린이 유도한 강낭콩 잎 키틴분해효소의 정제 및 특성. *한국생화학회지*, **24**, 121-126.
- 엄성연, 박희영, 김수일 (1994) Chitoooligosaccharides 처리에 의해 유도되는 chitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase 활성보유 벼 엽기성 단백질 ICG의 분리 및 성질. *한국농화학회지*, **37**, 43-48.

---

**Survey on the Chitinolytic Activity from Some Plants for the Industrial Utilization.**

Beom Ku Han, Woo Jin Lee<sup>1</sup>, Tak You, In Ho Park and Do Hyun Jo\* (*Department of Biotechnology, Ajou University, <sup>1</sup>Sama Venture Co.*)

**Abstract :** The survey on the chitinolytic activity of some plants was performed for the purpose of obtaining some reliable and inexpensive sources of chitinase. Rice, soybean for sprouting, kiwi fruit, almond and crude papain were investigated. Rice bran, seed coat of the soybean and the pericarp of kiwi fruit showed a considerable activity, while the bean after the removal of the seed coat, the mixture of rice integument and endosperm, polished rice, and defatted soybean powder didn't have any detectable activity. These crude enzymes have shown to contain both endo- and exochitinase activity. The effects of pH and temperature on the enzyme activity were variable. Furthermore we have observed the chitosanolytic activity from these enzyme preparations. The rice bran had the highest activity in the enzymatic degradation of chitosan, and seed coat of soybean and the pericarp of kiwi fruit followed. On the basis of the fact that crude papain was not only commercially available but also the most potent in the endochitinase activity and the lowest in the exochitinase activity, we could conclude that crude papain was considered as the most suitable source of the chitinase among plants studied in this paper. In addition, rice bran was worth further investigation from the point of utilizing agricultural by-product.

---

\*Corresponding author