

## Chitinase를 생성하는 *Serratia* sp. JM의 분리 및 특성

†차진명 · \*진상기 · \*\*고한철 · \*\*\*이인화  
조선대학교 자연과학대학 유전공학과, \*화학과, \*\*\*환경학과  
\*\*동아전문대학 환경공학과

### Isolation and Characterization of *Serratia* sp. JM Producing Chitinase

Jin-Myeong Cha<sup>†</sup>, Sang-Gi Jin\*, Han Cheol Koh\*\*, and In-Wha Lee\*\*\*

Dept. of Genetic Engineering, \*Dept. of Chemistry, \*\*\*Dept. of Environmental Science,  
Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

\*\*Dept. of Environmental Industry, Dong A Junior College, Chonnam 526-870, Korea

#### ABSTRACT

A chitinase-producing bacterium was isolated from seashore mud around Beobseongpo in Chunnam province by selective enrichment culture, and among it, one isolate which was the best in producing of chitinase was selected. Nutrient or MacConkey medium was confirmed with secreting of prodigiosin pigment by *Serratia* sp. JM, and it was performed by the production of clear zone on medium containing chitin. *Serratia* sp. JM was almost same compared with *Serratia marcescens* ATCC 27117 in respect of its morphological, physiological and biochemical characteristics except succinic, urea and pyruvic acid. *Serratia* sp. JM was resistant to tetracycline but was not resistant to kanamycin and chloramphenicol. The optimal temperature and pH for the production of chitinase from *Serratia* sp. JM were 30°C and 7.5, respectively. Production of chitinase and pH in the medium increased until the cultivation of 120 hours, but after 120 hours, they were decreased due to the acetic acid accumulated from degradation of chitin by *Serratia* sp. JM.

#### 서 론

Chitin은 지구상에서 섬유소 다음으로 풍부하게 존재하는 biomass로서 N-acetyl-D-glucosamine (NAG)의  $\beta$ -1,4 결합을 기본 구조로 하는 polymer로서 갑각류의 껍질, 곤충의 외골격, 균류의 세포벽이나 표피 및 각질부의 주성분을 이루고 있다(1-2). Chitin은 식품 가공 산업에서 대량으로 생산되는데, 조개, 새우 껍질의 폐기물이 주된 공급원이 되는

데 이들 가운데 절족류의 게나 새우 껍질 중 일부 chitin만이 산업적으로 이용되고 있다(3). 또한 chitin은 식물 세포벽에는 존재하지 않으므로 미생물이 생산하는 chitinase를 현재 사용하는 농약에 첨가하므로 농약의 잔류 독성으로 인한 중금속 축적이나 인체 해독 및 생태계 파괴 등을 방지하는 생물 농약으로도 이용할 수 있다(4-5). 그러므로 최근에는 이러한 chitin을 분해하는 미생물과 그 분해 산물의 이용 방법이 개발되면서 chitin 물질의 이용성을 높이기 위해 부존량이 많은 chitin을 유용 물질의 생산에 이용하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

† Corresponding Author

이들 가운데 chitin 분해 미생물이 생산하는 chitinase의 생산에 대한 관심이 높아지면서 chitinase에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 한편 chitinase는 대부분 inducible enzyme으로서 기질 첨가에 의해 쉽게 유도되는데 효소로서 chitin 분해에 직접 사용하거나, 균주 접종에 의한 식물 병원성 사상균을 방제하는 연구에 이용되고 있다(6-7).

Chitinase를 생성하는 미생물로는 *Serratia*(8-9), *Pseudomonas*(10), *Aeromonas*, *Enterococcus*, *Bacillus* 등의 세균(11)과 *Streptomyces* 등의 방선균(12), *Trichoderma*, *Aspergillus* 등의 사상균(13) 그리고 *Saccharomyces* 등의 효모(14) 등이 알려져 있으며, 식물체와 원생동물, 선충류, 절지류 등에서도 chitinase 등이 존재하는 것으로 보고되고 있다(15). 그러나 chitin 물질을 활용하거나 chitinase를 산업적으로 응용하기 위해서는 먼저 chitinase의 생산능이 높은 균주의 탐색과 탐색된 균주에 대한 유전자 조작이나 물리 화학적 처리를 통한 생산성 향상 등 효율적인 처리 과정 개발이 필요하다.

대부분의 chitin 분해 미생물에 관한 연구는 토양 중의 방선균인 *Streptomyces*를 대상으로 실시되고 있으나 이들 방선균주는 chitinase 생성에 있어 *Serratia* 세균에 비해 10배 정도 낮은 활성이 있는 것이 밝혀졌다(16-17). 이러한 연구 결과를 토대로 chitin 분해 미생물 및 chitinase의 실제 응용에 관한 연구도 활발히 진행되며 chitin 분해균을 이용하여 chitin 폐기물을 생물학적으로 처리하는 방법들이 제시되고 있으나 국내에서는 chitinase에 관한 연구가 미미하며 식품공업에서 대량 생산되는 갑각류 폐기물을 이용하지 못하고 있으며 chitinase의 생물 농약으로서의 활용 또한 연구가 부족한 실정이다(18-19).

따라서 본 연구에서는 1차로 chitinase를 생성하는 균주를 토양에서 분리하여 이들 분리 균주 중 chitin 분해능이 우수한 균주를 선별하여 분리 균주의 생리, 생화학적 특성 등을 조사하여 chitinase를 이용한 폐자원의 활용과 생물 농약 등으로의 응용을 위한 기초적인 연구 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 배지 조성 및 균주의 배양

Chitinase 생성 균주의 분리와 배양에 사용한 분리용 배지의 조성은 증류수 1ℓ에 chitin(purified powder chitin from crab shell, Sigma) 1.2g, yeast

extract 0.5g, tryptone 1.0g, NaCl 1.0g을 녹였으며, pH는 8.0으로 조절하였다(6, 8). 한천 배지는 분리용 배지에 bacto agar(Difco)를 1.5%(w/v) 농도로 첨가하여 사용하였다. 분리 균주의 보관을 위한 배지는 LB 배지를 사용하였다. LB 배지의 조성은 증류수 1ℓ에 yeast extract 5.0g, tryptone 10g, NaCl 10g을 녹여 사용하였다.

### Chitinase 생성 균주의 분리 및 선별

전남 법성포 해안의 갯벌 토양 시료를 분리원으로 하여 chitinase 생성균을 분리하였다. 시료 1g을 취하여 100ml의 saline buffer(0.85% NaCl)에 주입하여 vortex mixer로 완전 혼합하여 30분 동안 진탕 배양한 후 현탁액 1000 $\mu$ l를 정제 chitin이 함유된 분리용 액상 배지 50ml가 포함된 삼각 플라스크에 접종한 후 7일간 진탕 배양한 후 각 플라스크로부터 배양액 100 $\mu$ l씩 취하여 분리용 한천 배지에 도말 접종하고 30 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양하면서 colony 주변에 clear zone을 형성하는 균주를 1차로 분리하였다(4, 8, 24). 이들 균주 중 clear zone을 형성한 colony를 취하여 정제 chitin이 함유된 한천 배지에 picking하여 clear zone 형성이 가장 크고 선명한 colony를 선별하여 분리용 배지에 최종 접종하여 이들 가운데 chitinase activity가 가장 우수한 균주를 최종 선별하였다. 한편 공시 균주로는 *Serratia marcescens* ATCC 27117을 유전공학연구소에서 분양받아 사용하였다.

### 분리 균주의 동정

분리 균주의 형태적 특징은 그람 염색하여 광학 현미경으로 관찰하였고, 배양학적 특징은 영양 한천 배지나 MacConkey 배지에서 prodigiosin 색소 생성 유무를 조사하였고, 운동성은 반유동 한천 배지에서 stab culture하여 조사하였다. 최종 선별된 균주의 생리적 생화학적 특성을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology(19), Microbiological method(20) 등에 기술된 방법에 따라서 균주 동정을 수행하였다. 또한 분리균의 동정을 최종 확인하기 위해 시판 중인 API Kit를 병행하여 사용하였다.

### 유기물 동화 및 항생제 내성

분리 균주에 대한 여러 가지 유기물 동화 유무를 알아보기 위하여 각각의 유기물을 분리용 배지에 1.0%(w/v) 농도로 첨가하여 균의 성장을 조사하였

다. 또한 분리 균주의 유전적 지표를 알아보기 위하여 선별된 균주들을 분리용 액상 배지에서 대수성장기까지 배양한 다음 ampicillin, chloramphenicol, tetracycline, kanamycin, streptomycin, neomycin을 적절한 농도별로 첨가한 다음 LB 액상 배지에 접종하여 48시간 배양한 다음 배양액의 흡광도 차이에 따라 항생제 내성의 유무를 결정하였다.

#### 분리 균주의 성장 특성에 따른 chitinase 생성

분리 균주의 성장 특성에 따른 최적 chitinase 생성을 알아보기 위하여 온도 및 pH의 변화에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 조사하였다. 먼저 분리용 배지의 온도를 20°C~37°C 사이의 적절한 간격을 조절하여 온도에 따른 균의 성장과 chitinase 생성을 비교하였고, pH에 따른 균의 성장과 chitinase 생성을 알아보기 위하여 분리용 배지에 멸균된 0.5 N-HCl과 0.5 N-NaOH를 사용하여 배양액의 초기 pH를 3.0~10.0으로 조절하여 균의 성장과 chitinase 생성을 조사하였다(22). 균의 증식에 따른 세포 성장은 진탕 배양한 후 각각의 배양액을 취하여 3000rpm에서 5분간 원심분리한 후 침전된 chitin을 제거하고 상등액의 흡광도를 660nm에서 분광광도계(Hewlett Packard, HP 8452A UV)를 이용하여 측정하였다. 또한 위에서 얻은 최적 온도와 pH에서 분리 균주의 배양 시간에 따른 성장 곡선과 chitinase 생성 및 pH 변화를 발효조 배양기(Hoong A engineering, Model HDF-300)에서 조사하였다.

#### Chitinase 생성 측정

접종 균주를 colloidal chitin이 포함된 배지에 접종한 후 반응시간의 경과에 따른 chitinase 생성을 조사하였다. 배양액 1.6ml를 3,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 colloidal chitin을 제거하고 원심분리한 후 얻은 상등액 1.5ml를 15,000rpm으로 15분간 다시 원심분리하여 상등액을 chitinase 생성에 이용하였고, harvesting된 균체는 Lowry(21) 방법에 따른 단백질 정량에 사용하였다. Chitinase 생성은 Miller(22) 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 상등액 300 $\mu$ l에 0.5% phosphoric acid가 포함된 colloidal chitin 500 $\mu$ l와 DNS(dinitrosalicylic acid) 용액 750 $\mu$ l를 30°C에서 1시간 진탕 배양한 후 100°C 수조에서 10분간 가열하고 이 반응액을 15,000rpm에서 10분간 원심분리하고 상등액의 환원당을 DNS 방법으로 550nm 흡광도를 정량하여 chitinase 생성은 N-acetyl-D-glucosamine(NAG)와 비교하여 조

사하였다. Sodium sulfide는 산화를 방지하기 위하여 chitinase 생성 측정 직전에 첨가하여 사용하였다.

#### Colloidal chitin 제조

Chitin은 수소결합에 의해 단단한 구조를 가지고 있기 때문에 산이나 다른 효소의 작용에 의해 쉽게 분해되지 않는다. 그러므로 chitin 입자가 *Serratia* 등의 미생물에 이용되기 위해서는 colloidal chitin을 제조하여 탄소원으로 이용하는 것이 보다 효과적이다(8, 14). 그러므로 colloidal chitin을 제조하기 위해서는 먼저 crude chitin 100g을 HCl 2l에 가하여 4°C에서 48시간 교반하고 진공 펌프를 이용하여 glass wool filter에 여과하였다. 이때 여액은 4°C 찬물에 교반하여 백색의 colloidal chitin이 생성되면 원심분리한 후 5N-NaOH로 찬물에 중화하여 pH를 7로 조절하여 증류수로 수회 세척하고 난 후 원심분리하여 얻어진 침전물을 40°C에서 24시간 건조한 후 colloidal chitin으로 사용하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Chitinase 생산 균주의 분리 및 선발

갯벌 분리원 시료로부터 chitin을 분해하는 세균을 분리하기 위하여 1.2% chitin이 포함된 분리용 한천 배지에 분리 균주를 평판도말하면 분리 균주에 의해 chitin이 분해되어 chitinase가 생성되면서 clear zone을 나타내는 균주를 1차로 분리하였다. Clear zone을 나타내는 1차 분리 균주를 분리용 한천 배지에 picking하여 5일간 배양한 후 clear zone 형성이 가장 크고 선명한 colony를 chitin이 포함된 분리용 액상 배지에서 5일간 배양한 후 chitinase activity를 조사하여 chitinase 생성이 가장 우수한 JM을 최종 선발하여 본 연구의 분리 균주로 선정하였다.

##### 균주의 분류 및 동정

분리 균주 JM의 형태적, 생리적 및 생화학적 특성을 조사하여 Table 1에 나타내었다. JM은 약간의 운동성을 갖는 호기 및 혐기성 단간균으로 4°C와 42°C에서 생육하지 않고 포자를 형성하지 않는 Gram 음성 균으로 gelatin 액화능은 존재하나 strach 분해능은 없고, catalase가 양성, oxidase는 음성, citrate는 음성, nitrate reduction은 양성, indole test는 음성이었다. Methyl red 반응은 음성, VP 반응은 약하게 나타났으며, H<sub>2</sub>S 생성은 K/A이

**Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain JM.**

Characteristics	Strain JM	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 27117
<b>Morphological characteristics</b>		
shape	short rod	rod
cell size( $\mu\text{m}$ )	0.4~0.8	0.2~1.4
motility	+	+
gram stain	-	-
spore stain	-	-
<b>Cultural characteristics</b>		
colony color on nutrient agar	red	red
colony color on MacConkey agar	red	red
growth at 4°C	-	-
at 42°C	-	-
<b>Biochemical characteristics</b>		
aerobic growth	+	+
anaerobic growth	+	+
hydrolysis of gelatin	+	+
hydrolysis of starch	-	-
catalase test	+	+
oxidase test	-	-
citrate test	-	+
nitrate reduction test	+	+
indole test	-	-
voges-proskauer test	+	+
methyl red test	-	-
H <sub>2</sub> S production	K/A	K/A
<b>Glycolysis test</b>		
glucose	+	+
maltose	+	+
sucrose	+	+
lactose	-	-

었고, 당 분해능은 glucose, maltose, sucrose는 양성이나 lactose는 음성이었다. Table 1에 나타낸 것과 같이 공시 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117과 비교 검토한 결과 형태학적, 생리적 및 생화학적 특성 중 citrate test을 제외하고는 모두 같은 특성을 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 Bergey's manual of systematic bacteriology(19), Microbiological method(20) 등에 기술된 분류 기준에 따라 분리 균주를 *Serratia* 또는 그 유연군으로 추정하였다.

*Serratia* 유연군 중 *Serratia marcescens*의 세균은 nutrient 배지나 MacConkey 배지에서 붉은 색의 prodigiosin 색소를 생성하며, catalase test는 양성을 나타낸다. Prodigiosin은 *Serratia marcescens*의

2차 대사 산물로 대부분의 *Serratia marcescens*들은 직선형의 tripyrrole 구조를 갖는 붉은 색의 prodigiosin(2-methyl-3-amyl-6-methoxy-pyrodiosen)을 형성한다(7, 23). 따라서 prodigiosin 색소의 생성을 확인하기 위하여 분리 균주인 JM을 nutrient 배지나 MacConkey 배지에 배양해 본 결과 분리 균주인 JM은 이들 배지에서 잘 성장하며 성장시 배지 내에 존재하는 lactose는 분배하지 못하였지만 prodigiosin 색소를 생성하므로 배지 내의 colony는 붉은 색을 띠면서 성장하게 되므로 prodigiosin 색소 생성이 확인되었고, catalase test에서도 양성으로 나타났다. 이상의 결과들로부터 분류 균주 JM은 *serratia*로 추정되어 현재 시판 중인 API Kit 중 Gram 음성의 rod type을 동정할 수 있는 API 20E Kit를 사용하여 JM의 생리, 생화학적 특성을 조사한 후 API 20E Analytical Profile Index에 의해서 분석한 결과 분리 균주인 JM이 *Serratia* sp.로 판명되어 분리 균주를 최종적으로 *Serratia* sp. JM으로 명명하였다.

#### 분리 균주인 *Serratia* sp. JM의 Chitinase 생성

분리 균주인 *Serratia* sp. JM을 이용하여 정제 chitin이 포함된 한천 배지에서 chitinase 생성을 확인해 보았다. Chitinase는 chitin에 의해 유도되어 분비되는 단백질이기 때문에 chitin을 분해하는 미생물에 의해 chitinase를 세포벽 외부로 분비하게 된다. 따라서 정제 chitin이 포함된 한천 배지에서 chitin 분해 균주가 분비하는 chitinase에 의해 chitin이 분해되어 clear zone이 형성하게 된다. 그러므로 본 연구에서는 LB 배지에서 자란 single colony인 *Serratia* sp. JM 접종 균주를 1.2% chitin이 포함된 분리용 배지에 picking하여 5일간 배양한 후 chitinase 생성을 확인하여 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 chitin 배지에 picking되어 자란 *Serratia*는 chitin을 분해하여 chitinase를 생성하면서 clear zone을 형성하게 되므로 분리 균주인 *Serratia* sp. JM과 *Serratia marcescens* ATCC 27117이 chitinase를 생성하는 균주임을 최종 확인할 수 있었다.

#### 유기물 동화 및 항생제 내성

*Serratia* sp. JM을 공시 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117과 비교하여 유기물 동화 유무를 조사한 후 Table 2에 나타내어 비교해 본 결과, succinic, urea 및 pyruvic산을 제외하고는 이들 균주의

Table 2. Assimilation of organic compounds by the isolated *Serratia* sp. JM.

Substrate	Strain <i>Serratia</i> sp. JM	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 27117
proline	+	+
succinic	+	-
glycine	+	+
L-glutamate	+	+
maltose	+	+
DL-phenylalanine	+	+
biotin	+	+
arabinose	+	+
leucine	+	+
isoleucine	+	+
serine	+	+
tryptophane	+	+
urea	+	-
ribose	+	+
glucose	+	+
sucrose	+	+
mannitol	+	+
tryptone	+	+
oxalate	-	-
pyruvate	-	+

Table 3. Susceptibility of the isolated *Serratia* sp. JM. to antibiotics.

Antibiotics	Strain	<i>Serratia</i> sp. JM	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 27117
ampicillin	50 µg	-	-
	100 µg	-	-
kanamycin	50 µg	-	+
	100 µg	-	-
streptomycin	50 µg	+	-
	100 µg	+	-
tetracyclin	25 µg	+	+
	50 µg	+	+
chloramphenicol	50 µg	-	-
	100 µg	-	-
neomycin	64 µg	+	-
	128 µg	-	-

*Serratia* sp. JM은 tetracycline과 streptomycin에 대해서는 내성을 가지고 있었으나, neomycin에는 약간의 내성만 나타났다. 비교 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 tetracycline에 대해서는 내성을 가지고 있었으나, kanamycin에는 약한 내성이 나타났다. 또한 *Serratia* sp. JM과 *Serratia marcescens* ATCC 27117은 ampicillin과 chloramphenicol에는 각각 내성이 나타나지 않았다. 이들 균주의 항생제 내성의 차이는 앞으로 chitinase를 대량 생산하기 위하여 필요한 gene cloning의 기초적인 자료를 제시함에 있어 중요한 실험적 지표가 될 것이다.

배양액의 초기 pH에 따른 세포 성장 및 chitinase 생성

세포 성장에 따른 chitinase 생성과 최적 pH를 알아보기 위하여 멸균된 0.5 N-NaOH와 0.5 N-HCl를 사용하여 배양액의 초기 pH를 3.0~10.0으로 조절하고 1.5% colloidal chitin이 포함된 분리용 액상 배지에 종 배양액 1.2% (v/v)를 접종하고 30°C에서 3일간 진탕 배양한 다음 초기 pH에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 나타난 것처럼 *Serratia* sp. JM은 pH 6~7 사이에서 세포 성장이 우수하였고 최적 pH는 6으로 나타났다. 이는 일반적으로 *Serratia marcescens*는 Bergey's manual of systematic bacteriology(19) 및 Monreal과 Reese(8)가 보고한 세포 성장의 최적 pH 7.5보다는 산성 경향을 띠었다. 또한 Fig. 2에

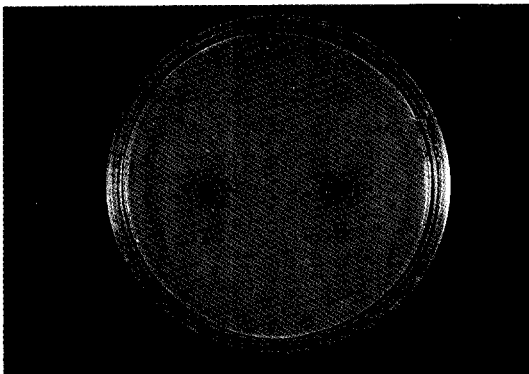


Fig. 1. Formation of clear zone(▶) by *Serratia*. *Serratia* was cultured at 30°C for 5 days containing 1.2% chitin medium. (A): *Serratia* sp. JM. (B): *Serratia marcescens* ATCC 27117.

유기물 동화는 거의 유사한 양상을 보여주었다. 또한 항생제 내성을 조사하여 Table 3에 나타난 결과

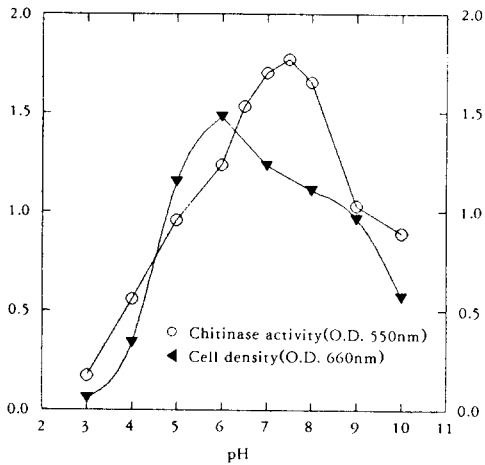


Fig. 2. Effect of initial pH on the chitinase activity(○) and cell density(▼). *Serratia* sp. JM. was cultured by the shaking incubator at 30°C for 3 days.

나타낸 바와 같이 chitinase 생성은 pH 7~8 사이에서 최대 생성을 보여 주었고 최적 chitinase 생성 pH는 7.5로 나타났다.

이의 결과는 McCormack 등(24)이 보고한 *Talaromyces emersonii*의 최대 chitinase 생성은 pH 5.0~5.5보다는 염기성이었으나 Monreal와 Reese (8)가 *Serratia marcescens*, Joshi 등(16)이 *Streptomyces*을 이용한 최적 chitinase 생성 pH는 7.7과 8이라는 보고와 유사함을 보여주었다.

#### 온도에 따른 세포 성장 및 Chitinase 생성

Chitin은 미생물에 의해 분해되는 과정에서 chitinase가 생성되므로 배양 온도에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 1.5% chitin이 포함된 분리용 액상 배지에 종 배양액 1.2%(v/v)를 접종하고 초기 pH를 7로 조절한 다음 20°C~37°C 사이를 적절한 간격으로 조절하여 3일간 진탕 배양한 다음 배양 온도에 따른 세포 성장과 chitinase 생성을 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에 나타난 것처럼 *Serratia* sp. JM은 30°C~37°C에서 세포 성장이 우수하였고, 최적 배양 온도는 30°C로 나타났다. 이의 결과는 *Serratia marcescens*는 Bergey's manual of systematic bacteriology(19)에 제안한 바와 같이 최적 배양 온도가 30°C라는 보고와 일치하고 있다. 또한 *Serratia* sp. JM의 chitinase 생성에 있어서 배양 온도의 영향은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 최대 chitinase

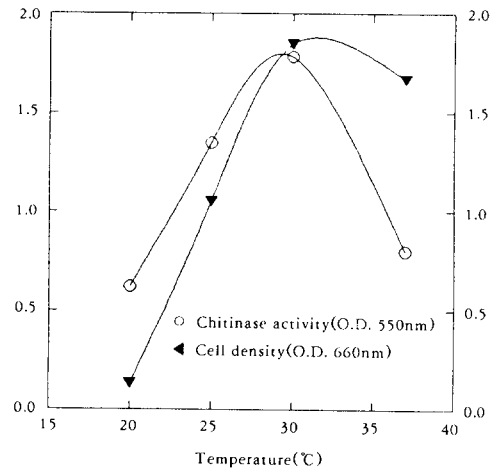


Fig. 3. Effect of temperature on the chitinase activity(○) and cell density(▼). *Serratia* sp. JM. was cultured by the shaking incubator at pH 7 for 3 days.

생성은 25°C~35°C 사이이고 최적 chitinase 생성 온도는 30°C로 나타났다. 이는 Monreal와 Reese (8)가 *Serratia marcescens* 최적 chitinase 생성 온도는 30°C라는 보고와 일치하고 있다.

#### 배양 시간에 따른 세포 성장과 Chitinase 생성에 따른 pH 변화

자연 생태계에 존재하는 대부분 chitin은  $\alpha$ -chitin으로 분자 사이에 강력한 수소결합을 가지며 결정관 구조로 물에 녹지 않기 때문에 액상 배지에서 대부분 부유 상태로 존재하게 된다. 따라서 세포 성장에 관한 순수 흡광도에 의한 균체량 측정이 불가능하기 때문에 colloidal chitin을 제거한 후 단백질 양으로 균의 성장을 확인한다.

5 l 용량의 발효조에 1.5% colloidal chitin이 포함된 3 l의 분리용 배지에 넣고 pH 7과 30°C에서 멸균 필터를 거친 공기를 2vvm으로 주입하면서 *Serratia* sp. JM의 배양 시간에 따른 성장곡선과 chitinase 생성 및 pH 변화를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에 나타난 것처럼 *Serratia* sp. JM의 균의 성장은 배양 24~48시간에 대수 성장기에 이르러 급격하게 증가하였으나 분리 균주에 의해 chitinase 생성은 거의 나타나지 않았다. 그러나 배양 120시간까지는 chitinase 생성은 급격한 증가를 보였으나 균의 성장은 96시간에 정상기에 도달하였다. 배양 96시

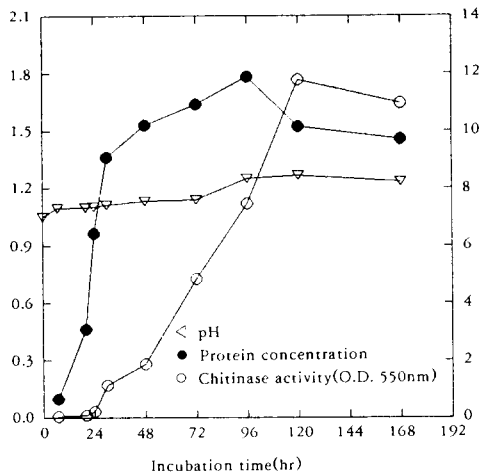


Fig. 4. Time course of the chitinase activity( $\circ$ ), protein concentration( $\bullet$ ) and change of pH( $\triangle$ ). *Serratia* sp. JM. was cultured by the fermenter at pH 7.0 and 30°C for 7 days.

간 이후 균의 성장은 사멸기에 도달하였으나, chitinase 생성은 배양 120시간 이후 점차로 감소되었고, 배양 최종 단계에 도달하면 *Serratia* sp. JM에 의해 chitin이 분해되어 colloidal chitin 입자 크기가 크게 감소되었음을 확인할 수 있었다. 이는 Roberts와 Selitrennikoff(12) 및 Cabib(14)가 보고한 *Serratia marcescens*에 의한 최대 chitinase 생성 244시간 최대 세포 성장 196시간, Monreal과 Reese(8)가 보고한 *Serratia marcescens* 최대 chitinase 생성인 144시간보다 단축된 경향을 나타내었다. 또한 배양 시간의 경과에 따른 pH 변화는 초기 pH 7에서 120시간까지는 pH가 점차 증가하다가 120시간 이후 pH는 다시 감소하고 있음을 보여 주었다. 배양 초기 pH가 약간 증가하다가 이후 pH가 감소한 이유는 colloidal chitin을 포함한 성장 배지 내에서 *Serratia* sp. JM이 acid과 ammonia를 생성하기 때문이다. 즉 *Serratia* sp. JM이 colloidal chitin을 deacetylase하기 때문에 colloidal chitin으로부터 acetic acid가 방출되어 pH 변화를 가져오게 된다. 이는 McCormack 등(24)과 Monreal과 Reese(8)가 보고한 결과와 유사함을 알 수 있다. 한편 *Serratia* sp. JM은 chitin을 분리용 배지에 첨가하지 않을 경우 chitinase 생성이 없었으므로 *Serratia* sp. JM이 생산하는 chitinase는 inducible enzyme임을 알 수 있

었다. 이는 Berger와 Reynolds(25) 및 Skujins 등(17)의 *Streptomyces*나 Yabuki 등(18)은 *Aeromonas*가 생산하는 chitinase는 유도 효소라는 보고와 일치하고 있다.

## 요 약

전남 범성포 해안의 갯벌 시료로부터 chitinase 생성 균주를 분리하였으며, 분리된 균주 중에서 chitinase 생성능이 우수한 JM을 선발 동정하여 *Serratia* sp. JM으로 명명하였다. *Serratia* sp. JM은 nutrient 배지나 MacConkey 배지에서 prodigiosin 색소를 생성하며, 정제 chitin이 포함된 한천 배지에서는 chitinase 생성에 따른 clear zone 형성이 확인되었다. *Serratia* sp. JM은 형태적, 생리·생화학적 특성과 유기물 동화는 succinic, urea 및 pyruvic 산을 제외하고는 공시 균주인 *Serratia marcescens* ATCC 27117과 유사하였으며, tetracycline에 대해서는 항생제에 대한 내성을 가지고 있었으나, kanamycin과 chloramphenicol에 대해서는 내성을 가지지 않았다. *Serratia* sp. JM의 chitinase 생성에 따른 최적온도와 pH는 30°C와 7.5로 나타났다. *Serratia* sp. JM은 120시간까지는 배양 시간이 증가함에 따라 chitinase 생성과 pH는 점차 증가하였으나, 배양 120시간 이후에는 chitin 분해에 따른 acetic acid의 축적에 따라 chitinase 생성과 pH는 감소하였다.

## 참고문헌

1. J. P. Zakikas(1984), *Chitin, Chitosan and Related enzymes*, Academic Press, London.
2. M. E. Young, R. L. Bell and P. A. Carrod (1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 769.
3. T. Tsukamoto and D. Koga(1984), *Agri. Bio. Chem.*, **48**, 931.
4. A. T. Wortman, C. C. Somerville and R. R. Colwell(1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 142.
5. I. P. Chang and T. Kommedahl(1968), *Phytopathology*, **58**, 1359.
6. A. Sivan and I. Chet(1989), *J. Microbiol.*, **135**, 675.
7. M. P. Silverman and E. F. Munoz(1973), *J. Bacteriol.*, **114**, 990.

8. J. Monreal and E. T. Reese(1968), *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689.
9. A. Ordentlich, Y. Elad and I. Chet(1987), *Soil Biol. Biochem.*, **19**, 747.
10. R. L. Fuchs, S. A. McPherson and D. J. Drahos(1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 504.
11. R. A. Tom and P. A. Carroad(1981), *J. Food Sci.*, **46**, 646.
12. W. K. Rovers and C. P. Selitrennikoff (1988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 169.
13. J. Skujins, J. J. Potgieter and M. Alexander (1965), *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 358.
14. C. P. Cabib(1985), *Adv. Enzymol.*, **59**, 57.
15. C. Jeuniaux(1961), *Nature*, **192**, 135.
16. S. Joshi, M. Kozlowski, S. Richens and D. M. Comberbach(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 289.
17. J. Skujins, A. Pukite and A. D. Melaren (1970), *Enzymology*, **39**, 353.
18. M. Yabuki, K. Mizushima, T. Amatatsu K. Takayama, A. Ando and T. Fujii(1986), *J. Gen. App. Microbiol.*, **32**, 23.
19. N. R. Krieg and J. G. Holt(1984), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Willarms & Wilkins, Baltimore.
20. C. H. Collins and P. M. Lyne(1984), *Microbiological method*, 5rd ed., Butterworths, London.
21. O. H. Lowry, N. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall(1951), *J. Bio. Chem.*, **193**, 265.
22. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
23. S. A. Dauenhauer, R. A. Hull and R. P. Williamo(1984), *J. Bacteriol.*, **158**, 1128.
24. J. McCormack, J. J. Thomas, G. T. Maria and P. C. Michael(1991), *Biotechnol. Lett.*, **13**, 677.
25. L. R. Berger and D. M. Reynolds(1968), *Biochem. Biophys. Acta.*, **29**, 522.