

Chitinolytic Enzyme을 이용한 N-acetyl- β -D-glucosamine의 최적생산

이 천 우 · 이 은 영 · 장 상 목 · † 김 광
동아대학교 화학공학과

Optimal Production of N-acetyl- β -D-glucosamine Using Chitinolytic Enzyme

Cheon Woo Lee, Eun Young Lee, Sang Mok Chang, and Kwang Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

ABSTRACT

The bacterium *Serratia marcescens* QM B1466 produces selectively large amount of chitinolytic enzymes (about 1mg/L medium). Enzymatic hydrolysis of chitin to N-acetyl- β -D-glucosamine (NAG) is performed by a system consisting of two hydrolases: chitinase and chitobiase. Objectives of this study included optimization of a microbial host by using chitin particles for chitinase/chitobiase production and secretion and also development of batch fermentation system for high cell density cultivation of *S. marcescens* QM B1466. Also, the influence of chitin source and carboxymethyl (CM) chitin on chitinase/chitobiase production and NAG production was investigated. When carboxymethyl chitin was substituted for colloidal and practical grade chitin, the chitinase activity was increased about 7~10U/mL. In this case, the ratio of chitinase/chitobiase was 30.03U/3.44U (9:1). The highest amounts of NAG (3.0g/L) was obtained.

서 론

Chitin은 N-acetyl- β -D-glucosamine (NAG)이 분지없이 β -1,4로 결합한 천연 고분자 중합체이며, cellulose와 같은 방향성 미세섬유로서 특이한 공간적 배열로 결정화된 다당류이다(1). Chitin은 절지동물의 외골격과 곰팡이의 세포벽에 존재하며(2-3), 게, 새우, 및 가재 등의 갑각류 폐기물 중에서 칼슘염과 단백질을 제거하여 얻을 수 있으므로 공업적 소재로는 매우 유용한 자원이 된다(4-5). 그러나 chitin은 분자내에 강한 결정구조로 인한 낮은 반응성 때문에 용도 개발이 늦어져 왔다(6-8). 이러한

결정구조를 분해하기 위한 아실화와 알킬화 등 화학 조작에 의해서 수용성 chitin 유도체를 제조하는 연구가 행해지고 있다(9-17). Chitin과 chitin 유도체들은 감염에 대한 항원제(18-19), 혈액 응고제(20-23), 상처 치료 촉진제(24) 등의 의약 분야(25-30), 생화학분야, 화장품(31-32), 섬유(33-34), 식품(35-37), 분리막(38) 및 폐수 처리 응집제(39) 등의 여러 분야에서 응용되고 있다.

일반적으로 chitin의 구성단위인 NAG는 D-glucosamine을 원료로 하여 아세틸화 반응에 의해 화학적으로 합성되고 있으며, 비피더스균의 증식인자로 알려져 있다. 또 D-glucosamine의 산화에 의해서 생산되는 아미노산은 감미제, 조미제 및 의약품으로서 개발되고 있다(35). 그리고 chitin의 가수분

† Corresponding Author

해에 의한 NAG 생산은 산가수분해법보다는 효소적으로 가수분해하여 NAG를 생성하는 것이 매우 효율적인 방법임이 밝혀졌다(40).

Chitin 가수분해 효소는 곤충, 식물, 어류, 미생물 등에 존재하며, 각각 다른 생화학적 특성을 지니고 있는 것으로 알려져 있다(11).

Chitin을 NAG로 분해하는 데에는 chitinase (poly- β -1 \rightarrow 4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycanohydrolase, E.C.3.2.1.14)와 chitobiase (β -D-N-acetyl-glucosaminidase, E.C.3.2.1.30)의 상호작용이 필요하다(41-42).

Chitinase는 chitin 유도체인 CM-chitin, glycol-chitin, phosphoric acid-swollen chitin 및 chitosan acetate를 불규칙하게 분해하여, 결과적으로 chitobiose와 glucose를 생성하며, chitobiase는 chitobiose와 chitotriose를 NAG로 가수분해한다(43-49).

Serratia marcescens(50)와 *Streptomyces lividans*(51)와 같은 방선균 및 *Trichoderma harzianum*(52)과 같은 세균, *Myrothecium verrucaria*(53) 등의 곰팡이들이 세포외로 chitinase와 chitobiase를 분비하는 것으로 보고되고 있다. 그러나, 효소 생산 수준과 효소에 의한 chitin 가수분해 효율은 chitinase를 생성하는 미생물간에 다소 차이가 있으므로, NAG의 생산성 향상을 위한 미생물 선정은 중요하다. Chitin 분해효소를 생산하는 미생물 중 *S. marcescens* QM B1466은 비교적 높은 수준(약 1mg/L)으로 chitin 용해성 효소를 생성하는 것으로 밝혀졌으며(50), 생성된 chitinase들은 무정형과 결정형인 chitin의 가수분해에서 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다(51). 반면에 *S. lividans*와 *T. harzianum*에서 정제한 chitinase들은 chitin질을 천천히 가수분해하기 때문에 chitin의 물리·화학적 전처리가 추가적으로 필요하다(53).

따라서 본 연구에서는 갑각류 폐기물에 존재하는 chitin을 NAG로 가수분해하는데 필요한 chitinase와 chitobiase의 생성을 위해 다양한 chitin질을 탄소원으로 하여 *S. marcescens* QM B1466을 배양하였다. 그리고 chitinolytic enzyme인 chitinase와 chitobiose로부터 NAG를 생성하는 chitobiase에 대한 효소 조합비를 숙주세포량의 cell density 변화에 따라 고찰하고, 최대 NAG 생성량간의 관계를 연구하였다.

재료 및 방법

Chitin 소재와 전처리

Chitin은 practical 등급의 crab shell(Sigma Co.)을 구입하여, ball-mill한 후 180~250 μ m 크기의 입자만을 선별한 다음, 2N HCl로 산처리하여 crab shell 중의 석회질과 기타 무기물을 제거하고, 1N NaOH로 단백질을 제거하여 얻었다. 이 chitin 분말에 2% KMnO₄를 가하여 표백 처리를 하고, 1% oxalic acid하에서 잔존하는 KMnO₄와 MnO₂를 제거하였다. 원심 분리후 증류수, 에탄올, 에테르로 세척하고, 진공 건조하여 백색 분말 형태의 정제된 chitin을 얻었다. 정제 chitin 제조시 반응은 모두 상온에서 실행하였다(54-56).

기질제조

CM(carboxymethyl)-chitin은 균일반응과 불균일 반응의 두 가지 방법으로 제조하였다. 균일계에서의 제조는 정제된 chitin을 4 $^{\circ}$ C에서 40% NaOH 수용액에 77시간 반응시킨 뒤, 0 $^{\circ}$ C에서 sodium chloroacetate를 가하여 카르복시메틸화를 행하면 CM-chitin이 제조되는데, 이 CM-chitin을 흐르는 물에 5~6일간 투석하여 액상의 제품을 얻었다. 균일계에서 CM-chitin을 제조할 시에는 탈아세틸화를 막기 위해 모든 과정을 4 $^{\circ}$ C 이하에서 진행시켰다(57).

불균일계에서의 제조는 정제된 chitin을 115~120 $^{\circ}$ C에서 40% NaOH 수용액에 1시간 반응시키면 갈색용액의 상층부와 chitin 분말의 하층부로 나뉘어지는데, 하층부만을 취하여 0.2% SDS(sodium dodecyle sulfate)가 포함된 40% NaOH 수용액에서 교반시키면서 4 $^{\circ}$ C에서 16~20시간 숙성시켜 시럽형태를 형성시켰다. 이것을 -20 $^{\circ}$ C에서 16~20시간 얼려서 알칼리 chitin을 얻었다. 이 알칼리 chitin은 CM-chitin을 생성하기 위한 중간단계로서, 알칼리 chitin을 IPA(isopropanol)에서 현탁시킨 후, 알칼리 chitin과 IPA 혼합물이 중성이 될 때까지 monochloroacetic acid를 서서히 가해 카르복시메틸화를 행했다. 이 CM-chitin을 여과하고 에탄올과 물로 세척한 뒤, 교반하면서 아세톤을 흘려 보내서 흰색의 fiber 형태인 CM-chitin을 얻었다(58).

Colloidal chitin은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 정제된 chitin을 페이스트 상으로 만들기 위해 아세톤을 가하고, 이 페이스트상을 막자사발에서 저어주면서 5~10배의 진한 염산을 느끼게 가했다. 이 때 가수분해를 막기 위해 온도는 10~20 $^{\circ}$ C로 유지

시켰다. 수분후, 혼합물을 glass wool로 여과하여 시럽상 용액을 얻었다. 시럽상 용액은 격렬하게 교반시킨 50% 에탄올에 부어서 colloidal chitin으로 침전시켰다. 침전물 중 존재하는 과잉의 산과 알코올을 제거하기 위해 증류수로 중성까지 세척한 후, 흐르는 물에 투석하여 흰색 시럽형태의 colloidal chitin을 제조하였다(56).

균주 및 배지조성

Canada British Columbia University의 Biotechnology Laboratory에서 분양받은 *S. marcescens* QM B1466은 플라스크 배양으로 100mL 배지에서 30°C로 배양하였다. 배양 배지는 1% yeast extract, 2% pepton 및 2% glucose로 만들어진 YEPD 배지(Difco Co. Ltd)를 사용하였으며, 본 배양 배지에서는 0.05% yeast extract, 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.03% MgSO_4 , 0.136% KH_2PO_4 , 그리고, chitinolytic enzyme 생산을 위한 탄소원 1.5% chitin을 첨가하였다(59).

효소생산

0.8L의 working volume을 가진 1L 회분 발효조(Korea Fermentator Co. mk-250)에서 효소 생산을 최대화하기 위하여, chitin을 전처리하여 가수분해율을 높이고 숙주 세포양(mass)을 증가시켰다.

접종배지에서 16시간 배양한 것(성장곡선 측정 결과에 의한 최대 세포 밀도)을 균주의 seed 용액으로 동일한 배지에서 재배양 시간에 의한 세포 밀도 변화를 변수로 하여, 성장 곡선에서 유도기 기준 3시간, 대수기 6~16시간, 정지기 20시간, 사멸기인 24시간을 배양하여 세포 밀도의 변화에 따른 활성 변화를 조사하였고, 회분 발효를 위한 배양액에 균주 seed 용액 1%를 접종한 뒤, pH 8.5로 조절하여 250rpm, 30°C에서 8일간 회분 발효 후, 원심 분리(8000rpm, 20분)하여 조효소를 얻었다. 이때 효소 생성은 효소 활성으로 측정하였다.

NAG 생산

발효조에서 얻은 조효소 중 생산량이 최대인 것을 선택하여, 기질로 사용한 각 chitin 질(colloidal chitin 및 CM-chitin)의 소화조 내에서 효소반응시간에 대한 안정성과 효소의 활성, 그리고 각 chitinolytic enzyme의 chitinase와 chitobiase의 생성비의 변화에 따른 최대 NAG 생산량을 측정하였다.

단백질 측정

단백질 농도는 Folin-Lowry method를 이용하여 측정하였다(60). Shimadzu사의 UV-2101PC를 이용하여 595nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

Chitinase/chitobiase 활성측정

Chitinase 활성은 Reissig 등의 비색법에 따라 540nm에서 Micro Elisa Plate Reader(Bio Rad Co. USA.)를 사용하였는데(61-62), 8000rpm에서 20분간 원심분리하여 발효되지 않은 chitin 분말과 미생물로부터 분리한 효소를 κ -phosphate 완충용액으로 100배 희석하여 희석된 용액 10%와 colloidal chitin 10%, κ -phosphate 완충용액 80%를 함께 Effendorf tube에 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 끓는 물에 5분간 실활시킨 다음 원심분리(7500 rpm, 5분)하여 사용하였다. $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 와 DMAB(p-dimethyl aminobenzaldehyde)로서 발색시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1단위는 37°C에서 1시간 동안 NAG 1mg을 유리시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

Chitobiase 활성은 효소용액을 Tris-maleate 완충용액(pH 7.0)으로 희석하여 0.375M Na_2CO_3 에 의하여 PNP-NAG(p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosamine)에서 유리되는 PNP의 양을 450nm에서 측정하였다. 효소활성 1단위는 37°C에서 10분간 PNP 1 μ mol을 유리시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

Chitinolytic enzyme 생성에 미치는 chitin의 입자 크기와 세포밀도의 영향

Chitinolytic enzyme를 생성하기 위해, *S. marcescens* QM B1466의 회분 진탕 배양시, 배양기 내에 탄소원으로 chitin질(practical grade chitin; 결정성 chitin) 1.5%를 사용하였다. 이때, chitinolytic enzyme의 생산성을 높이기 위해 각 배양기마다 chitin의 입자 크기를 다르게 하여 8일간 배양하면서, 효소 활성을 측정하였는데, 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서, 미생물 배양에 의한 chitinolytic enzyme의 생성은 탄소원으로써 180~250 μ m 크기의 chitin 입자가 가장 적합하였다.

S. marcescens QM B1466을 16시간동안 배양한 seed 용액으로부터 3, 6, 9, 12, 16, 20 및 24시간 배양에 의하여 세포 밀도를 변화시킨 후, 180~250 μ m

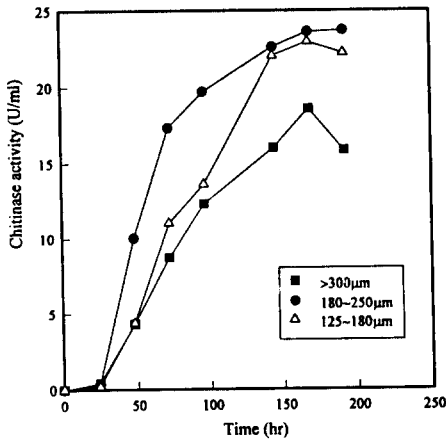


Fig. 1. Effect of chitin particle size on chitinase production for a batch fermentation of *S. marcescens* inducing with 1.5% chitin at early-stationary phase growth. 1L fermentation, 30°C.

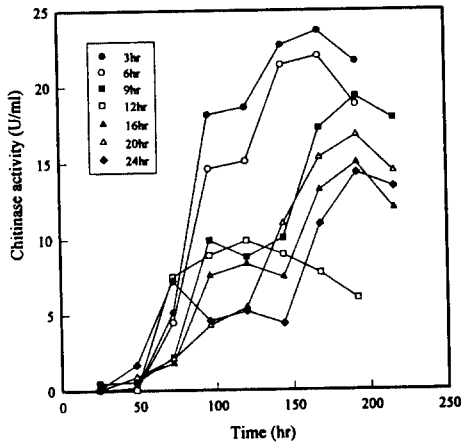


Fig. 2. Chitinase production for a batch fermentation using chitin(1.5%) as sole carbon source at various initial cell density. Parameter is pure culture time(3, 6, 9, 12, 16, 20, 24hr) before inoculation for a batch fermentation.

입자 크기의 chitin이 1.5% 포함된 액체 배지에 1% 접종하여, 회분발효조에서 9일간 발효기간에 초기의 세포 밀도 변화가 chitin 소화율에 미치는 영향을 chitinase 활성으로 측정된 결과를 Fig. 2에 나타

내었다.

3~24시간 배양에 의한 초기 세포 밀도 변화에 있어서 3시간과 6시간 배양한 초기 세포 밀도를 갖는 효소 활성이, 배양 7일째에 23.6U/mL, 22.0U/mL로 최대 활성을 나타내었고, 9, 12, 16, 20, 24시간 배양한 초기 세포 밀도의 발효조에서는 배양 8일째에 효소 활성이 19.3, 9.9, 14.9, 16.7, 14.3U/mL 이하로서 각각 낮은 효소 활성의 변화가 있었다.

따라서, 효소 생성을 위하여 탄소원인 glucose 대신에 chitin이 1.5% 함유된 발효조에 접종되는 *S. marcescens* QM B1466의 초기 세포 밀도 변화는 중요한 효소 생산 변수로서 작용될 수 있다. Fig. 2에 의하면 3시간 및 6시간 배양된 세포 밀도가 가장 높은 chitinase 활성으로서, 효율적인 효소 생성임을 알 수 있었다.

NAG 생성에 미치는 기질의 영향

S. marcescens QM B1466의 배양으로부터 생성된 chitinase 활성 측정은 효소 반응시간(incubation time)과 기질(colloidal chitin 및 결정성 chitin)의 함수가 될 수 있다. 조(crude) chitin 분해 효소는 chitin 분자 구조에 관계없이 가수분해의 활성을 갖는데 colloidal chitin은 대부분 빠르게 가수분해되고 결정성 chitin은 서서히 가수분해된다(50). 발효중에 생성되는 chitinase와 chitobiase는 한가지 이상의 효소가 존재하므로 NAG 생성 활성은 큰 차이를 갖게 된다.

그러므로 NAG 생성을 위한 기질의 선택은 중요한 인자가 되므로, chitin의 수용성 유도체인 CM(carboxymethyl)-chitin을 제조하여 기질로서의 수용성을 시도하였다. 수용성 유도체인 CM-chitin은 제조 방법에 따라 그의 물성변화(점도, 분자량)를 가지며 chitin 분해 효소와의 가수분해가 다르게 된다. 본 연구에서는 CM-chitin을 균일계 반응(water system)과 불균일계 반응(isopropanol system)으로 각각 제조하였다.

초기 세포 밀도를 3시간 순수 배양하여 얻고, 이것을 발효조에 1% 접종하고 180~250µm 입자 크기의 chitin(1.5%)을 탄소원으로 하여 7일간 발효한 후 조효소를 분리하였다. 이 조효소 0.1%와 균일계 및 불균일계에서 각각 제조된 수용성 CM-chitin을 0.04, 0.08, 0.1%의 농도 변화로써 기질로 사용하였으며 효소 반응시간을 함수로 하여 효소 활성을 측정하였다.

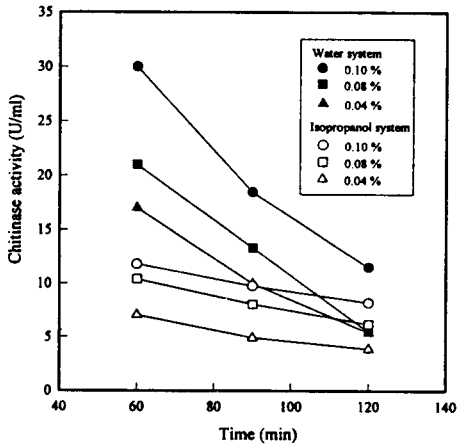


Fig. 3. Effects of hydrolysis and various concentration of CM-chitin on chitinase activities during incubation time. (T=37°C, pH=6.0)

Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 두 가지 기질 모두가 기질 농도가 낮을수록 효소 활성이 낮았으며, 균일계에서 제조된 CM-chitin이 효소 반응 시간이 60분 일 때 각 농도에서 2배 이상 높은 활성을 보였다. 효소 반응 시간에 따라 균일계의 CM-chitin(0.1%)은 급격히 감소되어 가수분해가 빠르게 진행됨을 알 수 있고, 불균일계의 CM-chitin은 가수분해가 완만하게 변화되었다. 이 결과에 의하면 균일계에서 제조된 CM-chitin을 기질 0.1%로서 사용함으로써 NAG 생성을 크게 증가시킬 수 있다.

따라서 CM-chitin, colloidal chitin, 결정성 chitin(practical grade)을 기질농도 0.1%로 하여 효소 반응 시간에 따른 효소 활성 변화와 NAG 생산성을 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4에서는, 효소 반응 시간이 증가됨에 따라 각각 CM-chitin, colloidal chitin, 결정성 chitin을 기질로 사용한 순으로 효소 활성이 감소하였다. CM-chitin 및 colloidal chitin은 1시간 효소 반응으로 급격히 감소되어 5시간 반응 후에는 NAG가 10.0 mg/L 및 4.0mg/L씩 각각 생성되었으나, 결정성 chitin은 5시간 반응 동안 효소 활성 2.0U/mL 변화에 의해 단지 2.0mg/L의 NAG를 생성하였다. NAG의 생성 속도는 CM-chitin은 $52.0\mu\text{g}/\text{U}\cdot\text{hr}$ 이고, colloidal chitin은 $29.8\mu\text{g}/\text{U}\cdot\text{hr}$ 로서 나타났으며, NAG 생성량은 CM-chitin이 colloidal chitin에 비해 2.5배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 또한 CM-

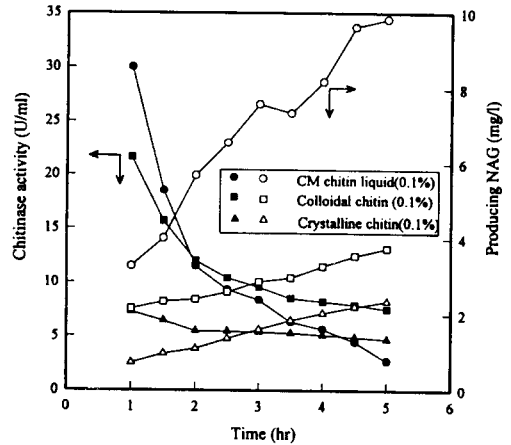


Fig. 4. Variation of chitinase and producing NAG with time during hydrolysis of chitin.(initial concentration of chitin : 0.1%)

chitin을 기질로 사용한 경우, NAG 생성량은 시간당 1.75mg/L로, 다른 chitin질들을 기질로 사용했을 때의 시간당 NAG 생성량인 0.5mg/L와 비교해보면 3배 이상 높았다.

그러므로 NAG 생성을 위해서는 CM-chitin을 기질로 사용하는 것이 가장 효율적임을 알 수 있었다.

Chitinase/chitobiase ratio에 따른 NAG 생성

Fig. 2에 의하면, *S. marcescens* QM B1466 기원의 chitinase는 발효 7~8일째에 그 활성이 최대를 나타내며, 초기 세포 밀도가 3시간 및 6시간 배양한 것이 다른 세포 밀도를 가졌을 때보다 훨씬 활성이 높았다.

Chitin은 chitinase에 의해 2당류(chitobiose) 이상으로 분해되며, chitobiase에 의해 단당류인 NAG로 분해된다(63). 따라서 총괄 chitinase의 활성뿐만 아니라, chitobiase의 활성을, chitinolytic enzyme 생성 기간 동안 측정하여 NAG 생성량과의 관계를 조사하고자 하였다.

S. marcescens QM B1466을 16시간 배양한 seed 용액에서 1% 접종하여, 3, 6 및 9시간 동안 각각 배양한 세포 밀도를 갖는 배양액을, chitin 1.5%가 포함된 배지에 1%씩 접종하여, 각 발효기에서 chitobiase 활성을 측정된 결과를 Fig. 5에 표시하였다.

Fig. 5에서는, 효소 생성 기간 7일째에 각각 효소

Table 1. NAG production according to the ratio of chitinase/chitobiase for chitinolytic enzyme production.

Enzyme Production Time[days]	Ratio and NAG[g/L]	Culture time(3hrs ^a)				Culture time(6hrs ^b)			
		CM-chitin ^c		Colloidal-chitin ^d		CM-chitin ^c		Colloidal-chitin ^d	
		Chitinase	NAG production	Chitinase	NAG production	Chitinase	NAG production	Chitinase	NAG production
		: Chitobiase	[g/L]	: Chitobiase	[g/L]	: Chitobiase	[g/L]	: Chitobiase	[g/L]
1	0 : 0	0	0 : 0	0	0 : 0	0	0 : 0	0	
2	0 : 0	0	0.1 : 0	0.02	4.0 : 1	0.05	0.5 : 0	0.01	
3	5.5 : 1	0.35	8.1 : 1	0.51	0.8 : 1	0.07	5.1 : 1	0.45	
4	6.7 : 1	1.91	6.4 : 1	1.82	6.1 : 1	1.72	5.2 : 1	1.46	
5	7.2 : 1	2.21	6.1 : 1	1.86	7.5 : 1	2.16	5.2 : 1	1.51	
6	7.5 : 1	2.30	7.2 : 1	2.27	5.6 : 1	2.43	4.9 : 1	2.14	
7	8.7 : 1	3.00	6.9 : 1	2.36	4.9 : 1	2.74	3.9 : 1	2.20	
8	6.3 : 1	1.70	8.0 : 1	2.16	3.4 : 1	1.59	4.0 : 1	1.88	

^a Initial cell density during culture time : 3hrs, ^b Initial cell density during culture time : 6hrs

^c CM-chitin (0.1%) by homogeneous reaction in water system, ^d Colloidal chitin (0.1%)

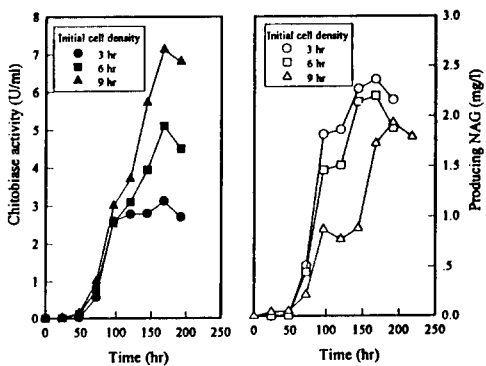


Fig. 5. Production of chitobiase activity and NAG in batch fermentation using chitin (1.5%) as sole carbon source at initial cell density.(3, 6, 9hr)

활성이 최대로 생성되었는데, Fig. 2에서 표시된 chitinase 활성과는 역순으로 나타났다. 초기 세포 밀도가 9시간일 때, chitobiase 활성이 3시간 및 6시간인 것에 비하여 각각 2배 및 1.4배 이상 높게 생성되었다.

NAG 생산성은, 초기 세포 밀도가 3, 6 및 9시간에서 발효 7일째에 각각 2.30mg/L, 2.20mg/L 및 1.97mg/L로 나타났다.

이 결과는 chitin의 가수분해에 관여하는 chitinolytic enzyme계는 chitinase와 chitobiase가 상호

작용하여 이루어지며, 이들의 활성비율이 가수분해의 최종 산물인 NAG 생성량에 영향을 미친다는 Table 1의 결과와 일치한다.

Table 1에서는 유도시기 3시간과 대수기 초기인 6시간 동안 각각 배양시킨 세포 밀도를 이용하여 chitin 효소 가수분해에 의한 chitinase와 chitobiase 생성 변화에 따른 NAG 생성을 표시하였다. 대수기 초기 6시간 배양된 균주를 이용하여 효소 생성을 할 때 chitinase와 chitobiase의 비가 5:1로 chitinase가 chitobiase에 비해 활성이 낮으므로 chitin의 구조에서 β-1,4 결합에 대한 임의의 분열이 원활하지 않아 chitobiase의 양이 적게 생성됨을 알 수 있었다. 또한 3시간 배양시킨 세포 밀도에 의한 효소 생성비 9:1에 비하여 chitobiase 효소생성이 2.17U/mL 더 높음에도 불구하고 NAG 생성량은 9% 낮은 결과로 나타났다. 자연계에서 곤충의 탈피시에 두 효소의 비가 6:1일 때 곤충의 겹질에 포함된 chitin을 가장 빨리 NAG로 분해한다는 보고(41)와는 차이를 보였다.

Monreal과 Reese의 방법에 의하면, colloidal chitin을 기질로 하여, 조효소와 반응하였을 때, NAG 생산량은 0.6g/L로 보고되었지만(50), Table 1에 나타낸 바와 같이 CM-chitin을 기질로 하였을 때의 NAG 생산량은 3.0g/L, colloidal chitin을 기질로 하였을 때에는 2.36g/L로 높게 나타났다.

이상의 결과에 따르면 세포 밀도가 seed 용액으로부터 접종하여 3시간 배양시킨 균주 활성이 효소 생

성에 적합하고, 균일계에서 제조된 수용성 chitin 유도체인 CM-chitin은 효율적인 NAG 생성을 위해 우수한 기질이 될 수 있음을 알 수 있다.

요 약

S. marcescens QM B1466 균주는 chitin 분해 효소(1mg/Lmedium)를 선택적으로 높게 생성시킬 수 있는 균주로서, chitin을 N-acetyl- β -D-glucosamine(NAG)으로 효소적 가수분해를 할 때 chitinase와 chitobiase의 두 가지 가수분해 효소계를 구성시킨다. 본 연구에서는 이 균주의 chitinase/chitobiase 생성을 위한 chitin 입자크기에 대한 최적화와, 회분 발효계에서 이 균주의 세포 밀도 배양에 따른 두 효소 생성의 변화를 조사하여 NAG 생산성의 증대를 시도하였다. 아울러, chitin과 CM-chitin이 chitinase/chitobiase 생성비와 NAG 생성에 미치는 영향을 검토하였는데, CM-chitin을 colloidal 및 결정성 chitin 대신에 사용했을 때, chitinase 활성을 약 7~10U/mL 증가시켰다. 이 경우에 있어서, chitinase/chitobiase의 비는 9:1로서 NAG의 생성량이 3.0g/L로서 높게 나타났다.

감 사

1996년도 동아대학교 학술연구조성비에 의한 연구논문입니다.

참 고 문 헌

- I. G. Cosio, R. A. Fisher, and P. A. Carrood (1982), *J. Food Sci.*, **47**, 901.
- J. P. Zikakis(1984), *Chitin, Chitosan, and Related Enzymes*, 1st ed., p. 155, Academic Press.
- E. Pennisi(1993), *Science News*, **144**, 72.
- N. Nishi, J. Noguchi, S. Tokura, and H. Shiota(1979), *Polym. J.*, **11**(1), 27.
- S. Tokura, N. Nishi, and J. Noguchi(1979), *Polym. J.*, **11**(11), 781.
- K. Sakurai(1990), *纖維と工業*, **46**(12), 553.
- S. Tokura, N. Nishi, and J. Noguchi(1979), *Polym. J.*, **11**(10), 781.
- K. Kaifu, N. Nishi, T. Komai, S. Tokura, and O. Somorin(1981), *Polym. J.*, **13**(3), 241.
- O. Somorin, N. Nishi, S. Tokura, and J. Noguchi(1979), *Polym. J.*, **11**(5), 391.
- N. Nishi, H. Ohnuma, and S. Nishimura (1982), *Polym. J.*, **14**(11), 919.
- 相羽誠一(1990), *纖維と工業*, **46**(12), 558.
- 栗田 惠輔(1991), *化學工業*, 10月, 765.
- S. Tokura, S. Nishimura, and N. Nishi(1983), *Polym. J.*, **15**(8), 597.
- R. Trujillo(1968), *Carbohydr. Res.*, **7**, 483.
- N. Nishi, S. Nishimura, A. Ebina, A. Tsutsumi, and S. Tokura(1984), *J. Biol. Macromol.*, **6**, 53.
- A. Tsutsumi, S. Sasajima, T. Hideshima, N. Nishi, and S. Nishimura(1986), *Polym. J.*, **18**(6), 509.
- K. Kurita, Y. Koyama, and A. Taniguchi (1986), *J. Appl. Polym. Sci.*, **31**, 1169.
- K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, I. Saiki, S. Tokura, and I. Azuma(1984), *Vaccine*, **2**, 93.
- K. Nishimura, C. Ishihara, S. Ukei, S. Tokura, and I. Azuma(1986), *Vaccine*, **4**, 151.
- S. Hirano, Y. Tanaka, M. Hasegawa, K. Tobetto, and A. Nishioka(1985), *Carbohydr. Res.*, **137**, 205.
- Y. Fujiwara and Z. Z. Kollid(1968), *Polym.*, **226**, 135.
- S. Nishimura and S. Tokura(1987), *J. Biol. Macromol.*, **9**, 225.
- R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, and M. Emanuelli(1984), *Carbohydr. Res.*, **126**, 225.
- H. D. Keith, F. J. Padden, N. M. Walter, and H. W. Wyckoff(1959), *J. Appl. Phys.*, **30**, 1485.
- 偏執者主(1989), *BIO INDUSTRY*, **6**(6), 456.
- B. H. Ryu and P. Greenspan(1995), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**(5), 525.
- K. Nishimura, S. Nishimura, N. Nishi, F. Numuta, Y. Tone, and I. Azuma(1985), *Vaccine*, **3**, 379.
- S. Nishimura, N. Nishi, and S. Tokura(1986), *Carbohydr. Res.*, **146**, 251.
- S. Nishimura, N. Nishi, and S. Tokura(1985), *J. Biol. Macromol.*, **7**, 100.
- R. J. Samuels and R. Y. Yee(1972), *J. Polym.*

- Sci., Part A-2*, **10**, 385.
31. 井爪 正人(1989), *BIO INDUSTRY*, **6**(7), 557.
 32. R. A. A. Muzzarelli(1988), Proc. Fourth Int. Conf., Chitin and Chitosan, p. 95, Trondheim, Norway.
 33. 栗田 惠輔(1981), *化学の領域*, **35**(12), 929.
 34. S. Tokura(1984), Proc. Fourth Int. Conf., Chitin and Chitosan, p. 45, Trondheim, Norway.
 35. 坂井 和男(1989), *New Food Industry*, **31**(6), 17.
 36. T. Tsugita and K. Sakamoto(1995), *Food Chem.*, **2**, 45.
 37. H. Okuda(1995), *Food Chem.*, **2**, 33.
 38. A. Peterlin and F. J. B. Calleja(1969), *J. App. Phys.*, **40**, 4238.
 39. 平野 茂博(1988), *化学*, **43**(3), 155.
 40. 鳥原 健三(1989), *BIO INDUSTRY*, **6**(8), 616.
 41. 古賀 大三(1990), *繊維と工業*, **46**(12), 581.
 42. J. P. Zikakis(1984), Chitin, Chitosan, and Related Enzymes, 1st ed., p. 155, Academic Press.
 43. E. Hultin(1955), *Acta. Chem. Scand*, **9**, 192.
 44. A. Otakara(1961), *Agric. Biol. Chem.*, **25**, 50.
 45. M. V. Tracey(1955), *Biochem. J.*, **61**, 579.
 46. G. Lundblad, M. Elander, and J. Lind(1976), *Acta. Chem. Scand.*, **B30**, 889.
 47. M. Charpentier and F. Percheron(1983), *Int. J. Biochem.*, **15**, 289.
 48. A. Otakara(1964), *Agric. Biol. Chem.*, **28**, 811.
 49. 古賀 大三(1990), *繊維と工業*, **46**(12), 581.
 50. J. Monreal and E. T. Reese(1969), *Can. J. Microbiol.*, **15**, 689.
 51. E. Neugebauer, G. Gamache, C. V. Déry, and R. Brzezinski(1991), *Arch. Microbiol.*, **156**, 192.
 52. C. J. Ulhoa and J. F. Peberdy(1992), *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 236.
 53. P. Vyas and M. V. Deshpande(1989), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **35**, 343.
 54. J. D. Reid and D. M. Ogyrdziak(1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(3), 664.
 55. R. H. Hackman(1954), *Australian J. Biol. Sci.*, **7**, 168.
 56. L. R. Berger and D. M. Reynolds(1958), *Biochem. et Biophys. Acta*, **29**, 522.
 57. T. Sannan, K. Kurita, and Y. Iwakura(1976), *Makromol. Chem.*, **177**, 3589.
 58. S. Tokura, N. Nishi, and A. Tsutsumi(1983), *Polym. J.*, **15**(6), 485.
 59. R. L. Roberts and E. Cabib(1982), *Anal. Biochem.*, **127**, 402.
 60. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall(1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
 61. J. L. Reissig, J. L. Strominger, and L. F. Leloir(1955), *J. Biol. Chem.*, **217**, 959.
 62. H. Mori, T. Yano, T. Kobayashi, and S. Shimizu(1979), *J. Chem. Eng. Jap.*, **12**, 313.
 63. R. A. A. Muzzarelli(1977), Chitin, p. 155, Pergamon Press.