

## 내열성 Chitinase 생산균주의 분리 및 효소생산 특성

홍범식 · 윤호근 · 신동훈 · 조홍연<sup>1\*</sup>

고려대학교 생명공학원, <sup>1</sup>고려대학교 생명공학원 및 연세대학교 생물산업소재연구소

**Isolation of Microorganism Producing Thermostable Chitinase and Some Cultural Characteristics for Chitinase Production. Bum-Shik Hong, Ho-Geun Yoon, Dong-Hoon Shin and Hong-Yon Cho<sup>1\*</sup>.** Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, <sup>1</sup>Graduate School of Biotechnology, Korea University and Bioproducts Research Center of Yonsei University, Seoul 120-749, Korea – A strain capable of producing thermostable chitinase suitable for chitooligosaccharide production was isolated from high temperature environment and identified as *Bacillus licheniformis*. The chitinase from *Bacillus licheniformis* KFB-C14 was only induced by addition of colloidal chitin into the basal medium as carbon source, showing the decrease of the chitinase production by supplemental addition of other carbon sources into the medium containing 1.0% colloidal chitin. Among organic and inorganic nitrogen sources, yeast extract was the most effective for the increase of total activity and specific activity, and had high affinity for the enzyme production. The optimum temperature of cell growth and thermostable chitinase production was 55°C. The optimum culture medium was composed of 1.2% colloidal chitin, 0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% yeast extract (pH 6.5). *Bacillus licheniformis* KFB-C14 produced the thermostable chitinase of 3.89 units per ml culture fluid and 7.4 units per mg protein under rotary shaking at 150 rpm for 40 hr.

최근 chitin과 그 유도체, chitin 올리고당들이 주목을 받게 된 것은 기존의 용도 이외 약리, 생리활성이 밝혀지면서 의약품이나 기능성 식품의 중간원료 소재로서 용도가 개발되고 있기 때문이다(1). Chitin의 용도 개발이 부진했던 원인은 불용성으로 취급이 곤란했던 점이었으나 아미노기의 높은 반응성과 위치선택성을 이용한 화학수식에 의해 다양한 유도체들이 합성되었고 chitin 분해법, 특히 효소를 이용한 분해와 합성법의 도입으로 chitin 올리고머를 조제할 수 있게 됨으로써 새로운 활성들이 알려지게 되었다. 현재까지 항콜레스테롤성, 항종양성, 면역부활작용, 지혈성, 궤양억제성 등의 성질을 이용하여 의약품 소재로, *Bifidobacterium* 생육 촉진성, 항균성, 유화성, 보수성 등은 식품첨가물이나 기능성식품 소재로 일부 실용화되었거나 제품화 단계에 있다(2-4).

Chitin은 N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc)이 β-1,4 결합으로 중합된 고분자 물질로 결정구조에 따라 α, β, γ 형으로 구분되나 갑각류의 껍질에 함유된 chitin을 비롯하여 천연에는 대부분 α 형으로 존재한다. 이들 chitin을 분해하는 효소에는 chitin의 N-acetyl-β-1,4-glucosamine linkage를 임의로 가수분해시켜, chitin 올리고당을 생산하는 endochitinase(EC 3.2.1.14), N,N'-diacetylchitobiose를 분해하는 chitobiase(EC 3.2.1.30), chitin의 비환원성 말단으로부터 chitobiose 또는 N-acetylglucosamine을 생산하는 exochitinase 등이 보고

되어 있다(4, 5). 또한 하나의 효소가 두 종류 이상의 반응성을 갖기도 하며, 최근에는 *Nocardia orientalis*(6), *Trichoderma reesei*(7), *Bacillus licheniformis*(8)로부터 높은 당전이 활성을 나타내는 효소들이 발견되고 있다.

본 연구에서는 효소적 방법에 의한 기능성 chitin 올리고당의 생산계 확립을 위해 공업적으로 유용할 뿐만 아니라 당전이 반응계에 적용이 용이한 내열성 chitinase를 생산하는 균주를 자연계의 고온환경으로부터 분리하고 효소생산과 관련된 일부 특성을 검토하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 생산균주의 분리 및 선별

자연계의 고온환경에서 분리한 1,120 균주의 호열성 미생물을 대상으로 기본배지인 1.0% colloidal chitin, 0.07% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 0.01% yeast extract가 함유된 1차 분리용 agar plate (pH 7.0)를 사용하여 55°C에서 투명한 생성주, 42주를 1차 분리한 후 이를 다시 동일한 방법으로 투명한이 크고 선명한 10균주를 2차로 분리하였다. 최종 균주의 분리는 기본배지와 기본배지에 질소원으로 0.3% NaNO<sub>3</sub> 또는 0.5% polypeptone을 각각 첨가한 배지들을 사용하여 55°C, 150 rpm에서 42시간 회전진탕 배양한 후 균체외로 분비된 효소의 비활성과 내열성, 효소반응에 의한 chitin 올리고당의 생성여부 등을 지표로 우수한 균주를 선별하였다. 효소의 내열성은 70°C에서 30분간 열처리한 조효소액의 잔존활성을 백분율로

\*Corresponding author.

Key words: Thermostable chitinase, *Bacillus licheniformis* KFB-C14, chitooligosaccharide

환산하였다.

### 선별균주의 동정

선별균주는 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(9)와 Priest 등(10)의 방법에 준하여 형태학적 관찰을, *Bacillus Biochemical Card*(VITEK SYSTEM)로 생리학적 특성을 각각 조사하여 동정하였다.

### Colloidal chitin의 조제

Lockwood(11) 방법을 변형하여 다음과 같이 조제하였다. Chitin(Practical grade, Sigma Co., St. Louis, MO) 40 g에 진한 염산 400 ml을 가하여 4°C에서 50분간 교반시킨 다음 염산을 여과, 제거하고 4°C 증류수 1 l를 첨가한 후 여과에 의해 얻은 침전물을 4 l의 증류수에서 1시간 교반시키고 여과액의 pH가 3.5 이상이 될 때까지 증류수로 수세, 여과하여 105°C에서 건조, 조제하였다.

### 배양방법 및 조효소액의 조제

효소생산을 위한 배양은 기본배지의 성분 중 colloidal chitin을 glycerol로 대체한 배지 5 ml을 시험관에서 16시간 증배양한 다음 500 ml baffled flask에 넣은 배지 100 ml에 증배양액 1%(v/v)를 접종한 후 55°C, 150 rpm에서 일정시간 동안 회전진탕 배양하였다.

조효소액은 flask 배양액을 원심분리(14,000×g, 30분)한 후 균체의 효소는 상등액 또는 상등액을 상법에 따라 80% 포화유산으로 침전시켜 얻은 농축효소액을 10,000배의 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)로 4°C에서 16시간 투석하여 조제하였으며 균체내 효소는 균체를 초음파 처리(19 KHz, 3분)한 후 원심분리(14,000×g, 30분)에 의해 얻은 상등액을 동일하게 투석하여 조제하였다.

### 효소활성 측정 및 단백질 정량

1.0% Chitin(Purified powder from crab shells, Sigma Co.) 용액 250 μl, 1.0M potassium phosphate buffer(pH 7.0) 50 μl, 효소액 및 물로 구성된 1 ml의 효소 반응계를 55°C water bath에서 30분 동안 진탕반응시킨 후 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리하여 얻은 상등액내 환원당의 양을 Miller의 방법(12)을 변형한 DNS법으로 정량하여 효소활성을 측정하였다. 효소활성단위는 표준반응계에서 1시간에 1 μmole의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

단백질은 표준물질로서 bovine serum albumin을 사용, Lowry(13)등의 방법에 의해 정량하였다.

### Chitooligosaccharide의 HPLC 분석

농축한 조효소액(5 mg/ml) 700 μl, 20% colloidal chitin 용액 250 μl, 1.0M potassium phosphate buffer(pH

7.0) 50 μl로 구성된 효소 반응계에 0.01% NaN<sub>3</sub>를 첨가하고 일정시간 동안 상기와 같이 반응시켜 조제한 상등액을 HPLC(Waters Co., USA)의 YMC-pack polyamine II column(YMC Co.)에 주입하고 acetonitrile과 물(75 : 25)로 용출시킨 후 M410 RI detector(Waters Co., USA)로 chitooligosaccharide를 검정하였다. 표준 시료는 N-acetyl-D-glucosamine, chitobiose(이상 Sigma Co.), chitotriose, chitotetraose, chitopentaose, chitohexaose(이상 Seikagaku Co., Tokyo)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 생산균주의 선별

내열성 chitinase의 생산능이 우수한 균주를 선별하기 위해 1, 2차에 걸쳐 투명한 크기에 따라 분리한 후 기본배지와 무기태 질소원인 NaNO<sub>3</sub> 또는 유기태 질소원인 polypeptone을 첨가한 기본배지들을 사용하여 배양액내로 분비된 효소의 생산능, 비활성, 내열성 및 반응성을 검토하였다(Table 1). 대상균주들의 효소생산능은 무첨가, NaNO<sub>3</sub>, polypeptone의 순으로 높았고 polypeptone 첨가에 의해 KFB-C20의 경우 73%까지 생산성이 증가되었으나 이들 질소원의 첨가에 의해 최대생산균주인 KFB-C14보다 높은 생산능을 보인 균주는 선별할 수 없었다. 한편 효소정제 용이도의 간접적 지표인 비활성을 조사한 결과 polypeptone, NaNO<sub>3</sub>, 무첨가의 순으로 높았고 효소생산능과는 달리 균주별 또는 배지별로 크게 비활성이 증감되는 현상은 관찰되지 않았다. 대상균주들이 생산하는 효소의 내열성은 70°C에서 30분간 처리시 80% 이상의 잔존활성을 나타냄으로써 비교적 높은 안정성을 나타내었다. 본 연구의 핵심인 chitin 올리고당의 생성여부를 분리균주들의 농축 조효소액을 사용하여 48시간 동안 반응시키면서 시간에 따라 측정된 결과 대상균주 모두가 (GlcNAc)<sub>1</sub>을, KFB-C06, KFB-C14, KFB-C35, KFB-C36은 (GlcNAc)<sub>2</sub>를 동시에 생성함을 알 수 있었다. 대부분 반응 30분 후부터 해당 당들은 생성되었으며 이들이 단일효소의 주반응과 부반응에 의한 활성인지의 여부와 두 종류 이상의 효소에 의한 활성인지는 조효소의 상태에서 확인할 수 없었다. 이상의 결과들로부터 3종류의 배지에서 모두 효소의 생산능과 비활성이 우수하고 내열성도 높으며 (GlcNAc)<sub>2</sub>를 생성하는 KFB-C14 균주를 최종균주로 선별하였다.

### 선별균주의 동정

선별균주 KFB-C14를 nutrient broth에서 정지기와 대수기 중기인 12시간까지 회전진탕배양하여 얻은 균체를 상법에 따라 광학현미경과 전자현미경(JEM 100 CX-II)으로 관찰한 결과 폭 0.7 μm, 길이가 2.9 μm인 간균으로 포자를 형성하는 Gram 양성균으로 밝혀졌다

Table 1. Distribution of thermostable chitinase in isolated strains

Strain	Medium I <sup>1)</sup>		Medium II <sup>2)</sup>		Medium III <sup>3)</sup>		Thermo-stability <sup>4)</sup> (%)	Product <sup>5)</sup>
	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)		
KFB-C04	0.93	2.32	0.99	2.25	1.03	2.03	72	(GlcNAc) <sub>1</sub>
KFB-C06	1.27	3.16	1.35	3.07	1.47	2.81	81	(GlcNAc) <sub>1</sub> , (GlcNAc) <sub>2</sub>
KFB-C11	0.51	1.28	0.83	1.88	0.85	1.04	90	(GlcNAc) <sub>1</sub>
KFB-C14	1.72	4.21	1.77	4.04	1.93	3.98	86	(GlcNAc) <sub>1</sub> , (GlcNAc) <sub>2</sub>
KFB-C20	0.39	0.94	0.62	1.43	0.68	0.72	88	(GlcNAc) <sub>1</sub>
KFB-C23	0.59	1.45	0.65	1.49	0.76	1.26	93	(GlcNAc) <sub>1</sub>
KFB-C29	1.55	3.82	1.51	3.45	1.66	3.23	75	(GlcNAc) <sub>1</sub>
KFB-C35	0.84	2.10	0.98	2.23	1.13	1.99	87	(GlcNAc) <sub>1</sub> , (GlcNAc) <sub>2</sub>
KFB-C36	1.06	2.63	1.15	2.60	1.21	2.26	84	(GlcNAc) <sub>1</sub> , (GlcNAc) <sub>2</sub>
KFB-C41	0.43	1.08	0.55	1.24	0.63	0.94	80	(GlcNAc) <sub>1</sub>

<sup>1)</sup> Basal medium. <sup>2)</sup> Basal medium + 0.3% NaNO<sub>3</sub>. <sup>3)</sup> Basal medium + 0.5% polypeptone. <sup>4)</sup> After the crude enzyme was incubated at 70°C for 30 min, the residual enzyme activity was measured under the standard assay conditions. <sup>5)</sup> Product was analyzed with HPLC as described under "Material and Methods".

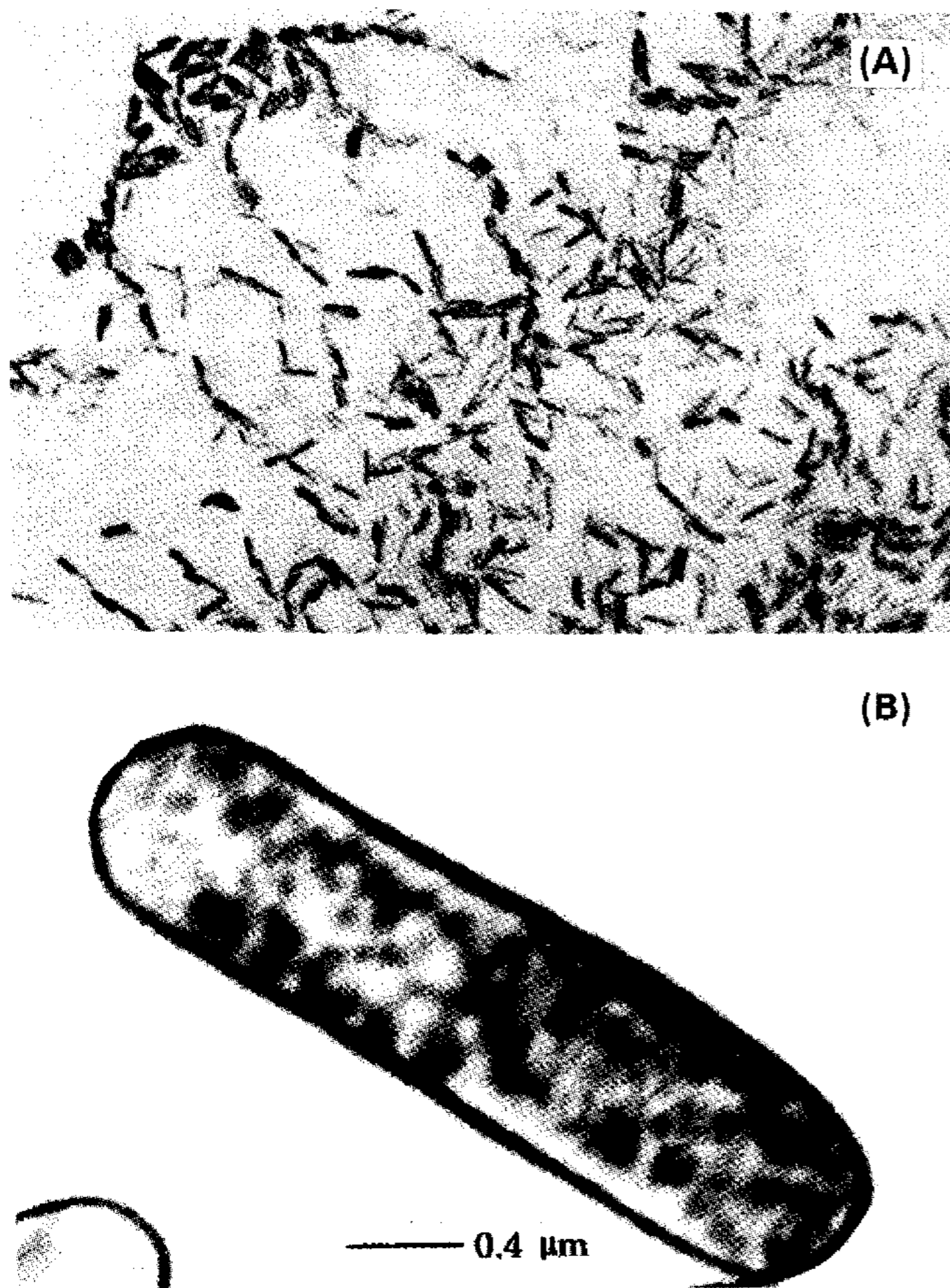


Fig. 1. Light (A) and transmission electron micrograph (B) of isolated strain KFB-C14.

Cells were harvested at stationary phase (A,  $\times 1,000$ ) and at middle log phase (B,  $\times 20,000$ ).

(Fig. 1). 생리, 생화학적 특성을 "VITEK SYSTEM"의 Biochemical Card를 사용하여 조사한 후(Table 2) VITEK Computer Program에 의해 분석한 결과 선별균주 KFB-C14는 *Bacillus licheniformis*일 확률이 99.0%이었다. Chitinase를 생산하는 세균에는 *Pseudomonas*(14), *Aeromonas*(15), *Serratia*(16), *Vibrio*(17), *Acintobacter*(18), *Bacillus*(8, 19), *Streptomyces*(20, 21) 등이 있으나 본 효소를 생산하는 호열성 세균에 관하여는 아직 보고된 바 없다.

#### 효소생산에 미치는 탄소원과 질소원의 영향

Chitinase는 전형적인 유도효소로 보고되어 있기 때문에 탄소원 및 유도제로 1% colloidal chitin이 함유된 기본배지에 1,4 결합을 갖는 다당류와 각종 탄소원을 0.5% 첨가한 후 효소생산능을 효소활성과 비활성으로 검토하였다. Table 3에서와 같이 탄소원의 첨가에 의해 효소생산은 감소되었으며 특히 chitin의 monomer인 *N*-acetyl-D-glucosamine은 약 80%의 생산능을 저하시킴으로써 본 효소는 효소반응산물에 의해 생합성이 억제되고 있음을 알 수 있었다. 억제도에 있어 1,4 결합으로 이루어진 다당류가 저분자의 탄소원들 보다,  $\beta$ -1,4 결합인 cellulose가  $\alpha$ -1,4 결합인 starch보다 낮은 억제도를 보였으며 chitosan의 첨가는 미미한 생산능의 증가를 나타내었다. 한편 기본배지에 첨가한 질소원이 효소생산에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 4), 효소활성은 모두 증가되었고 무기질소원에 비해 유기질소원의 경우가 우수하였으나 비활성은 무기질소원이 기

**Table 2. Morphological and biochemical characteristics of isolated strain KFB-C14**

	KFB-C14	<i>Bacillus licheniformis</i>
Morphological characteristics		
Size(μm)	0.7×2.9 μm	0.6~0.8×1.5~3 μm
Shape	Rod (straigh)	Rod
Gram stain	+	+
Colony color	White	Opaque, White
Endospore forming	+	+
Biochemical characteristics		
Utilization of carbohydrate		
Sucrose	+	+
Tagatose	+	+
Glucose	+	+
Inositol	+	+
Galactose	-	+
Arabinose	+	±
Xylose	+	+
Mannitol	+	+
Maltose	+	+
Salicin	+	+
Amygdalin	+	+
Sorbitol	+	+
N-Acetyl-D-glucosamine	+	+
Fermentation in the presence of specific inhibitor		
Potassium thiocyanate	+	
Mandelic acid	+	
Oleandomycin	+	
Nalidixic acid	+	
Polyamidohygrostepin	+	
Fermentation of glucose in the 7% NaCl		
	+	+
Utilization of acetate		
Sodium acetate	+	+
Hydrolysis in the presence of an iron salts		
Esculin	+	+

본배지와 유사한 값을 나타낸 반면 유기질소원은 낮은 값을 나타내었다. 그러나 growth factor의 기능을 함께 갖는 yeast extract는 활성과 비활성을 각각 2.2배, 1.6배 증가시켰을 뿐만 아니라 높은 균체생육을 나타내었고 soybean meal도 높은 활성을 보임으로써 공업적 생산시 yeast extract의 대체기질로 이용될 수 있음을 보였다. 이상의 결과들은 Shin(18), Yabuki(15) 등의 보고와 같이 본 효소가 최종 분해산물에 의해 feed back repression을 받음을 알 수 있었으며 질소원은 정(22) 등의

**Table 3. Effect of supplemental addition of various carbon sources on thermostable chitinase production of *Bacillus licheniformis* KFB-C14**

Carbon source	Extracellular enzyme activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
Basal medium	1.72	4.21
Chitosan	1.79	4.28
Cellulose	1.04	2.65
Soluble starch	0.83	2.24
N-Acetyl-D-glucosamine	0.36	0.78
Glucose	0.40	0.86
Fructose	0.51	1.34
Galactose	0.58	1.22
Arabinose	0.63	1.24
Xylose	0.72	1.56
Sucrose	0.51	1.15
Lactose	0.65	1.39
Sorbitol	0.77	1.68
Inositol	0.89	2.03
Glycerol	0.66	1.42

Carbon sources of 0.5% were added to basal medium containing 1.0% colloidal chitin. Cultivation was carried out at 55°C for 42 hr.

**Table 4. Effect of various nitrogen sources on thermostable chitinase production of *Bacillus licheniformis* KFB-C14**

Nitrogen source	Extracellular enzyme activity (units/ml)	Specific activity (units/mg)
Basal medium	1.72	4.21
NaNO <sub>3</sub>	1.77	4.04
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.86	4.17
NH <sub>4</sub> Cl	1.82	4.13
Urea	1.94	3.94
Bactopeptone	2.16	3.90
Polypeptone	1.93	3.98
Tryptone	2.24	3.85
Casein	2.77	3.41
Soybean meal	3.21	3.36
Yeast extract	3.76	6.92

Inorganic nitrogen sources of 0.3% and organic nitrogen sources of 0.5% were added to basal medium containing 1.0% colloidal chitin as carbon source. Cultivation was carried out at 55°C for 42 hr.

보고와 달리 질소원의 첨가에 의해 효소생산능이 상승함을 보였고 yeast extract의 높은 효과는 호열성세균의 생육특성에 기인하는 것으로 추측되었다.

탄소원과 질소원으로 효과를 보인 colloidal chitin, yeast extract의 농도가 효소의 비활성에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). Colloidal chitin은 1.2%, yeast ext-

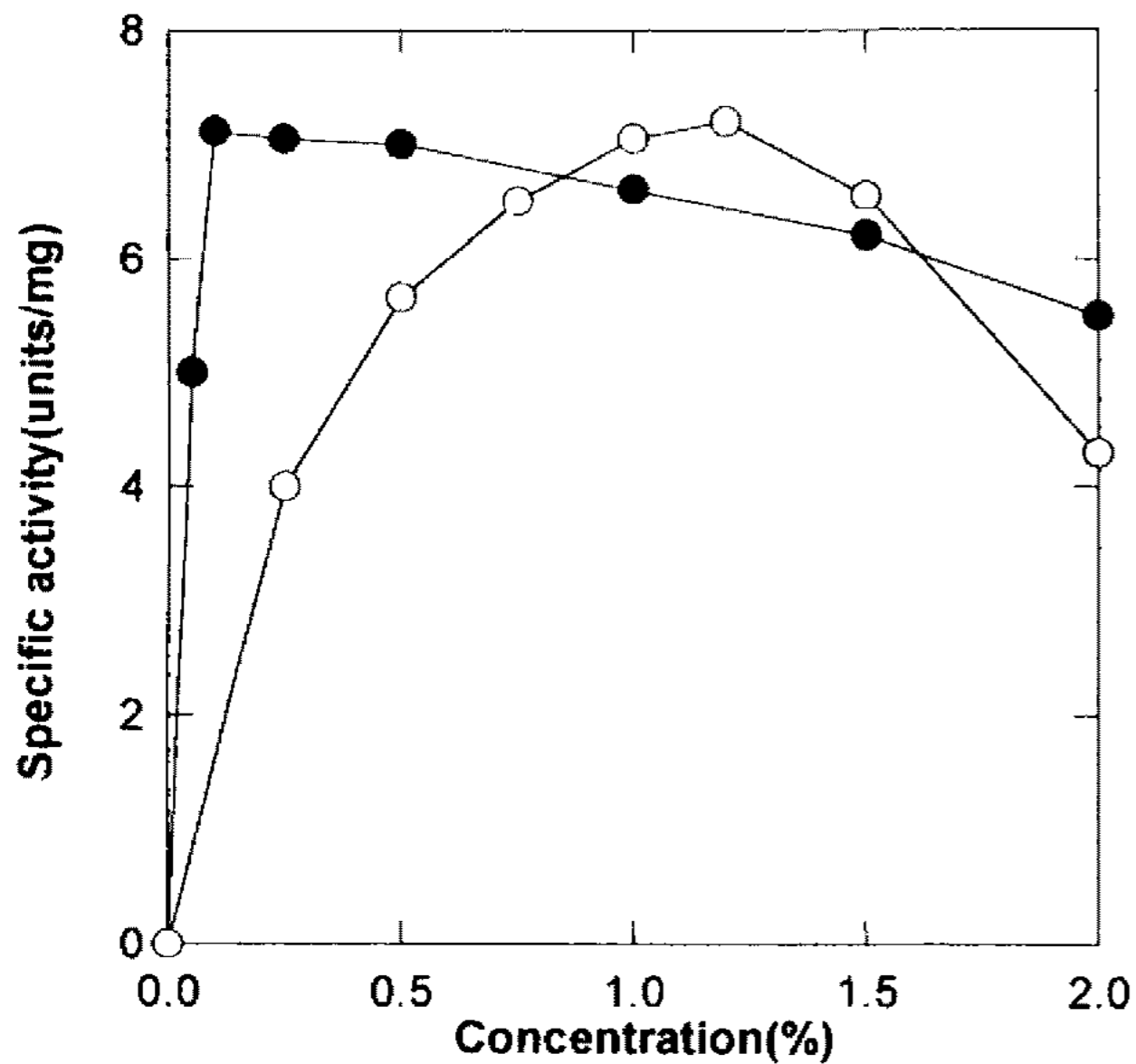


Fig. 2. Effect of colloidal chitin and yeast extract concentration on specific activity of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* KFB-C14.

Colloidal chitin (○) was added to the basal medium containing 0.1% yeast extract and yeast extract (●) to the medium containing 1.2% colloidal chitin as carbon source.

ract는 0.1% 첨가시 가장 높은 비활성을 나타내었으며 yeast extract는 효소생산을 위한 기질로서 높은 친화성을 나타냄으로써 고온배양시 생리적으로 단순한 질소원 이외의 기능을 갖음을 알 수 있었다. 또한 탄소원인 colloidal chitin은 높은 농도에서 급격한 비활성 저하를 보인 반면 yeast extract는 낮은 농도에서 높은 농도 의존성을 보이면서 기질포화곡선과 유사한 경향을 나타내었다.

유도제의 첨가시기와 효소생산의 변화

Fig. 3은 유도제인 colloidal chitin의 첨가시기가 효소생산에 미치는 영향을 검토하기 위해 배양초기, 대수기 중기, 대수기 말기 별로 첨가한 후 효소생산양식을 추적한 결과이다. 첨가시기가 늦을수록 효소의 최대생산에 시간이 소요되었으며 효소생산량 또한 현저히 저하되었다. 한편 탄소원으로 glycerol 1.0%가 함유된 기본배지에서 대수기 중기 또는 대수기 말기까지 배양한 후 0.5%의 colloidal chitin을 첨가한 경우 효소생산 최대치가 1.5 units/ml 이하의 낮은 값을 나타내었다 (Data 제시하지 않음). 이는 본 생산균주가 균의 노령화 이후에는 colloidal chitin의 자화율이 낮고 탄소원이 존재하는 환경에서는 효소합성이 거의 유도되지 않음을 보임으로써 colloidal chitin을 탄소원으로 첨가할 때 효소생산이 유도됨을 알 수 있었으며 이는 Table 3의 결과와 동일한 현상이었다.

균생육과 효소생산에 미치는 온도의 영향

내열성 chitinase 생산균주의 분리시 비교적 높은

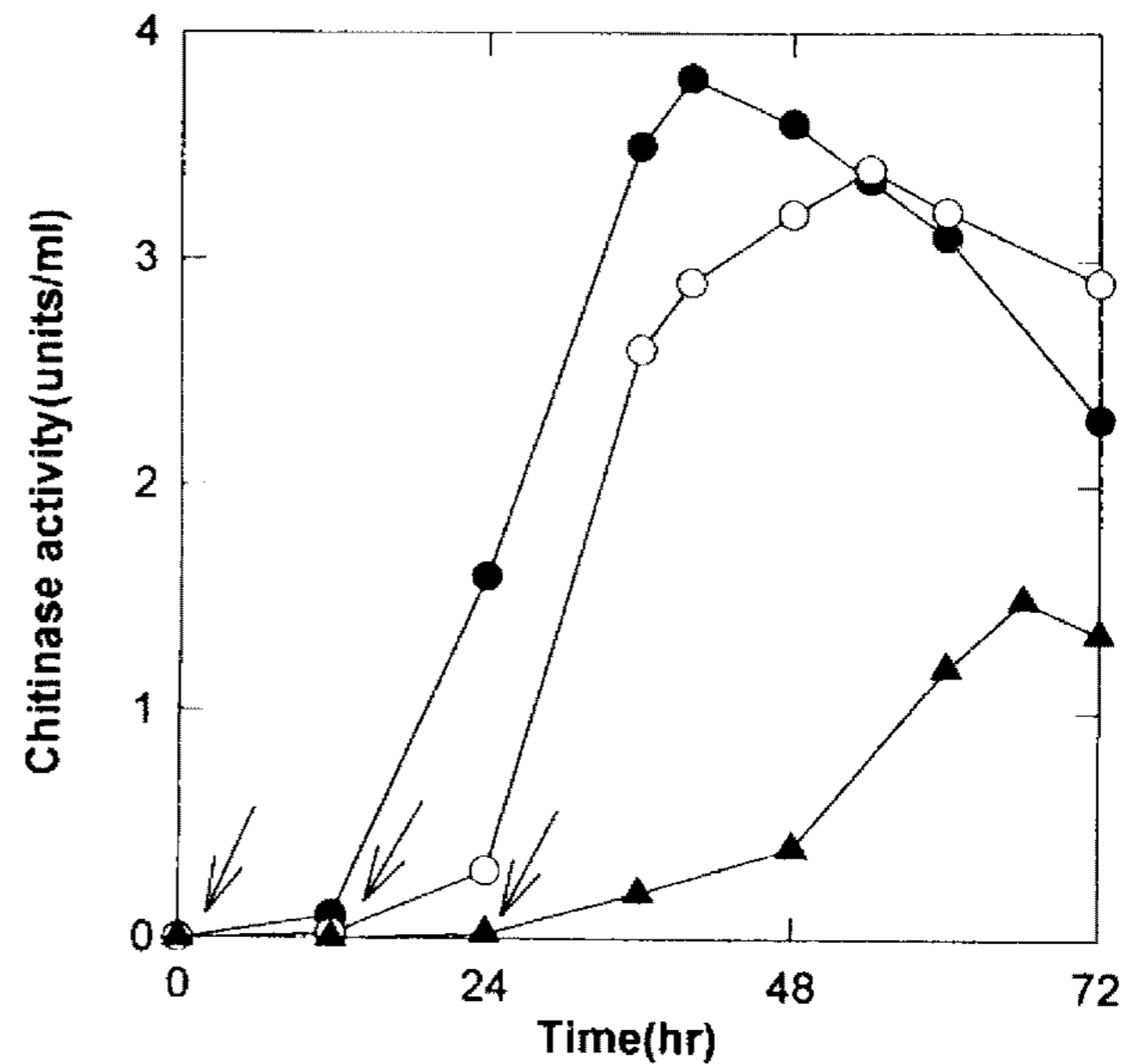


Fig. 3. Effect of addition time on induction and production of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* KFB-C14.

Colloidal chitin of 1.0% was added to the medium at 0 hr (●), 12 hr (○) and 24 hr (▲) after beginning of cultivation.

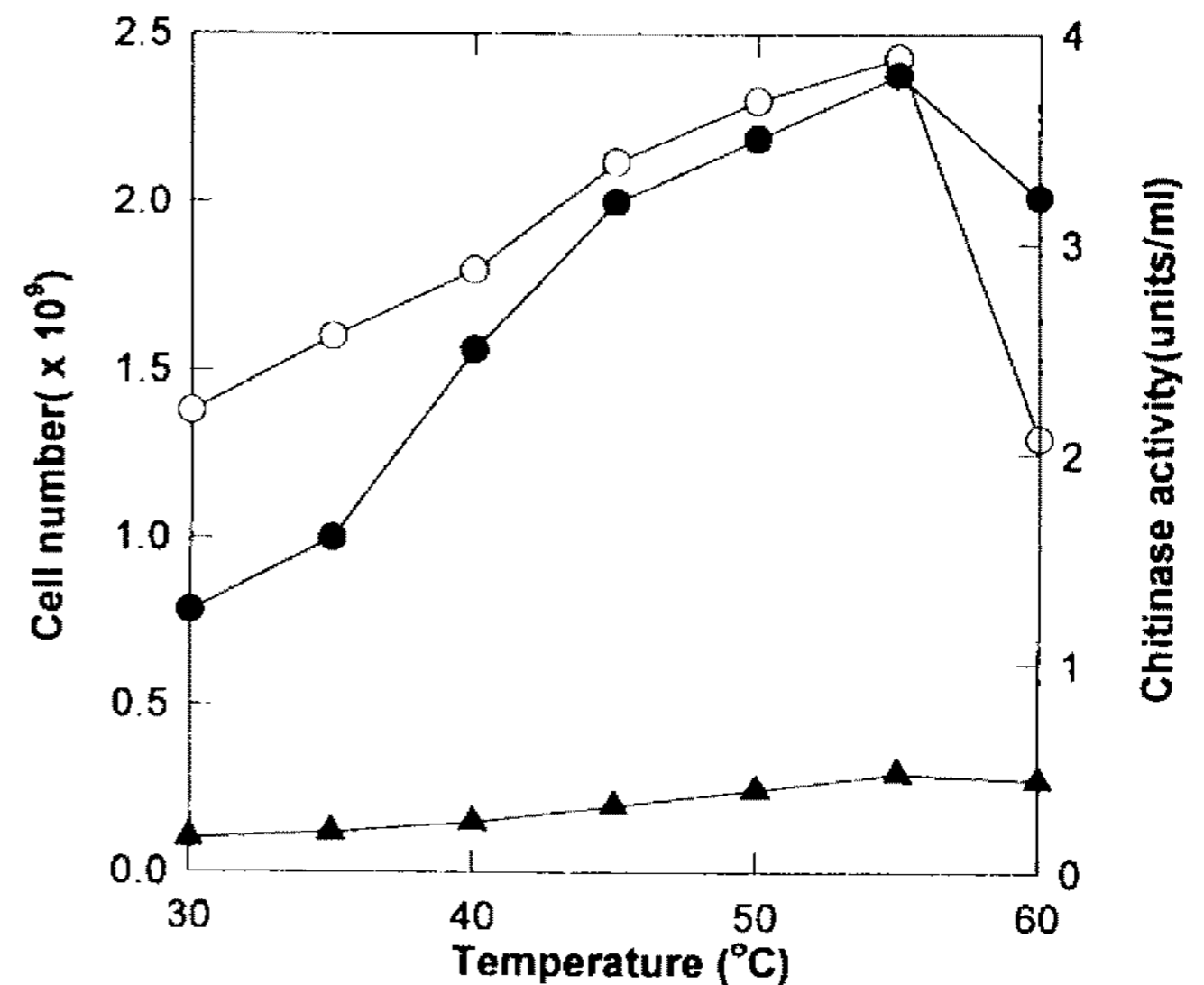


Fig. 4. Effect of temperature on cell growth and thermostable chitinase production of *Bacillus licheniformis* KFB-C14.

*Bacillus licheniformis* KFB-C14 was cultured at various temperature for 40 hr. The intracellular (▲) and extracellular (●) enzyme activities were measured under the standard assay condition and cell growth was estimated with viable cell number (○).

내열성(Table 1)을 보인 선별균주 KFB-C14가 65°C에서 생육치 않는 *Bacillus licheniformis*로 밝혀짐에 따라 균생육과 효소생산에 미치는 온도의 영향을 검토하였다. Fig. 4에서와 같이 생산균주는 55°C까지 온도 증가와 함께 비례적으로 생육이 증가하였으나 60°C에서 급격히 저하되었으며 65°C에서는 생육치 않았다. 균체의 효소의 생산은 35°C 이후 45°C까지 높은 증가를 보였고 55°C

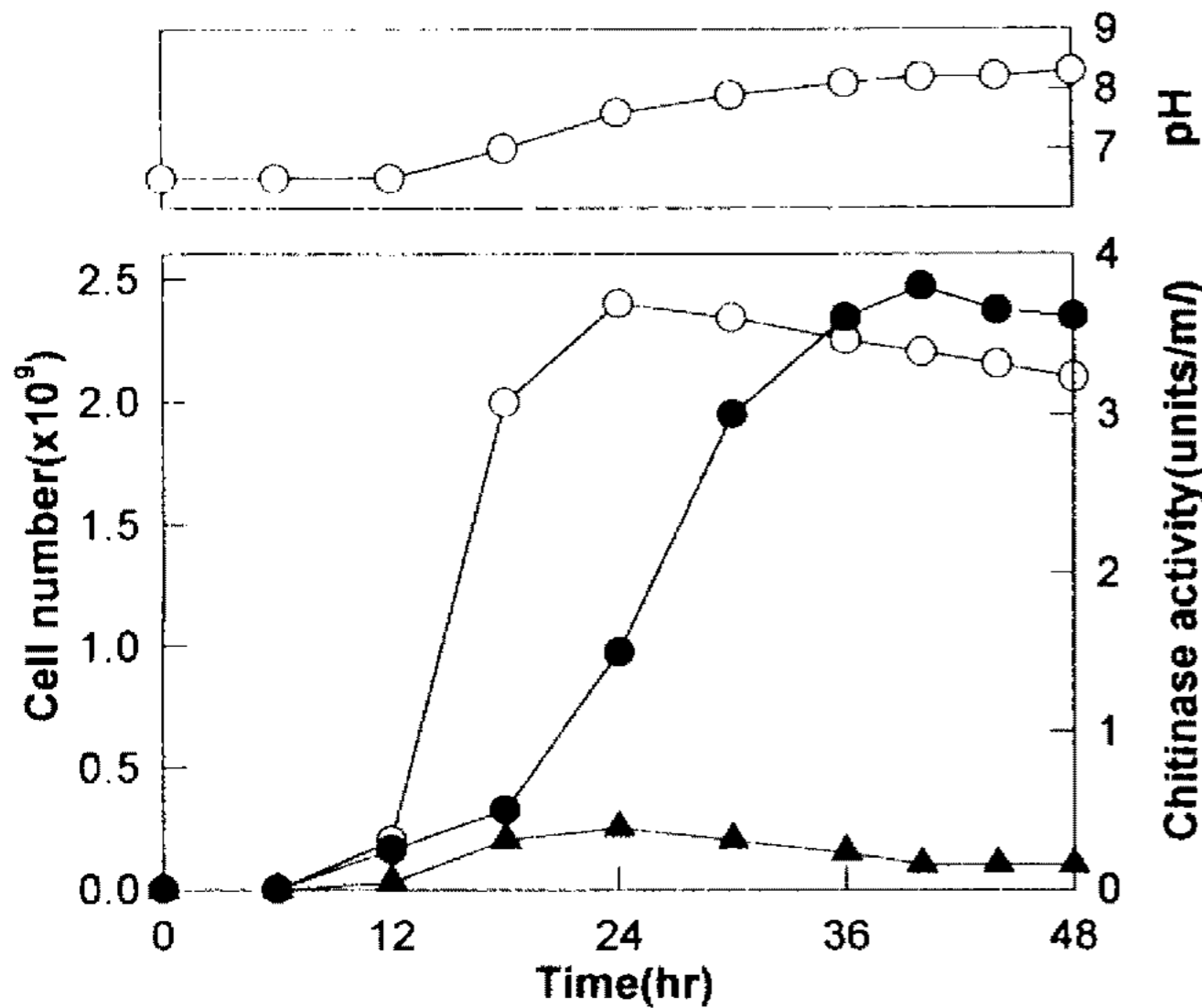


Fig. 5. Growth and chitinase production patterns of *Bacillus licheniformis* KFB-C14 under optimal culture condition.

*B. licheniformis* KFB-C14 was cultured in 500 ml baffle flask containing 100 ml medium with rotary shaker controled at 150 rpm and 55°C. The extracellular chitinase (●) and intracellular chitinase (▲) were assayed by the methods as described under "Materials and Methods". The cell number (○) was measured by the serial dilution-agar plate method.

에서 최대생산을 나타냄으로써 효소생산과 균생육을 위한 최적온도가 55°C로 동일하였다.

#### 내열성 chitinase의 효소생산조건 최적화

상기에서 검토한 효소생산에 미치는 배지 및 환경인자 이외 염류, pH 및 교반속도 등을 조사하였던 바 최적배양조건은 1.2% colloidal chitin, 0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% yeast extract 등으로 구성된 최적배지 100 ml를 초기 pH 6.5로 조정하고 500 ml용 baffle flask를 사용하여 55°C, 150 rpm에서 회전진탕 배양할 때이었다. Fig. 5는 효소생산을 위한 최적배양조건에서 배양시간에 따른 균체의 생육과 효소의 생산양식을 추적한 것으로 균생육은 배양 24시간에서, 균체의 효소분비는 40시간에서 각각 최대치를 나타내었으며 배양기간중의 pH 변화와 균체내 효소활성은 미미하였다. 높은 배양온도에서 호열성세균의 일반적 최대생육시간인 16시간 부근보다 장시간이 요구되었으며 효소생산시기 또한 정지기 후기에 위치하는 특성을 보였다. 이상의 효소생산조건 최적화를 통해 *Bacillus licheniformis* KFB-C14가 생산하는 효소활성을 분리시에 비해 약 2.3배인 3.89 units/ml, 비활성은 약 1.8배인 7.4 unit/mg까지 증가시킬 수 있었다.

#### 요 약

자연계 고온환경으로부터 내열성 chitinase 활성이

우수하고 반응산물로 N-acetyl-D-glucosamine 이량체 (GlcNAc)<sub>2</sub>를 생산하는 균주를 분리 선별하고 *Bacillus licheniformis* KFB-C14로 동정하였다. 선별균주의 효소생산 특성은 탄소원으로서 효소기질인 colloidal chitin이 첨가될 때만이 생합성이 유도되었으며 유도제의 첨가시기에 의해 효소생산이 크게 영향을 받았다. 각종 무기, 유기태 질소원 중 yeast extract가 활성과 비활성을 각각 약 2배 증가시켰으며 높은 친화도를 나타내었다. 균의 최대생육과 효소의 최대생산온도는 55°C이었다. 본 균주의 내열성 chitinase 생산에 미치는 최적배양조건은 1.2% colloidal chitin, 0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% yeast extract, pH 6.5의 배지를 55°C, 150 rpm에서 40시간 회전진탕배양 하였을 때로 3.89 units/ml의 효소활성과 7.4 units/mg의 비활성을 나타내었다.

#### 감사의 말

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 연구비 지원(과제번호 94-K3-04, 07-01-06-3)에 의해 수행된 결과입니다.

#### 참고문헌

1. 키친, 키토산 연구회編. 1992. 키친, 키토산의應用. Pp. 71-264. 技報堂出版, 東京.
2. Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.* **38**: 85-97.
3. 平野茂傳, 瀧口泰之, 鳥原建三. 1987. 別冊 フ-ドケミカル, 키친/키토산/키토산의科學. Pp. 1-4. 食品化學新聞社, 東京.
4. 石川文保, 大玉明, 鳥原建三, 戶倉 清一, 平野茂傳. 1988. 最後のバイオオオマスキチン, 키토산. Pp. 1-20. 技報堂出版, 東京.
5. Allan, G.G., L.C. Altman, R.E. Bensinger, D.K. Ghosh, Y. Hirabayashi and S. Neogi. 1984. Biomedical applications of chitin and chitosan, Chitin, Chitosan, and Related Enzymes, ed. by J.P. Zikakis, Pp. 119-133. Academic Press, Orlando.
6. Usui, T., K. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai and Y. Ishido. 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **923**: 302-309.
7. 唯水泰市, 林洋一. 1987. *Trichoderma reesei*의生産する키친-제의分離とその轉移作用. 農化大會 講演要旨集. 651.
8. Takayanagi, T., K. Ajisaka, T. Tabiguchi, and K. Shimakara. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* x-7u. *Biochim. Biophys. Acta.* **1078**: 414-410.
9. Holt, J.G. and P.H.A. Sneath. 1986. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. *The Williams and Wilkins Co., Baltimore.* **2**: 1104-1139.
10. Priest, F.G., M. Goodfellow and C. Todd. 1988. A Numerical Classification of the Genus *Bacillus*. *J. Gen.*

- Microbiol.* **134**: 1847-1882.
11. Hsu, S.C. and L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomyces* in water soil. *Appl. Microbiol.* **29**: 422-426.
  12. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
  13. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Fan and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-271.
  14. Lim, H.S. and S.D. Kim. 1994. The production and enzymatic properties of extracellular chitinase from *Pseudomonas stutzeri* YPL-1, as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 134-140.
  15. Yabuki, M. and K. Mizushina. 1986. Purification and characterization of chitinases and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* A-52. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 25-38.
  16. Roberts, R.L. and E. Cabib. 1982. *Serratia marcescens* chitinase: one-step purification and use for determination of chitin. *Anal. Biochem.* **127**: 402-412.
  17. Akira, O., M. Mitsutomi and Y. Uchida. 1979. Purification of some properties of chitinase from *Vibrio* sp. *J. Ferment. Technol.* **57**: 169-177.
  18. Shin, W.C., D.S. Lee, T.H. Kim, J.H. Woo, J.M. Lee and J.G. Hong. 1995. Isolation and characterization of *Acintobacter* sp. WC-17 producing chitinase. *J. Microbiol. Biotech.* **5**: 80-86.
  19. Watanabe, T., W. Oyangai, K. Suzuki and H. Tanaka. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**: 5017-4022.
  20. Hara, S., Y. Yamamura, Y. Fujii, T. Mega and T. Ikenaka. 1989. Purification and characterization of chitinase produced by *Streptomyces erythraeus*. *J. Biochem.* **105**: 484-489.
  21. Okazaki, K., F. Kato, N. Watanabe, S. Yasuda, Y. Masui and S. Hayakawa. 1995. Purification and properties of two chitinases from *Streptomyces* sp. J-13-3. *Bio-sci. Biotech. Biochem.* **59**: 1586-1587.
  22. Jeong, E.J. and Y.H. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitooligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 187-196.

(Received 15 August 1996)