

Aeromonas hydrophila 5-3K 의 분리 및 Chitin 분해 특성

김광엽¹ · 이찬용^{2*} · 이계호

¹충북대학교 식품공학과, ²대전대학교 이과대학 미생물학과,
서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Isolation of *Aeromonas hydrophila* and Chitinolytic Properties. Kwang-Yup Kim¹, Chan-Yong Lee^{2*} and Ke-Ho Lee. ¹Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju, 316-763, ²Department of Microbiology, Taejon University, Taejon, 300-716, Korea Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea - For the production of potent chitinolytic enzyme from bacteria, screening was carried out. Of 100 samples from soil, fresh water and sea water collected from the Kyung-gi area, 7 strains of chitinolytic bacteria were isolated. Among them, *Aeromonas hydrophila* 5-3K showed the highest chitinolytic activity. Culture conditions of *Aeromonas hydrophila* for the production of chitinolytic enzyme were investigated and lytic enzyme was fractionated by the use of ammonium sulfate and Sephadex G-100. Maximum production of chitinolytic enzyme was obtained at pH 7.0 and 30°C with chitin concentration between 0.2% and 1.0%. Conditions for the enzyme production were optimized including fermentor cultivation. The chitinolytic system of *Aeromonas hydrophila* 5-3K was composed of two enzymes, chitinase and chitobiase.

N-acetyl-D-glucosamine의 β -1,4 중합체인 chitin은 섬유소 다음으로 지구상에 풍부하게 존재하는 biomass이며 연간 약 천억톤 정도가 해양 무척추동물, 곤충, 곰팡이 등에 의하여 새로이 생합성되고 있으며(1, 2) chitin의 생물활성, 견고성, 생물분해성 등의 특성으로 인하여 의약품, 식품공업, 농축산업 및 폐기물 처리 등에 넓게 이용되고 있다(3-9). Chitin 분해 효소는 동식물과 미생물에서 다양하게 발견되고 있으며, 동물의 경우 원생동물, 선충류, 절충류 등의 무척추동물에서 발견되며, 어류, 양서류, 파충류, 조류 등의 소화관에서도 검출되었으며(10-14), 식물에서는 Soybean seed, Wheat germ, Yam 등에서 chitinase가 분리되었다(15-18). 그러나 상업적으로 이용 가능한 chitin 분해효소는 대부분 미생물로부터 얻어지며, *Aspergillus*, *Lycoperdon*, *Comidiavolus* 등의 속에 속하는 곰팡이들이 chitinase를 분비하며, *Saccharomyces*와 같은 효모에서도 보고되었다(19-22). 세균의 경우 *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Serratia* 등 많은 종류의 chitin 분해미생물이 연구되었으며, 방선균은 *Streptomyces*를 포함한 대부분이 chitin 분해능을 가지고 있다(23-32).

미생물에서 유래되는 chitin 분해효소는 대부분 세포 외 분비효소이며, 기질에 의하여 효소 생산이 유도된다. Chitin이 분해되어 최종 생성물인 *N*-acetyl-D-glu-

cosamine 으로 되는 과정은 일반적으로 chitinase(E.C. 3.2.1.14)와 chitobiase(E.C.3.2.1.30)의 두 가지 효소의 공동작용으로 이루어진다(32, 33). Chitinase의 항진균 활성을 이용한 생화학적 방제에 관한 연구도 최근 행하여지고 있다(34, 35). 자연상태에서 chitin은 protein, mineral 등과 복합체를 형성하고 있으며 셀룰로오스와 마찬가지로 여러형태의 결정형으로 존재하므로, 순수한 chitin이나 효소적 분해에 의한 chitin유도체를 얻기 위해서는 물리적 또는 화학적 전처리가 요구된다(35, 36).

Chitin의 대표적인 이용 예로서 항생물질의 전구물질로 사용되는 glucosamine의 생산, 생변환에 의한 단세포 단백질의 생산, 그외 식품분야, 의약품 분야 등이며 이를 위하여는 값싼 chitin 분해 효소의 생산이 필수적이다. Chitin 분해 효소의 생산 미생물로는 곰팡이 등이 활성이 크지만, 대량생산을 위하여는 통기 및 교반이 용이한 세균이 적당하며, 또한 chitinase 유전자의 분리 및 조작 등에도 곰팡이보다는 세균이 유리하다.

본 연구에서는 지구상의 풍부한 생물자원의 하나인 chitin의 이용을 위하여 chitin 분해 활성이 있는 세균을 자연환경으로부터 스크리닝하고 동정하였으며 이 균주가 만드는 chitin 분해효소의 몇 가지 특성을 조사하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에서 사용된 균주는 서울, 수원, 강화도 일원의

*Corresponding author

Tel. 82-42-280-2438, Fax. 82-42-283-7172

E-mail: chanylee@dragon.taejon.ac.kr

Key words: *Aeromonas hydrophila* 5-3K, Chitinase, Chitobiase

토양과 갯벌, 호소등에서 수집한 100 여점의 시료에서 분리된 균주 중에서 chitin분해 활성이 높은 균주를 선발하여 사용하였으며, 분리된 균들은 15%의 glycerol을 포함하는 nutrient 배지를 사용하여 냉동 보관하였다.

배지

Chitin 분해성 세균의 분리를 위하여 colloidal chitin 평판한천배지(colloidal chitin 4.0 g, K_2HPO_4 0.7 g, KH_2PO_4 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $ZnSO_4$ 0.001 g, $MnCl_2$ 0.001 g, agar 15 g, disitilled water 1 liter, pH 7.0)를 사용하였으며 탄소원으로 사용된 colloidal chitin은 Hsu등의 방법으로 제조되었으며(37, 38) 효소생산을 위해서는 생산배지(Colloidal chitin 10 g, Glucose 2 g, peptone 5 g, yeast extract 5 g, K_2HPO_4 1 g, NaCl 2 g, disitilled water 1 liter, pH 7.0)를 사용하였다.

시약

각종 시약은 GR 또는 EP등급의 것을 정제없이 사용하였으며 *p*-dimethylamino-benzaldehyde는 Fluka (Buchs, Switzerland) 제품을 사용하였고, colloidal chitin제조시에는 Wako(Japan)사의 chitin 을 사용하였다. *N*-acetyl-D-glucosamine, chitobiose, chitotriose, purified chitin, chitosan, cellobiose, *p*-nitrophenyl- β -*N*-acetylglucosaminide, β -*N*-acetylglucosaminidase 등은 Sigma(St. Louis, U.S.A.)제품을 사용하였다. *p*-dimethylaminobenzaldehyde(DMBA) 용액은 1.25%(V/V)의 10N-HCl을 포함하는 acetic acid 100 ml에 1g의 DMBA를 녹여서 만들었으며 항상 사용직전에 새로 만들어 사용하였다.

Chitin분해 세균의 분리

수집 시료 1g을 시험관에 넣고 멸균 증류수 10 ml를 가하여 강하게 교반한 후 10분간 정치시키고 상등액을 직접 백금이로 취하여 colloidal chitin 평판한천배지에 streaking하거나 상등액을 1.0 ml 취하여 시료에 따라 적당 배수 희석하여 pour-plating하였다(39). 접종된 plate는 30°C에서 3~7일간 배양한 뒤, 주위에 clear zone을 크게 형성하는 colony를 새로운 평판한천배지에 백금이로 이식하여 순수 분리하였다.

분리된 균주의 동정

형태학적 특성은 균체의 형태 및 크기는 Gram염색을 하여 현미경과 micrometer를 사용하여 관찰하였고 운동성은 반유동고층 배지에 천자배양하여 검사하였으며 편모의 존재는 편모염색법으로 검사하였다(40). 배양적 특성은 사면한천배지에서의 색, gelatin액화, 생육온도, co-

lony의 형태등을 관찰하였다(40). 생리학적 특성 McConkey agar 및 6.5% NaCl 배지에서의 성장, oxidase, catalase, 질산염 환원, oxidative/fermentative glucose test, ONPG(orthonitrophenyl galactoside)test, arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, triple sugar iron(TSI) test, IMViC test, phenylalanine deaminase, urease, amylase등을 검사하였다(41, 42). 탄소원 자화능은 glucose, rhamnose, arabinose, melibiose, sucrose, sorbitol, lactose, trehalose, inositol, mannitol, xylose등에 대하여 phenol red broths를 사용하여 탄소원 자화능 검사를 하였다(42).

효소활성 측정

조효소의 생산과 chitinolytic activity측정 조효소의 생산을 위해서는 agar를 포함하지 않는 분리배지에 질소원으로써 peptone을 0.5%(W/V)되게 첨가한 broth에 일차 선발된 균주를 접종하고 30°C에서 1~3일간 진탕 배양하였으며 chitinolytic activity는 Reissig 등의 방법을 변형하여 측정하였다(15, 43). 원심분리한 배양액 0.5 ml을 0.27 M의 potassium tetraborate 용액 0.25 ml와 혼합하여 끓는 물에서 8분간 가열하고 수돗물로 식힌 후 3 ml의 DMBA 용액을 넣고 잘 흔들고 37°C에서 20분 정지 후 585 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소활성 1 μ Unit은 주어진 조건하에서 1 μ mole의 *N*-acetyl-D-glucosamine(NAG)을 생성하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

Chitobiase(*N*-acetyl-D-glucosaminidase) 활성측정

Chitobiase의 활성은 Borooh등의 방법을 변형하여 측정하였다(44). 효소액 1.0 ml에 기질로서 0.02 M의 *p*-nitrophenyl- β -*N*-acetylglucosaminide용액 1.0 ml를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응 시켰다. 이때 기질과 효소는 0.1 M phosphate 완충용액에 녹이거나 희석하여 사용하였다.

반응을 정지시키기 위하여 0.25 M Na_2CO_3 용액 2.0 ml를 가하여 섞은 후 Pye Unicam pu8600 UV/VIS Spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank에는 효소액 대신 증류수를 사용하였으며 효소활성의 단위는 arbitrary unit으로 상기 조건하에서 10분 동안의 흡광도의 변화값으로 표시하였다.

환원당량의 측정 효소액 1.0 ml에서 기질로서 농도 4.0 mg/ml의 colloidal chitin용액 0.5 ml와 phosphate 완충용액(pH 7.0)을 1.0 ml 섞은 후 40°C에서 한시간 동안 반응시킨 후 생성된 환원당을 Dinitrosalicylic acid법을 사용하여 정량하였다(45).

배양 및 효소생산

배양조건 300 ml 삼각플라스크에 pH 7.0으로 맞춘

배지(Table 2)를 각각 50 ml씩 넣고 가압살균후 진탕배양기에서 10°C~50°C로 유지하면서 24시간동안 배양시킨후 각각의 온도에 대한 균생육 및 효소활성을 구해서 최적배양온도를 확인하였으며 균수측정에는 hemacytometer를 사용하였으며 초기 pH를 0.1 N HCl 과 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 3.0~pH 10.0으로 맞춘 후 모 배양액을 1 ml씩 접종하여 30°C에서 24시간동안 진탕배양시켰다. 배양후 각각의 pH에 대한 균 생육 및 효소활성을 비교하여 최적 pH를 확인하였다.

배양액중의 chitin농도 Peptone 0.5%(W/V), yeast extract 0.5%를 포함하고 colloidal chitin농도를 0%~3.0%까지 달리한 배지를 50 ml을 300 ml 플라스크에 넣어 pH 7.0, 30°C에서 24시간 진탕배양하여 colloidal chitin농도별로 효소활성을 측정하여 최적 chitin농도를 결정하였다. 제조된 colloidal chitin은 그 농도가 1 mg/ml 일때 420 nm에서 흡광도가 0.8이었다.

탄소원의 영향 0.5% yeast extract와 0.5%의 peptone을 포함하는 배지 50 ml에 각각 CMC, cellulose, cellobiose, chitosan, coarse chitin, purified chitin, colloidal chitin을 0.1%, chitotriose와 chitobiose는 0.01%되도록 첨가한후 30°C에서 진탕배양하면서 8, 16, 32, 48, 56 시간별로 시료를 채취하여 조효소의 활성을 측정하였다.

질소원의 영향 0.5% colloidal chitin을 포함하는 pH 7.0의 배지 50 ml에 casein, peptone, urea, casamino acid, asparagine, L-arginine, histidine을 각각 1%(W/V)씩, 그리고 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3 , KNO_3 를 각각 0.2 M씩 첨가한 후 30°C, pH 7.0에서 24시간 동안 진탕배양한후 균체 성장과 효소활성에 대한 무기질소원의 영향을 측정하였으며, 0.5% colloidal chitin을 포함하는 pH 7.0, 50 ml배지에 peptone, yeast extract, tryptone을 각각 0.1%~5.0%가 되도록 첨가한 다음 24시간 동안 진탕배양한 후 유기질소원의 영향을 측정하였다.

균배양과 효소생산 분리균주를 slant에서 한백금이 이식하여 nutrient broth 20 ml에 접종하여 30°C에서 20시간 동안 진탕배양시킨 후 효소 생산배지에 접종(0.5% V/V)하였다. 배양은 Jar fermentor(New Brunswick MF-114)를 사용하였고 배양시 통기는 2 vvm, 교반은 300 rpm, 온도는 30°C, 초기 pH는 7.0으로 하였으며 소포제를 0.01%를 첨가했다. 효소생산을 위한 최적 배양 시간을 얻기 위하여 2시간 마다 분석하였다.

조효소의 조제와 효소특성

Jar-fermentor에서 16시간 배양 후 배양액을 4°C에서 10,000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하여 조효소액으로 하였으며 4°C에서 냉장보관하면서 7일 이내에 사용하였다. 효소의 최적온도는 pH 7.0에서 10°C~

70°C까지 10°C간격으로 효소반응 온도를 달리하여 효소활성을 측정한뒤 상대 활성으로 나타내었으며 효소의 최적 pH는 0.2 M acetate 완충용액(pH 4.0~5.0), 0.2 M tris-acetate 완충용액(pH 6.0~9.0), 0.2 M glycine-NaOH 완충용액(pH 10.0~11.0)를 사용하여 각 pH에서의 효소활성을 측정하였다. pH stability는 각각의 pH에서 완충용액 1ml와 조효소액 1 ml를 섞어 30°C에서 24시간 incubation시킨 후 잔존 효소 활성을 측정하였다.

Gel chromatography

Jar fermentor에서 16시간 배양한 분리균주 5-3K의 배양액을 4°C에서 10,000×g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하였고 여기에 ammonium sulfate를 70% 포화되게 천천히 용해시켜서 4°C에서 하룻밤을 방치한후 10,000×g로 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.1 M phosphate 완충용액(pH 7.0)로 회수하였고 이를 투석막에 넣고 4°C의 20 mM phosphate 완충용액에서 6시간동안 투석하여 염을 제거한후 냉동건조하여 보관하면서 부분 정제를 위하여 사용하였다. Sephadex G-100 column chromatography는 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)를 사용하여 용출속도는 20 ml/hr로 용출하였다.

결과 및 고찰

Chitin분해 세균의 분리 및 선발

서울, 수원, 강화도 일대의 토양과 하천 그리고 갯벌 등에서 채집한 시료 100점에 대하여 chitin 분해활성 시험을 한 결과 Fig. 1에서와 같이 colloidal chitin을 유일한 탄소원으로 하는 평판한천배지상에서 colony 주위에 투명환을 형성하는 colony는 현미경 관찰에 의하여 방선균, 곰팡이, 세균 순의 빈도로 나타남을 보였고 이것은 chitin분해능이 거의 모든 방선균에 있어서 공통된 특성이라는 사실과 일치한다(22, 39). 분리용 배지에 사용된 colloidal chitin의 농도가 0.1%(W/V)이상 일 경우 원래의 배지와 투명환의 구분이 잘 되지 않았으므로 0.1% congo red용액으로 30분간 처리하고 1 M NaCl용액으로 15분간 세척한 후 명확한 투명환의 생성을 보이는 colony를 확인하였다(Fig. 1).

Chitin 평판한천배지에서 colony주위에 커다란 투명환을 형성하는 균주를 순수분리한 후 현미경으로 관찰하여 곰팡이, 방선균을 제외한 세균만을 대상으로 chitin분해능을 측정한 결과로서 Table 1에서와 같이 비교적 분해활성이 높은 7주의 균주를 선발하였다. 그중 분리균주 5-3K(3.73 Units/ml)가 KM-3(2.04 Units/ml)보다 chitin분해능이 1.8배 더 높았으므로 이후 실험은 5-3K균주를 최종적으로 선발하여 진행하였다.

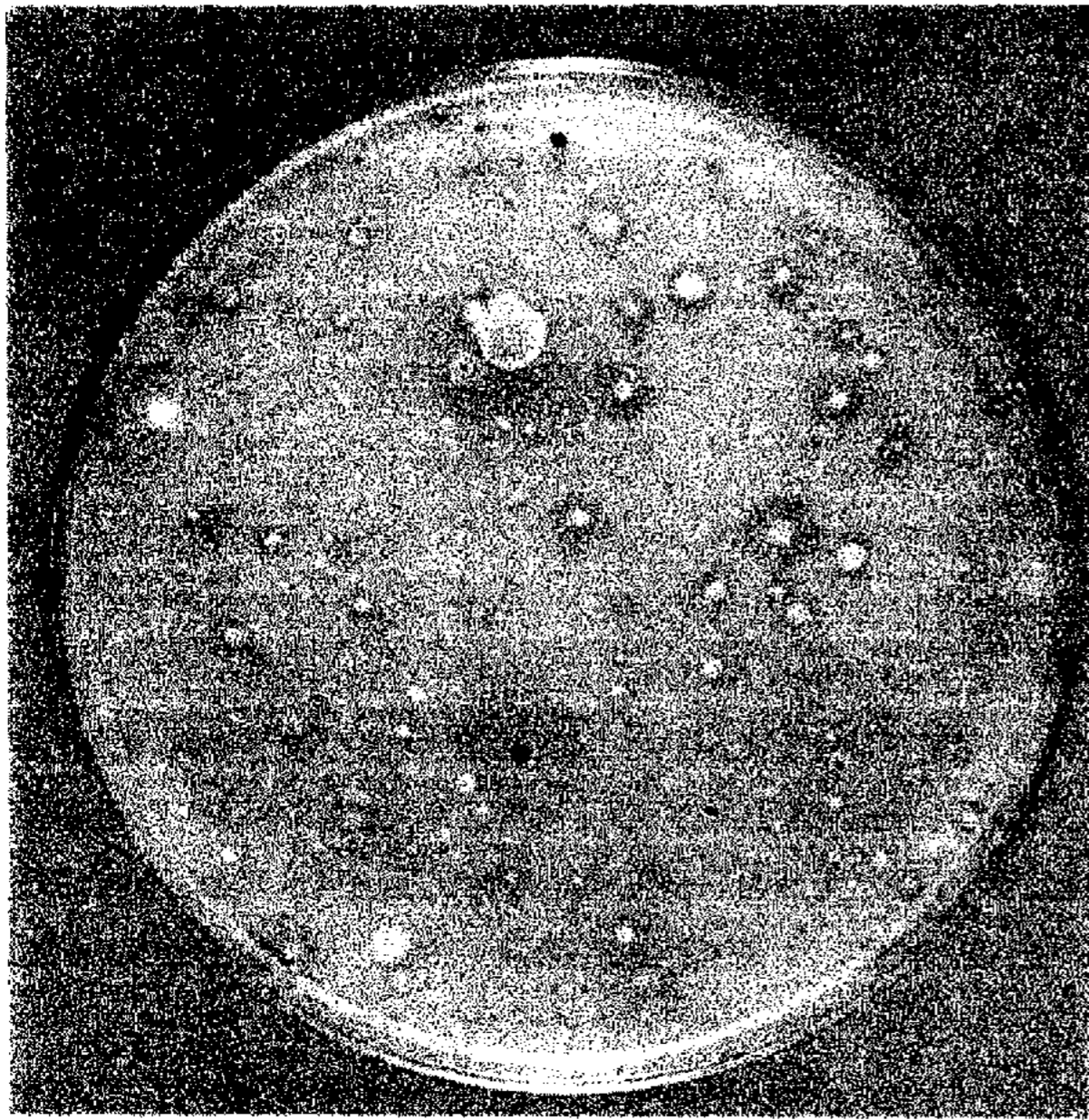


Fig. 1. Detection of chitinolytic activity from the colloidal chitin agar plates by Congo-Red staining.
After pour plating of isolates, it was incubated 3-7 days at 30°C.

Table 1. Chitinolytic activity of isolated bacteria.

	KM-4	KM-3	KM-9	5-3K	K-S	K-N	KM-7
Chitinolytic Activity (Unit/ml)	0.86	2.04	1.09	3.73	0.98	0.75	1.03

분리균주의 동정

순수 분리된 chitin분해성 세균중에서 그 분해능이 가장 우수한 5-3K를 분리하여 공시균주로 선정하였고 이에 대하여 형태적 특성, 배양적 특성, 생리적 특성 및 탄소원 자화능을 조사한 결과를 Table 2와 Table 3에 나타내었다.

5-3 K균주는 포자를 형성하지 않는 Gram음성의 간균이며 운동성이 있고 oxidase 양성이고 O/F glucose배지 상에서 fermentative로 나타났으므로 이 균주는 *Aeromonas*속, *Chromobacterium*속 또는 *Vibrio*속 중의 하나에 포함된다. 그 중에서 *Chromobacterium* 속은 보라색 색소체를 보이므로 제외되었고 arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ONPG test결과로써 이 균주가 *Aeromonas*속임을 확인하였다(46).

*Aeromonas*속 중에서 *A. salmonicida*는 운동성이 없으므로 분리 선정한 균과는 관계가 없고, triple sugar iron(TSI) test, IMViC test, 탄소원 자화능등의 제특성을 조사한 결과를 토대로 선정된 분리균주 5-3K를 *Aeromonas hydrophila* 5-3 K로 동정하였다(46).

균생육조건 및 효소생산조건

Aeromonas hydrophila 5-3 K의 배양온도에 따른 균주 생육 및 효소 활성을 10°C~50°C의 각 온도에서 조사한

Table 2. Morphological, Cultural and Physiological characteristics of the isolated strain 5-3K

		5-3K
Characteristics		
Form		Asporogenous straight rods with round ends
Size (µm)		0.7-3.0 µm
Motility		+
Gram staining		-
Cultural characteristics		
Agar slant		White
Broth	Uniformly	Uniformly turbid
Gelatin liquefaction		+
Colony		
Form		Circular
Elevation		Convex
Margin		Entire
Growth at		
4°C		-
41°C		+
Physiological characteristics		
Growth on McConkey agar		+
Growth on 6.5% NaCl		-
Oxidase		+
Catalase		+
Nitrate reduction		+
O/F glucose		Fermentative
ONPG		+
Arginine dihydrolase		+
Lysine decarboxylase		+
Ornithine decarboxylase		-
H ₂ S (TSI)		-
Indole production		+
Methyl red		+
Voges-Proskauer		+
Citrate utilization		+
Phenylalanine deaminase		-
Urease		-
Amylase		+

Symbols: +: positive; -: negative.

Table 3. Assimilation of various Carbohydrates by the strain 5-3K

	5-3K
Glucose	+
Rhamnose	-
Arabinose	+
Melibiose	-
Sucrose	+
Sorbitol	+
Lactose	+
Trehalose	+
Inositol	+
Mannitol	+
Xylose	+

Symbols: +: positive; -: negative.

결과는 30°C에서 균주 생육과 효소 활성이 모두 최대치를 보였다. 초기 pH에 의한 영향으로는 pH 5.0이하에서는 균생육이 거의 나타나지 않았으며 pH 8.0~9.0사이에서는 효소활성이 완만한 감소의 경향을 보였으며 pH 7.0에서 균생육과 효소활성이 모두 최대를 나타내었다. pH를 7.0으로 하고 30°C에서 24시간 배양할 때, chitin 첨가 농도에 따른 효소활성을 비교한 결과 효소활성은 colloidal chitin농도가 1.0 mg/ml일때 최대치를 보였으며 0.2~1.0 mg/ml의 농도에서도 유사한 활성을 나타내었다.(결과미제시) 이 결과를 고찰해 보면 *Aeromonas hydrophila* 5-3 K의 chitin분해효소가 inducible enzyme임을 알 수 있었다. 배지중에 탄소원 및 inducer별로 각 0.1%농도로 대체하여 조성한 배지에서 진탕배양하고 그 조효소액으로 효소활성을 비교한 결과는 Table. 4에서와 같다. Purified chitin첨가구는 48시간 배양에서 NAG

Table 4. The effect of CMC, cellulose, cellobiose, chitosan coarse chitin, purified chitin, colloidal chitin, chitotriose, and chitobiose on the induction of the chitinase system

Inducing Agents	Micromoles of NAG released/ml				
	8 h	16 h	32 h	48 h	56 h
Control*	0.08	0.14	0.12	0.11	0.09
CMC	0.07	0.12	0.13	0.10	0.12
Cellulose	0.12	0.15	0.12	0.11	0.09
Cellobiose	0.27	0.20	0.18	0.18	0.10
Chitosan	0.33	0.25	0.24	0.17	0.16
Coarse chitin	0.21	0.39	0.40	0.39	0.28
Purified chitin	0.73	1.18	1.48	1.50	0.97
Colloidal chitin	1.08	1.50	1.36	1.28	1.10
Chitotriose	0.13	0.15	0.12	0.11	0.10
Chitobiose	0.39	0.34	0.32	0.26	0.23

*All flasks contained 0.1% of each agent tested, except chitotriose and chitobiose (0.01%). But control contained 0.5% of yeast extract and 0.5% of peptone only.

Table 5. Effect of nitrogen source on chitinolytic enzyme production by *Aeromonas hydrophila* 5-3K.

Nitrogen Source	Compound	Cell growth (Abs. at 550 nm)	Chitinolytic activity (U/ml)
Organic*	Casein	0.370	0.87
	Peptone	0.997	3.75
	Urea	0.057	0.08
	Casamino acid	0.124	0.43
	Asparagine	0.266	0.50
Inorganic**	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.703	2.13
	NH ₄ Cl	0.250	0.80
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0.198	0.58
	NH ₄ NO ₃	0.122	0.30
	NaNO ₃	0.093	0.08
	KNO ₃	0.097	0.05

* --- 1% (W/V), ** --- 0.2 M.

(N-acetyl-D-glucosamine)생성량은 1.50 μmole이었고 colloidal chitin첨가구는 16시간 배양에서 NAG생성량 1.50 μmole로서 colloidal chitin이 더 쉽게 이용되어 효소생성을 촉진한다는 것을 알 수 있었다. Coarse chitin이 inducing effect를 나타내지 않는 점으로 미루어 *Aeromonas hydrophila* 5-3 K가 분비하는 chitin분해 효소에는 결정형 chitin의 가수분해에 필요한 것으로 알려진(CH₁) factor가 부족한 것으로 생각된다(31). 배지 중에서 여러가지 유기 및 무기질소원이 균생육과 효소활성에 미치는 영향을 조사하여 Table 5에 나타내었다. 유기질소원으로는 peptone 첨가구가 3.75 units/ml, 무기질소원으로는 (NH₄)₂HPO₄ 첨가구가 2.31 units/ml로서 가장 효과적이었음을 알 수 있다. Chitin 분해 효소 생산을 위한 배지 조성 중에서 가장 중요한 영향을 미치는 것은 질소원이었으며, 그 중에서 peptone이 가장 효과적이었으므로 이를 효소생산을 위한 질소원으로 선정하였다. Peptone, yeast extract, tryptone의 농도별 영향을 relative activity로 환산하여 Table 6에 나타내었다.

0.5%의 농도에서는 peptone의 월등히 높은 효과를 나타내었고, peptone과 yeast extract를 모두 0.5%씩 첨가한 경우에 조효소의 활성이 4.2 units/ml를 나타내었으며 이는 peptone과 tryptone 또는 yeast extract와 tryptone을 0.5%씩 첨가한 조합보다 더 높았다. K₂HPO₄와 KH₂PO₄의 농도별 영향을 조사한 결과 K₂HPO₄를 0.5% 첨가한 경우가 가장 높은 chitin 분해능을 나타내었다. *Aeromonas hydrophila*가 자화할 수 있다고 알려진 여러 종류의 탄소원의 영향에 대하여 조사한 결과, 0.5%의 colloidal chitin을 포함하는 배지에서 배양했을 때, 첨가한 어떤 탄소원도 별다른 영향을 주지 않았다. Glucose, lactose, cellobiose에 의해서 약간의 상승효과가 있었으나 그 정도는 매우 미약하였다. Biotin, nicotinic acid, thiamine hydrochloride, vitamine B₁₂ 등의 생육 인자를 각각 첨가하여 배양한 후 효소활성을 control과 비교하였을 때에도 첨가 효과를 보이지 않았다(결과미제시). *Aeromonas hydrophila*의 생육에 중요한 무기염으로 보고

Table 6. The additive effects of peptone, yeast extract, and tryptone on chitinase production in the medium contained 0.5% colloidal chitin

Concentration (%)	Relative Activity (%)		
	Peptone	Yeast Extract	Tryptone
0.1	69.5	1.0	67.8
0.5	91.8	69.7	85.6
1.0	94.7	97.3	97.8
2.0	95.0	98.2	97.7
3.0	94.4	99.0	97.5
5.0	90.7	100*	97.5

*Crude enzyme activity: 4.05 Units/ml.

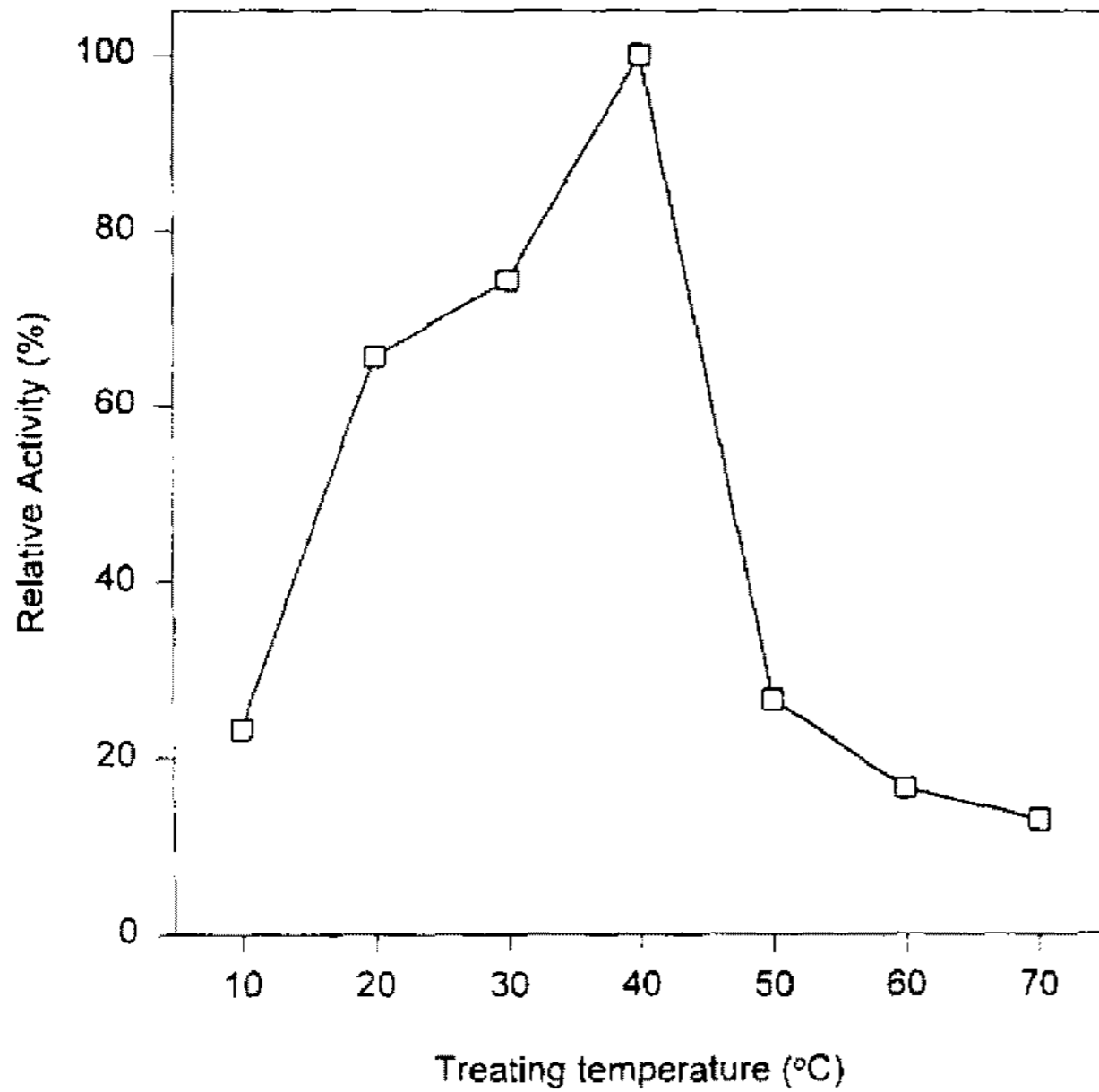


Fig. 2. Effect of temperature on activity of the chitinolytic enzyme produced by *Aeromonas hydrophila* 5-3K.

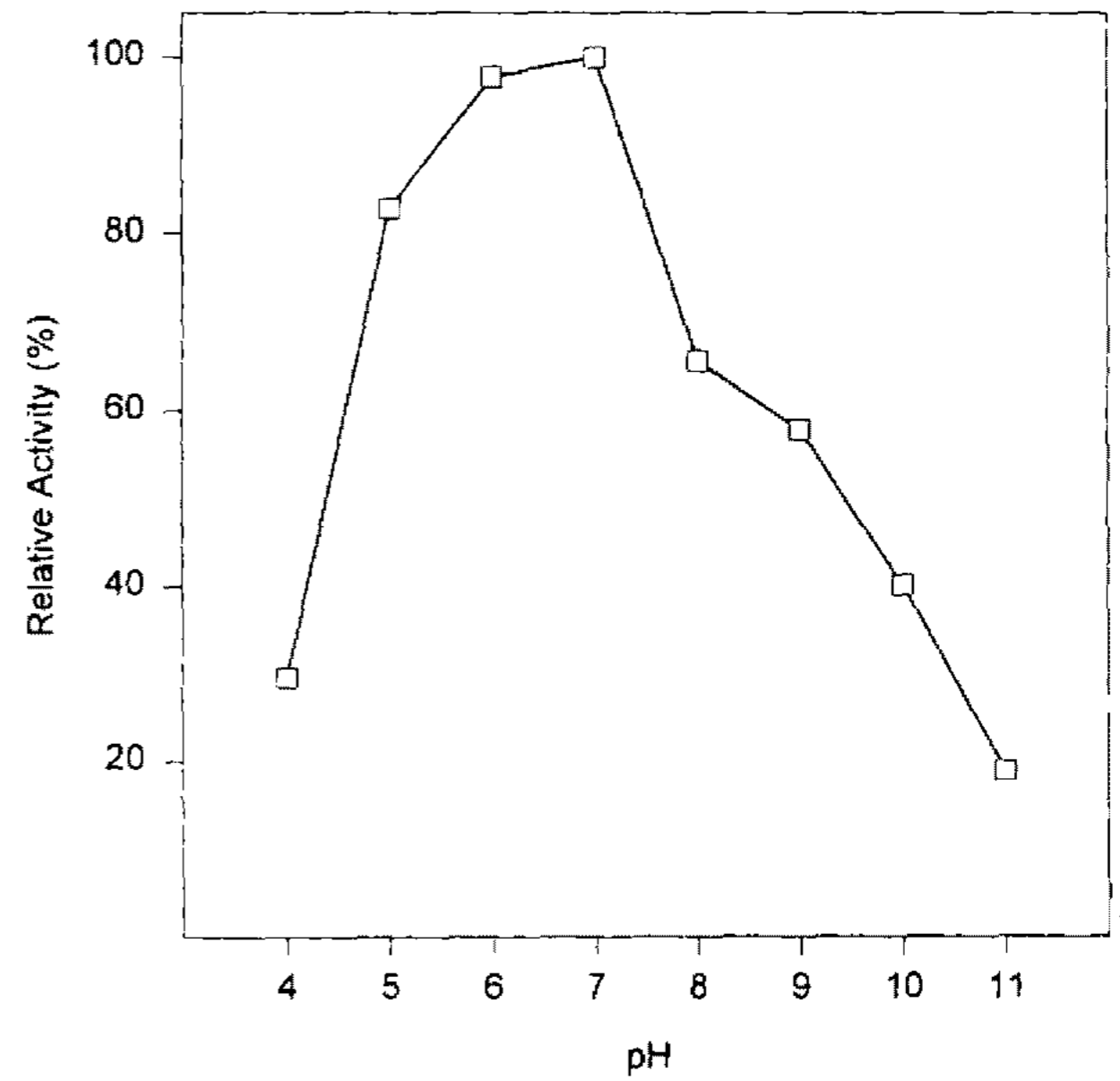


Fig. 3. Effect of pH on activity of the chitinolytic enzyme produced by *Aeromonas hydrophila* 5-3K.

되어 있는 NaCl에 대하여 배지에 0.1%~0.5%의 농도별로 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하는 결과 0.2%일 때 약간의 효소활성의 증가를 보았다. 효소생산과 그 최적 배양시간을 결정하기 위하여 생산배지에서 jar fermentor를 사용하여 배양하면서 2시간마다 시료를 채취하여 균체 성장과 효소 활성을 측정하는 결과 균체 성장은 12시간 일 때에 stationary phase에 도달하였고, 효소역가는 16시간 배양시 최대치를 나타내었다. Colloidal chitin을 탄소원 및 inducer로 사용함으로써 최대 효소활성을 나타내는데 소요되는 배양시간이 16~18시간 정도로 상당히 단축되었다.

조효소의 특성

조효소의 온도에 따른 효소활성을 비교하기 위하여 10°C~70°C범위에서 10°C 간격을 두고 각 온도에서 처리하여 효소활성을 측정하여 그 결과를 상대활성으로 표시한 바는 Fig. 2에서와 같다. 효소활성의 최적온도는 40°C로 나타났고 이 온도를 효소 활성측정시 incubation시키는 온도를 사용하였다. 조효소의 pH에 따른 효소활성의 비교한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 pH 7.0에서 최대활성을 보였으며 pH 6.0에서도 그와 유사한 정도의 효소활성을 나타내었다. 조효소의 pH에 따른 안정성을 30°C에서 24시간 incubation시킨 후, 효소활성을 측정하였다. pH 7.0에서 잔존 효소활성이 최대를 나타내었다. 이때의 효소 활성은 처음 활성의 73%에 해당되었다.

Gel chromatography

배양액의 조효소를 ammonium sulfate로 염석한 후 투석시킨 농축액을 Sephadex G-100 column chroma-

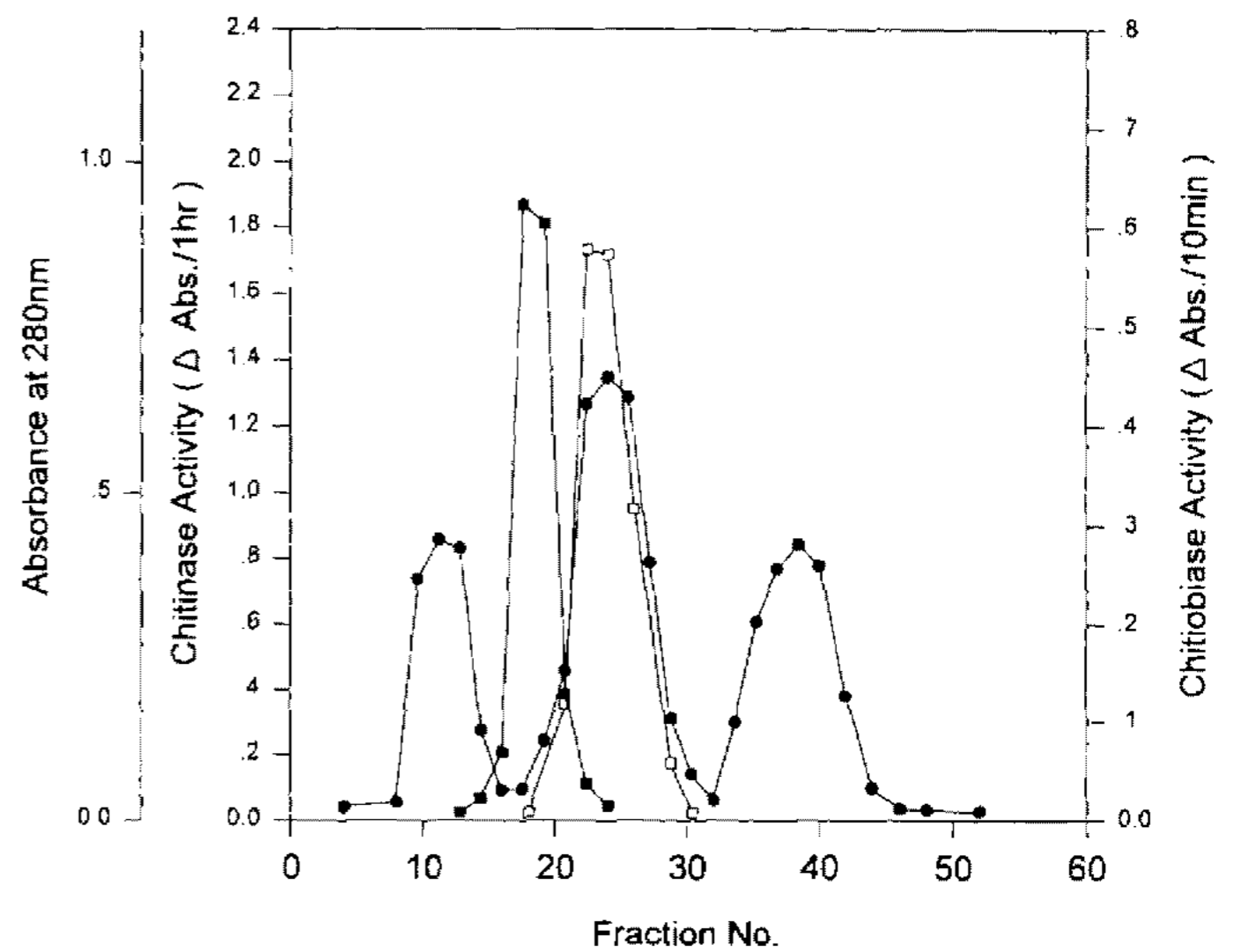


Fig. 4. Elution pattern of chitinolytic enzyme of *Aeromonas hydrophila* 5-3K on Sephadex G-100 column chromatography. Column dimension was 2.5×90 cm and flow rate of the eluent (20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0) was 20 ml/hr with 5ml fraction. ●-●, Absorbance at 280 nm; ■-■, chitobiase activity; □-□, chitinase activity.

tography를 하여 얻은 분획들에 대하여 chitobiase (*N*-acetyl-*D*-glucosaminidase)활성과 chitinase activity를 측정하는 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Chitobiase activity를 나타내는 peak와 chitinase activity를 나타내는 peak가 뚜렷하게 분획되었고, 두번째의 넓게 퍼진 단백질구에서 두가지 효소의 활성 peak가 모두 나타났다. 또한 생성된 NAG를 정량했을 때 20번째의 분획에서 최고치를 나타내었고, β-*N*-acetyl-*D*-glucosaminidase를 첨가하여 반응하였을 때는 생성된 NAG량을 나타내는 peak가 오른쪽으로 더 확장되었다.

이상의 결과에서 *Aeromonas hydrophila* 5-3 K가 분비하는 chitin분해 작용이 chitinase와 chitobiase의 두 효소의 공동작용에 의한 것임을 확인하였다. 이는 M.Yabuki 등의 보고와도 유사한 결과임을 알 수 있었다(32).

요 약

세균에 의하여 강력한 chitin분해 효소를 생산하기 위하여 chitin분해성 세균을 자연환경으로 부터 분리하고자 스크리닝을 하였다. 경기도 일원의 토양 및 하천에서 수집한 시료 100점 중에서 7주의 chitin분해성이 강한 세균을 분리하였고, 그 중에서 chitin분해능이 가장 우수한 5-3 K균주를 선정하여 제 특성을 확인하여 동정한 결과 *Aeromonas hydrophila* 5-3K 이었으며 chitin분해 효소 생산을 위한 배양 최적조건을 조사하였고, 생산된 효소에 대하여 황산암모늄 염석과 Sephadex G-100 column chromatography를 행하여 부분 정제하였다.

Chitin분해 효소의 생산 최적조건은 pH 7.0, 30°C이었고, 효소 생산에서 가장 효과적인 탄소원 및 inducer는 colloidal chitin이었다. 유기 및 무기 질소원으로는 peptone과 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 가 좋았다. Jar fermentor에서의 액침 배양시 16~20시간 사이에서 안정된 최대의 효소 생산능을 보였고 이때의 효소 활성은 4.0~4.2 units/ml이었다. 조효소는 pH 7.0, 40°C에서 최대 활성을 나타내었다. *Aeromonas hydrophila* 5-3K의 chitin분해 작용은 크기가 비슷한 chitinase와 chitobiase 두가지 효소의 공동작용에 의한 것임을 추정할 수 있었다.

참고문헌

- Knorr, D. 1984. Use of chitinous polymers in food. A challenge for food research and development. *Food Technol.* **38(1)**: 85-97.
- Tracey, M. V. 1957. Chitin. *Rev. Pure and Applied Chem.* **7(1)**: 1-13.
- Austin, P. R., C. J. Brine, J. E. Castle, and J. P. Zikakis. 1981. Chitin: new facets of research. *Science* **212**: 749-753.
- Patton, R. S., P. T. Chandoer, and O. G. Gonzalez. 1974. Nutritive value of crab meal for young ruminating calves. *J. Dairy science* **58(3)**: 404-410.
- Bloch, R., and M. M. Burger. 1974. Purification of wheat germ agglutinin using affinity chromatography on chitin. *Biochem. Biophys. Research Communications.* **58**: 13-18.
- Knorr, D., T. P. Wampler, and R. A. Teutonico. 1985. Formation of pyrazines by chitin pyrolysis. *J. Food science* **50**: 1762-1763.
- Schlotzhauer, W. S., O. T. Chortyk, and P. R. Austin. 1976. Pyrolysis of chitin, a potential tobacco extender. *J. Agric. Food Chem.* **24**: 177-180.
- Knorr, D. 1983. Dye binding properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.* **48**: 36-42.
- Latlidf, S. L. and D. Knorr. 1983. Effects of chitin as coagulating aid on protein yield, composition and functionality of tomato seed protein concentrates. *J. Food Sci.* **48**: 1587-1590.
- Ohtakara, A., Y. Uchido, and M. Mitsutomi. 1978. Proceeding of the first international conference on chitin/chitosan (RAA. Muzarell: ER. Pariser, eds) MIT sea Grant Report MITSG 78-7: 587-606.
- Jeuniaux, C. 1966. Chitinases, in *Methods in Enzymology*, Edited by Neufeld E. R., and V. Ginsberg. Vol. 8 pp.644-650. Academic press New York.
- Jeuniaux, C. 1961. Chitinase an addition to the list of hydrolases in the digestive tract of vertebrates. *Nature.* **192**: 135-136.
- Spindler-Barth, M., E. Shaaya, and D. Spindler. 1986. The level of chitinolytic enzymes and ecdysteroids during larval-pupal development in *Ephestia cautella* and their modifications by a juvenile hormone analogue. *Insect Biochem.* **16(1)**: 187-190.
- Lundblad G., M. Elander, J. Lind, and K. Slettongren. 1979. Bovine serum chitinase. *Eur. J. Biochem.* **100**: 455-460.
- Wadworth, 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.
- Si, S. C., Y.T. Li. 1970 Studies on the glycosidases of Jack Bean Meal. *J. Biol. Chem.* **245(19)**: 5153-5160.
- 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.
- Ohtakara, A., H. Matsunaga, and M. Mitsutomi. 1990. Action pattern of *Stereptomyces griseus* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *J. Biol. Chem.* **54(12)**: 3191-3199.
- Ohtakara, A. 1961. Studies on the chitinolytic enzymes of black-koji mold. I. Viscometric determination of chitinase activity by application of chitin glycol as a new substrate. *Agric. Biol. Chem.* **25**: 50-54.
- Watanabe, T., W. Oyanagi, K. Suzuki, and H. Tanaka. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**: 4017-4022.
- Correa, J. U., N. Elango, I. Polacheck, and E. Cabib. 1982. Endochitinase, a mannan associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **257**: 1392-1397.
- Williams, S. T., S. Lanning, and E. M. H. Wellington. 1983. The biology of the actinomycetes. Academic Press Inc. (London) LTD.P. 491-493.
- Beyer, M. and H. Diekmann. 1985. The chitinase system of *Streptomyces* sp. ATCC11238 and its significance for fungal cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*

- 23: 140-146.
24. Frndberg, E. and J. Schnrer. 1994. Evaluation of a chromogenic chito-oligosaccharide analogue, *p*-nitrophenyl- β -D-*N,N'*-diacetylchitobiose, for the measurement of the chitinolytic activity of bacteria. *J. Applied Bacteriology*. **76**: 259-263.
 25. Tominaga, Y., and Y. Tsujisaka. 1976. Purifications and some properties of two chitinases from *Streptomyces orientalis* which lyse *Rhizopus* cell wall. *Agric. Biol. Chem.* **40(12)**: 2325-2333.
 26. Skujins, J. J., H. J. Potgieter, and M. Alexander. 1965. Dissolution of fungal cell walls by a Streptomyce chitinase and β -(1 \rightarrow 3) glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 358-364.
 27. Clarke, P. H., and M. V. Tracey. 1956. The occurrence of chitinase in some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **14**: 188-196.
 28. Takiguchi, Y., N. Nagahata, and K. Shimahara. 1985. Isolation and identification of chitinolytic bacteria. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **59(3)**: 253-258.
 29. Ohtakara, A., M. Mitsutomi, and Y. Uchida. 1979. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. *J. Ferment. Technol.* **57(3)**: 169-177.
 30. Tsujisaka, Y., Y. Tominaga, and M. Iwai. 1973. Taxonomic characters and culture conditions of a bacterium which produces a lytic enzyme on *Rhizopus* cell wall, *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2517-2525.
 31. Monreal, J., and E. T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*, *Canadian. J. Microbiol.* **15**: 689-696.
 32. Yabuki, M., K. Mizushina, T. Amatatsu, A. Ando, T. Fuji, and M. Shimada. 1986. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas Hydrophila* subsp. *anaerogenes* A52. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 25-38.
 33. Dixon, M., and E. C. Webb. 1979. Enzymes. 3rd ed. Bungay Longman Ltd., London 860-862.
 34. Roberts, W. and C. Selitrennikoff. 1988. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. *J. General Microbiol.* **134**: 169-176.
 35. Hart, C. M., B. Fischer, J. M. Neuhaus, and Jr, F. Meins. 1992. Regulated inactivation of homologous gene expression in transgenic *Nicotiana sylvestris* plants containing a defense-related tobacco chitinase gene. *Mol Gen Genet.* **235**: 179-188.
 36. Cosio, I. G., R. A. Fisher, and P. A. Carroad. 1982. Bioconversion of shellfish chitin waste: Waste pretreatment, enzyme production, process design and economic analysis. *J. Food Sci.* **47**: 901-905.
 37. Hsu, S. C., and J. L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol.* **29(3)**: 422-426.
 38. Hunter-Cevera, J. C., M. E. Fonda, and A. Belt. 1986. Manual of industrial microbiol. & biotech. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 14-16.
 39. Lingappa, Y., and J. L. Lockwood, 1962. Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. *Phytopathology* **52**: 317-323.
 40. Mayfield, C. I., and W. E. Inniss. 1977. A rapid, simple method for staining bacterial flagella. *Can. J. Microbiol.* **23**: 1311-1313.
 41. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. B. Costilow, and E. W. Bester. 1981. Manual of methods for general bacteriology. American society for microbiology. pp. 411-441.
 42. Macfaddin, J. F. 1976. Biochemical tests for identification of medical bacteria. The William & Wilkins Co., Baltimore pp. 15-204.
 43. Reissig, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetyl amino sugars. *J. Biol. Chem.* **217**: 959-966.
 44. Borooah, J., D. H. Leaback, and P. G. Walker. 1961. Substrates for glucosaminidase. *J. Biochem.* **78**: 106-110.
 45. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 46. Krieg, N. R., and J. G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. vol 1, The Williams & Wilkiins, Baltimore/London.
 47. Popoff, M., and R. Lallier. 1984. Biochemical and serological characteristics of *Aeromonas*, *Methods in microbiology.* **16**: 127-145.

(Received 10 May 1996)