KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 35, No. 6, pp. 1188~1192 (2003)

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

*Arthrobacter nicotianae*에 의한 N-acetylglucosamine의 생산

장지윤 · 김인철[1] · 장해춘*
조선대학교 식품영양학과, [1]목포대학교 식품공학과

Microbial Production of N-Acetylglucosamine by *Arthrobacter nicotianae*

Ji Yoon Chang, In Cheol Kim[1] and Hae Choon Chang*
Department of Food and Nutrition, Chosun University
[1]Department of Food Engineering, Mokpo National University

Chitinase producing bacteria, *Arthrobacter nicotianae* CH4 and *A. nicotianae* CH13, were isolated from small crabs by an enrichment culture using chitin as the sole carbon source. Crude chitinases from the two isolated strains, *A. nicotianae* CH4 and *A. nicotianae* CH13, were stable in the pH range of 3.0~9.0 and in the temperature range of 20~60°C. The reducing sugar $(GlcNAc)_1$ or $(GlcNAc)_4$, corresponding to over 98% of the enzyme reaction products, was obtained. The production of functional $(GlcNAc)_1$ and $(GlcNAc)_4$ from *A. nicotianae* CH13 and *A. nicotianae* CH4, respectively, from the chitinases was useful. The chitinase system of *A. nicotianae* CH13 was supposed to be endo- and exo-chitinase, and N-acetylglucosaminidase.

Key words: chitinase, N-acetylglucosamine, *Arthrobacter nicotianae*

서 론

Chitin은 N-acetylglucosamine(GlcNAc)이 β-1,4 결합으로 중합된 고분자 물질로서 지구상에서 섬유소 다음으로 풍부하게 존재하는 biomass 자원이며, 최근 chitin 및 chitin 유도체는 식품산업, 제약산업, 농업 및 환경분야 등 많은 분야에서 이용되고 있다[1-3]. GlcNAc은 건(tendon), 인대, 연골조직, 피부, 장관막, 관절액의 결체조직과 점질막의 주요성분이 되는 화합물이다. 그러므로 GlcNAc은 관절염이나 대장염, 또는 다른 소화기관의 염증 치료제로서 효능이 있어 의약품이나 건강식품 등에 이용되고 있다[4,5].

GlcNAc은 chitin의 산가수분해에 의한 화학적 방법과 효소적 방법에 의하여 생산될 수 있다[6,7]. 화학적 분해방법은 비용이 적게 들고 조작이 간단하나 제조과정에서 발생하는 부식 및 폐수로 인한 환경오염을 일으킨다. 이에 반해 효소적 방법은 chitin으로부터 GlcNAc을 생산하는 가장 이상적인 방법이라 알려지고 있으나[7] 효소생산의 단가, 기질의 저항성, 낮은 당화율, 효소불활성화 등의 이유로 chitin으로부터 GlcNAc의 생산이 산업적 수준까지 이른 경우는 거의 없다[8].

Chitinase를 생산하는 세균으로는 *Streptomyces*, *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Serratia* 등이 알려지고 있다[9-14]. 이들 미생물 유래의 chitinase에 의한 chitin 반응산물은 $(GlcNAc)_{1\sim7}$이 혼재되어 생산되며, 반응산물 중 $(GlcNAc)_{2\sim4}$의 함량이 가장 많이 검출되고 있다[15]. Chitin을 GlcNAc으로 분해하는 효소는 chitin을 chitobiose나 chitin올리고당으로 분해하는 exo-chitinase와 endo-chitinase, 이를 GlcNAc으로 분해하는 N-acetylglucosaminidase(E.C. 3.2.1.30)에 의한 세 종류의 chitinase의 복합적 효소작용으로 알려지고 있다[16]. 그러므로 특정길이의 chitin올리고머를 얻기 위해서는 높은 활성의 endo-chitinase와 낮은 활성을 지니는 N-acetylglucosaminidase와 exo-chitinase의 적정비율의 조합이 요구된다. 반면 단량체인 GlcNAc을 생산하고자 할 때는 exo-chitinase와 N-acetylglucosaminidase의 비율이 높아야만 한다[1].

본 연구에서는 식품뿐만 아니라 의약품 등에서도 활용될 수 있는 고부가가치 식품소재의 미생물학적 생산이라는 측면에서, GlcNAc만을 주 효소생산물로 생산할 수 있는 효소시스템을 지닌 유용미생물을 분리 · 동정하고 그 효소적 특성과 그 반응산물을 조사하였다.

*Corresponding author : Hae Choon Chang, Department of Food and Nutrition, Chosun University, 375 Seosuck-dong, Gwangju 501-759, Korea
Tel: 82-62-230-7345
Fax: 82-62-225-7726
E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr

재료 및 방법

Chitinase 생산균주의 분리

게나 새우 등의 껍질을 멸균 증류수에 적당량 희석하고 상등액을 분리배지에 도말하여 30°C에서 4~5일간 배양하였다. Chitinase를 생산하는 균주의 선별은 colony를 형성한 0.4% colloidal chitin 한천배지에 0.1% congo red 용액으로 30분간 염색한 후 1 M NaCl로 15분 동안 담구어 투명환을 형성하는 chitinase 분비균주를 1차 선별하고, 이를 재배양하여 chitinase 분비능이 높은 균주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주를 액체 배양하여 chitinase 활성을 측정(Somogyi-Nelson 법)[17]하여 효소활성이 가장 높은 균주를 2종 분리하였다. 분리된 균주는 LB 액체배지에서 배양하여 대수기에 있는 배양액 동일한 부피의 50% glycerol과 함께 섞어 −70°C에서 동결 보관하여 사용하였다.

선별배지 및 colloidal chitin의 제조

사용배지는 0.4%의 colloidal chitin을 함유하고 있는 mineral 배지로서 그 조성은 colloidal chitin 4.0 g/L, K_2HPO_4 0.7 g/L, KH_2PO_4 0.3 g/L, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, $ZnSO_4$ 0.001 g/L, $MnCl_2$ 0.001 g/L가 되도록 만들었고, pH 7.0이 되도록 조정하였다. 기질로 사용된 colloidal chitin은 Lockwood 방법[18]을 변형하여 다음과 같이 조제하였다. Chitin(Partial grade, Sigma Co., C7170) 40 g에 진한 염산 550 mL를 가하여 4°C에서 1시간 동안 교반시킨 다음 2 L의 증류수를 첨가하여 염산을 여과, 제거하고 여과에 의해 얻은 침전물을 2 L의 증류수에서 1시간 교반시키고 여과액이 pH가 2.0 이상이 될 때까지 증류수로 수세 여과한 후 NaOH로 pH 7.0으로 보정하고 다시 여과와 수세를 2번 반복하였다. 여과된 침전물은 105°C에서 건조 후 막자사발에서 분쇄하여 조제하였다.

균주의 동정

분리된 균주들 중 효소적 특성이 우수하여 선별된 최종 분리균주 2종은 그람염색, 현미경관찰을 통한 형태학적 특성을 관찰하고, 16s rDNA 염기서열 분석은 한국미생물보존센터에 의뢰하여 균주 동정을 하였다.

Chitinase 활성 측정

효소활성은 Somogyi-Nelson방법[17]으로 측정하였다. 5 mL 0.4% colloidal chitin 기본배지에서 배양시킨 균배양 상징액 1 mL에 D액 {A : B = 2.5 : 1, A = Na_2CO_3, 25 g; KOOCCH(OH)CH(OH)COONa_4H_2O 25 g; $NaHCO_3$ 20 g; Na_2So_4, 200 g/L, B = $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 30 g; conc-H_2SO_4, 4방울/200 mL} 1 mL를 넣고 20분간 끓인 다음 반응액이 식으면 C액 {$(NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 25 g; conc-$H_2SO_4$, 21 mL; $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g/500 mL} 1 mL를 넣어 발색시켜 흡광도 520 nm에서 측정하였다. Chitinase의 1 unit는 20분 동안에 1 μg/mL의 GlcNAc을 생산하는 효소량으로써 나타내었다.

분리균주의 생육에 따른 chitinase의 작용

Colloidal chitin 배지에서 분리균주의 생육에 따라 chitinase의 작용에 의한 배양액내 chitin 환원당의 함량을 조사하였다. 분리균주를 100 mL의 0.1% colloidal chitin을 함유하는 minimal 배지에 0.25% glycerol, 0.05% yeast extract를 첨가한 배지에서 30°C에서 4시간 간격으로 28시간 동안 생균수를 측정하였다. 배양액 내의 생균수의 측정은 배양액으로부터 1 mL의 배양액을 취하여 10^1~10^{10}배로 희석하여 각 희석배율별로 LB배지에 100 μL씩 도말한 후, 30°C에서 배양 후 형성되는 colony를 계수하여 colony forming unit(CFU)로 나타내었다. 같은 시간대의 배양액을 취하여 배양액 내의 chitin 환원당의 함량을 측정하였다. 배양액은 9,950×g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후, 원심분리 상징액은 membrane filter(0.45 μm pore size, Millipore)로 제균한 후 chitin 환원당의 함량을 측정하고, $(GlcNAc)_1$의 함량에 따른 표준곡선으로부터 chitin 환원당의 함량을 환산하였다.

조효소액 제조 및 효소특성

분리균주를 100 mL의 0.1% colloidal chitin을 함유하는 minimal 배지에 0.25% glycerol, 0.05% yeast extract를 첨가한 배지에서 30°C에서 24시간 배양한 후 배양액을 9,950×g, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 상징액은 membrane filter로 제균한 후 곧 냉동건조하였다. 냉동건조된 상징액은 3.5 mL의 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 후 dialysis sack(Spectra/Por 6 membrane, M.W. cutoff size 1,000, Spectrum Laboratories Inc, USA)에 넣은 후 동일한 완충액을 사용하여 4°C, 하룻밤 동안 탈염시킨 후 이를 조효소액으로 사용하였다. 탈염이 끝난 조효소액은 Centricon (M.W. 3,000, Millipore Co. USA)을 사용하여 농축하였으며, 조효소액의 단백질 농도는 A_{280}에서 5.5로 일정하게 조정하여 사용하였다.

효소의 열안정성 실험은 0.1% colloidal chitin을 기질로 하여, 조효소액 0.3 mL, 10 mM phosphate buffer 0.7 mL를 가하여 20, 30, 37, 50, 60, 70, 80°C에서 각각 24시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정한 뒤 상대활성으로 나타내었다. 효소의 pH 안정성은 pH 3.0, 4.0(0.2 M acetate 완충용액), pH 6.0, 7.0(0.2 M tris-acetate 완충용액), pH 9.0, 11.0(0.2 M glycine-NaOH 완충용액) 범위에서 반응액의 pH에 따른 효소의 활성을 측정하였다. 즉 0.1% colloidal chitin을 기질로 하여 각각의 pH에서 완충용액 0.5 mL와 조효소액 0.3 mL, 3차 증류수 0.2 mL을 섞어 37°C에서 24시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

HPLC

준비된 조효소액 0.3 mL에 0.1% colloidal chitin을 기질로 하여 10 mM phosphate 완충용액(pH 7.0) 0.7 mL를 가한 효소반응액을 37°C에서 0, 12, 18, 24시간 반응시킨 후, 효소반응액에 활성탄을 넣어 100°C에서 10분간 가열하여 실활시켜 효소반응 생성물을 준비하였다. 효소반응에 의한 chitin 올리고당의 분석은 HPLC(Younglin Acme HPLC, Younglin Co., Korea)를 사용하였으며, Asahipack amino NH2P-504E(phenomenex Co., 250 mm×4.6 mm) column을 사용하여, tetrapropylammonium hydroxide(acetic acid, pH 10.0)와 acetonitrile (70 : 30)로 용출시킨 후 UV detector(UV730D,

Younglin Co., Korea)로 검정하였다. 표준시료는$(GlcNAc)_1$과 $(GlcNAc)_{1-6}$ (Seikagaku Co., Tokyo, Japan)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Chitinase 생산균주의 분리

새우나 게 껍질로부터 chitin 분해활성을 조사한 결과 colloidal chitin을 유일한 탄소원으로 하는 평판배지상에서 생육하는 균주들 중 chitinase 생산능이 우수한 균주들을 선별하였다. Colony를 형성한 분리용 colloidal chitin배지에 0.1% congo red 용액으로 30분간 처리하고 1 M NaCl용액으로 15분간 세척한 후 명확하고 커다란 투명환을 생성하는 colony를 선별하였다. 선별된 균주는 액체배양하여 chitinase 활성을 측정하여 그 중 가장 안정되고 높은 활성을 보이는 두 개의 균주, CH4과 CH13를 최종 선발하여 본 실험에서 사용하였다.

분리균주의 동정

효소활성이 우수한 분리균주 CH4와 CH13은 모두 그람양성의 단간균으로 LB 고체배지하에서 CH4는 상아색, CH13은 노란색의 colony를 형성하였다. 이들 두 균주의 16s rDNA 염기서열을 분석한 결과 CH4와 CH13은 모두 *Arthrobacter nicotianae*로 동정되었다. CH4는 *Arthrobacter nicotianae* AJ315492와 99%의 상동성을, CH13은 *Arthrobacter nicotianae* DSM20123과 98% 상동성을 나타내어, 분리된 두 개의 chitin 분해균주는 *Arthrobacter nicotianae* CH4, *Arthrobacter nicotianae* CH13으로 각각 명명하였다. 16s rDNA 염기서열을 바탕으로 본 연구에서의 분리·동정균주와 다른 유연 미생물과의 계통발생학적 관계를 Fig. 1에 나타내었다.

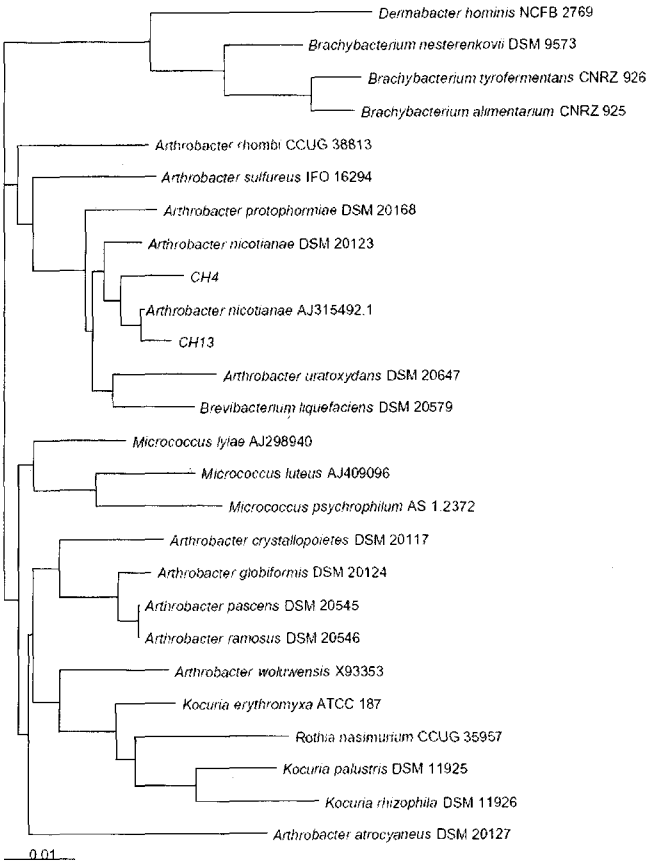

Fig. 1. Phylogenetic relationships between CH4, CH13, *Arthrobacter speices* and other related bacteria based on 16s rDNA sequences.

생육에 따른 효소작용

Colloidal chitin 배지에서 분리균주의 생육에 따라 chitinase의 작용에 의한 배양액내 chitin 환원당의 함량을 조사하였다. 균의 생육도는 배양시간에 따른 생균수로(CFU) 나타내었으며 동시에 이때의 배지내의 환원당 양을 측정하였다(Fig. 2). 100 mL의 0.1% colloidal chitin을 함유하는 minimal 배지에 0.25% glycerol, 0.05% yeast extract를 첨가한 배지에서 분리균주 *A. nicotianae* CH4는 배양 12시간만에, *A. nicotianae* CH13은 배양 16시간만에 최고의 생균수를 나타내었다 (CH4; 9.0×10^9 CFU/mL, CH13; 1.0×10^{11} CFU/mL). 그 이후 급격히 생균수가 감소하여 배양 20시간 이후에는 생균수가 더 이상 검출되지 않아 이 시기에 정지기에 도달하고 최대 총균수를 나타냄을 알 수 있었다. 효소작용에 따른 환원당 생산양은 생균수의 증가에 따라 증가하기 시작하여 배양 20시간 이후인 정지기 때 최대에 이르는 것으로 나타났다.

조효소의 특성

pH의 영향: 분리균주가 생산한 chitinase의 활성에 미치는 pH의 영향은 Fig. 3와 같다. 효소의 최대활성은 pH 5.0~7.0에서 나타내었으며, *A. nicotianae* CH4는 pH 3~11까지 *A. nicotianae* CH13은 pH 3.0~9.0까지 효소활성의 90% 이상을 유지하여 pH 안정성이 높게 나타났다. 일반적으로 *Serratia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* 등의 세균이 생성하는 chitinase 최적 pH가 4.0~7.0으로 약산성에서 중성인 것에 반하여[3,19] 본 분리균주들이 생산하는 chitinase는 pH 3.0~9.0에 이르는 넓은 pH 영역에서 90% 이상의 효소활성을 유지하며, *A. nicotianae* CH13은 pH 11에서도 효소활성을 유지하여 높은 pH 안정성을 나타내었다.

온도의 영향: 분리균주들이 생산한 chitinase의 활성에 미치는 온도의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. *A. nicotianae* CH4와 *A. nicotianae* CH13의 최적 효소활성온도는 37°C였으며, 20~60°C 구간에서 최적 효소활성의 70~90%를 유지하였다. 기존의 보고된 대부분의 chitinase의 최적온도는 40~50°C 범위였으며[3,19,20], 60°C 이상의 온도에서는 급격히 실활되는 *Pseudomonas* sp.(3), *Aeromonas salmonicida*[20], *Aromonas hydrophila*[19] 등의 보고에 비하여 본 분리균주로부터의 chitinase 2종은 모두 열안정성도 뛰어난 것으로 나타났다.

이와 같이 pH나 열안정성이 뛰어난 효소의 특성은 대량 효소생산과 이 효소를 사용한 chitin 올리고당의 생산이라는 산업적 체계에서 내구성이 뛰어난 효소로서 그 활용가치가 매우 크다.

N-Acetylglucosamine의 생산

A. nicotianae CH4와 *A. nicotianae* CH13이 분비하는 chitinase에 의한 chitin 올리고당의 생산은 0.1% colloidal

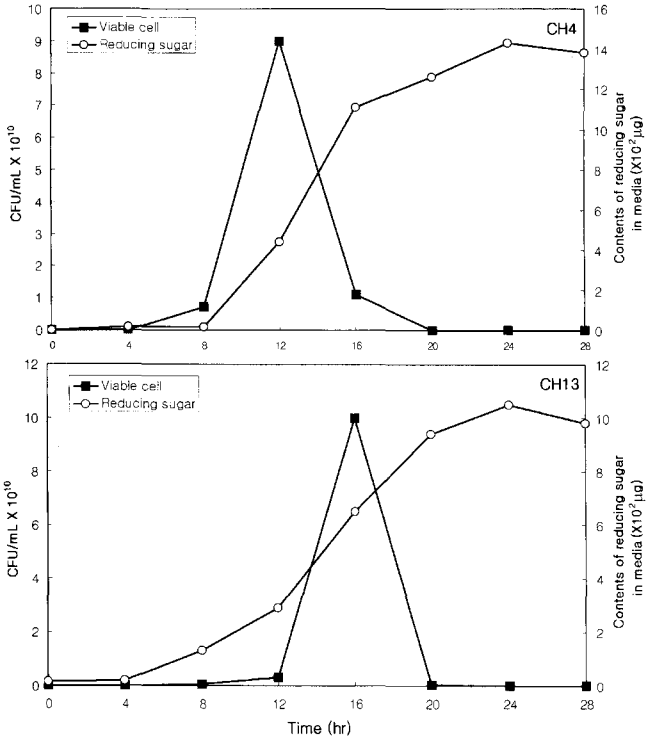

Fig. 2. Growth and chitinase production of the isolated strains, *A. nicotianae* CH4 and *A. nicotianae* CH13.

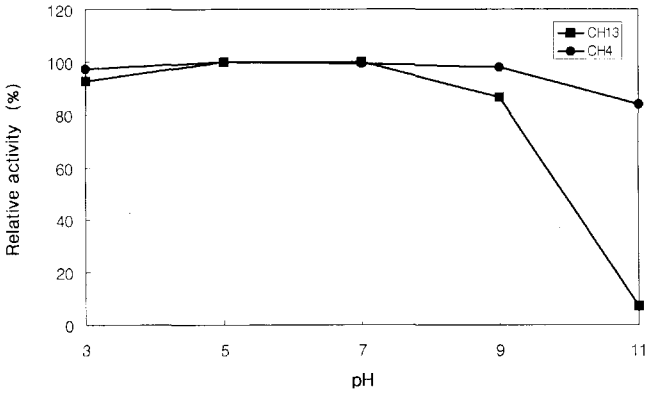

Fig. 3. Effect of pH on activity of the chitinolytic enzyme produced by the isolated strains, *A. nicotianae* CH4 and A. nicotianae CH13.
Actual value of relative activity is 100(%): 97 unit/mL for strain CH13 and 10 unit/mL for CH4.

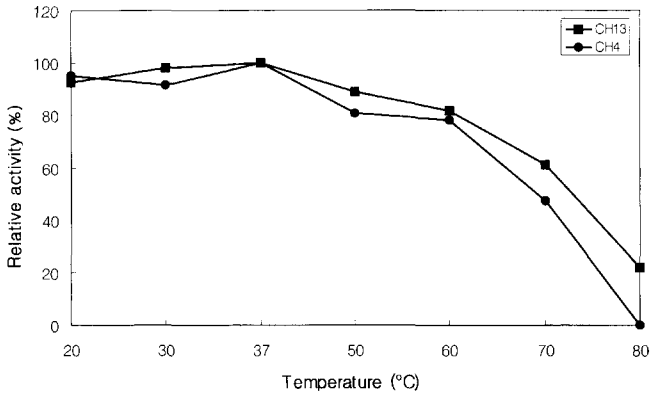

Fig. 4. Effect of temperature on activity of the chitinolytic enzyme produced by the isolated strains, *A. nicotianae* CH4 and *A. nicotianae* CH13.
Actual value of relative activity is 100(%): 97 unit/mL for strain CH13 and 10 unit/mL for CH4.

chitin 기질에 조효소액을 가하여 37°C에서 0, 12, 18, 24 시간 동안 반응시키면서 효소반응산물을 HPLC를 사용하여 분석하였다. *A. nicotianae* CH4 조효소에 의한 효소반응산물로는 $(GlcNAc)_4$가 생성되었고, *A. nicotianae* CH13의 효소반응에서는 초기반응부터 반응 18시간까지는 $(GlcNAc)_3$가 생성되었다가 24시간 이후 반응에서는 단량체인 $(GlcNAc)_1$이 생산되어 *A. nicotianae* CH13의 chitinase 조효소는 endo형 및 exo형의 chitinase와 N-acetylglucosaminidase의 세 종류를 모두 포함하고 있음을 알 수 있었다. 주요반응산물을 효소반응시간에 따라 전체 반응산물에 대한 함량 %로 Table 1에 정리하였다.

본 Table 1에서와 같이 *A. nicotianae* CH4와 *A. nicotianae* CH13로부터의 효소반응산물은 여러 가지 길이의 chitin 올리고당이 서로 다른 함량으로 혼재되어 있는 복합체가 아닌, 특정길이의 chitin 올리고당(3~4당)이나 단당만이(약 98% 이상) 반응의 주요산물로 생산되는 것으로 나타났다. 특히 *A. nicotianae* CH13가 생산하는 chitin 올리고당은 효소 반응 시간이 진행됨에 따라 다당에서 단당으로 분해되는 과정을 관찰할 수 있었다. 기존의 $(GlcNAc)_1$이 대부분 화학적 처리에 의해 생산됨에 반해 이와 같이 효소적 방법에 의해 $(GlcNAc)_1$만을 생산할 수 있는 효소체계를 지닌 유용미생물의 발굴은 $(GlcNAc)_1$의 고부가가치성 및 유용성과 본 분리균주로 부터의 효소가 지니는 pH, 온도에 대한 안정성 등의 특성을 고려할 때 그 산업적 활용 및 가치는 클 것으로 기대된다.

요 약

새우나 게 껍질로부터 chitin을 유일한 탄소원으로 하는 집적배양에 의하여 chitinase 활성이 우수한 균주를 2종 분리하

Table 1. Production of N-acetylchitooligosaccharides by the isolated microbial enzymes

Strains	Enzymatic reaction time (hr)			
	0	12	18	24
Arthrobacter nicotianae CH4	Not detectable	$(GlcNAc)_{3\text{-}4}$ 93.40%	$(GlcNAc)_4$ 96.57%	$(GlcNAc)_4$ 98.7%
Arthrobacter nicotianae CH13	Not detectable	$(GlcNAc)_3$ 94.15%	$(GlcNAc)_3$ 97.77%	$(GlcNAc)_1$ 97.47%

였다. 분리균주는 형태학적, 그람염색, 16s rDNA 서열분석을 통하여 *Arthrobacter nicotianae*로 동정되어, 각각 *Arthrobacter nicotianae* CH4와 *Arthrobacter nicotianae* CH13으로 명명하였다. 두 종의 분리균주로부터의 chitinase는 모두 pH 3.0~9.0에서 90% 이상의 효소활성을 유지하여 높은 pH안정성을 나타내었다. 온도의 영향은 20~60°C 구간에서 최적 효소 활성의 70~90%를 유지하여 열안정성도 뛰어났다. *A. nicotianae* CH4와 *A. nicotianae* CH13이 분비하는 chitinase 조효소를 0.1% colloidal chitin기질에 반응시켜서 반응산물로 생산되는 chitin 올리고당을 HPLC를 사용하여 분석하였다. *A. nicotianae* CH4 조효소에 의한 효소반응산물로는 올리고머인 $(GlcNAc)_4$이, *A. nicotianae* CH13는 단량체인 $(GlcNAc)_1$이 전체 반응산물의 각각 98% 이상 생성되었다.

감사의 글

본 연구는 지방과학기술력 향상 지원사업에 따라 과학기술부/광주광역시 지정 "전통기술 첨단화 연구실" 지원에 의한 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

문 헌

1. Patil, R.S., Ghormade, V. and Deshpande, M.V. Chitinolytic enzymes: an exploration. Enz. Microb. Technol. 26: 473-483 (2000)
2. Jeong, E.J. and Lee, Y.H. Isolation of microorganism producing chitinase for chitinoligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 187-196 (1995)
3. Lee, J.T., Kim, D.H., Do, J.H. and Kim, S.D. Purification and charaterization of chitinase from antagonistic bacteria *Pseudomonas* sp. 3098. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26: 515-522 (1998)
4. http://www. iherb. com/nag. html
5. Friedman, S.J. and Skehan, P. Membrane-active drugs potentiate the killing of tumor cells by D-glucosamine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 1172-1176 (1980)
6. Rupley, J.A. The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid and the preparation of low molecular weight substrates for lysozyme. Biochim. Biophys. Acta 83: 245-255 (1964)
7. Sakui, K., Uchiyama, T., Matahira, Y. and Nanjo, F. Immobilization of chitinolytic enzymes and continuous production of N-acetylglucosamine with the immobilized enzyme. J. Ferment. Technol. 72: 168-172 (1991)
8. Abdel-Naby, M.A. and Kwon, D.Y. Enzymatic hydrolysis of pretreated chitin by *Aspergillus carneus* chitinase. J. Microbiol. Biotechnol. 2: 197-203 (1992)
9. Beyer, M. and Diekmann, H. The chitinase system of *Streptomyces* sp. ATCC11238 and its significance for fungal cell wall degradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 140-146 (1985)
10. Clarke, P.H. and Tracey, M.V. The occurrence of chitinase in some bacteria. J. Gen. Microbiol. 14: 188-196 (1956)
11. Takiguchi, Y., Nagahata, N. and Shimahara, K. Isolation and identification of chitinolytic bacteria. Nippon Nogeikagaku Kaishi 59: 253-258 (1985)
12. Ohtakara, A., Mitsutomi, M. and Uchida, Y. Purification and some properties of chitinase from *Vibrio* sp. J. Ferment. Technol. 57(30): 169-177 (1979)
13. Monreal, J. and Reese, E.T. The chitinase of *Serratia marcescens*. Can. J. Microbiol. 15: 689-696
14. Yabuki, M., Mizushina, K., Amatatsu, T., Ando, A., Fuji, T. and Shimada, M. Purification and characterization of chitinase and chitobiase produced by *Aeromonas hydrophila* subsp. *anaerogenes* A52. J. Gen. Appl. Microbiol. 32: 25-38 (1986)
15. Lopatin, S.A., Ilyin, M.M., Pustobaev, V.N., Bezchetinikova, Z.A., Varlamov, V.P. and Davankov, V.A. Mass-spectrometric analysis of N-acetylchitooligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of chitosan. Anal. Biochem. 227: 285-288 (1995)
16. Bade, M.C. and Hicky, K. Classification of enzymes hydrolyzing chitin, pp. 179-183. In: Chitin and Chitosan. Skjaek-Braek, G., Anthosen, T. and Sandford, P. (eds.). Elsevier Applied Science, London, UK (1989)
17. Nelson, N.A. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380 (1944)
18. Hsu, S.C. and Lockwood, L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water soil. Appl. Microbiol. 29: 422-426 (1975)
19. Kim, K.Y., Lee, C.Y. and Lee, K.H. Isolation of *Aeromonas hydrophila* and chitinolytic properties. Korean J. Appl. Microbiol. Biotech. 25: 151-158 (1997)
20. Lee, K.P. Kim, C.N., Yu, J.H. and Oh, D.H. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. Korean J. Appl. Microbiol. Biotech. 18: 599-606 (1990)

(2003년 10월 10일 접수; 2003년 11월 24일 채택)