

생물방제균 *Pseudomonas* sp. 30980 생산하는 Chitinase의 정제 및 특성

이종태* · 김동환¹ · 도재호 · 김상달¹

한국인삼연초연구원 제품개발부, ¹영남대학교 응용미생물학과

Purification and Characterization of Chitinase from Antagonistic Bacteria *Pseudomonas* sp. 3098. Lee, Jong-Tae*, Dong-Hwan Kim¹, Jae-Ho Do, and Sang-Dal Kim¹. Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea, ¹Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea - Plant root rotting fungi, *Fusarium solani* are suppressed their growth by the chitinase which is produced from the antagonistic soil bacteria. The chitinase producible antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 3098 was selected as a powerful biocontrol agent of *F. solani* from ginseng rhizosphere. The antagonistic *Pseudomonas* sp. 3098 was able to produce a large amount of extracellular chitinase which is key enzyme in the decomposition of fusarial hyphal walls. The chitinase was purified from cultural filtrate of *Pseudomonas* sp. 3098 by the procedure of ammonium sulfate precipitation, anion exchange chromatography, gel filtration on Bio-Gel P-100, and 1st and 2nd hydroxyapatite chromatography. The molecular mass of the purified enzyme was ca. 45 kDa on SDS-PAGE. The optimal pH and temperature for the activity of purified chitinase were 5.0 and 45°C, respectively. The enzyme was stable in pH range of 5.0 to 9.0 up to 50°C. The enzyme was significantly inhibited by metal compounds such as FeCl₂, AgNO₃, and HgCl₂, and was slightly inhibited by *p*-CMB, iodoacetic acid, urea, 2,4-DNP and EDTA. The enzyme had ability of digestion on colloidal chitin and chitin from shrimp shell, but could not digest chitosan and chitin from crab shell. *K_m* value of the enzyme was 0.11% on colloidal chitin, and the maximum hydrolysis rate of the enzyme was 34% on colloidal chitin.

Key words: antagonistic bacteria, *Pseudomonas* sp. 3098, chitinase, purification, characteristics

토양전염성 식물진균병의 방제를 위해 사용되는 화학 농약의 폐해를 줄이기 위해 생물학적 방제법이 연구되고 있다. 식물병원성 진균에 대한 방제기작으로 항진균성 항생물질 이외에 진균외막의 주성분인 chitin을 분해하는 chitinase에 의한 방제기작도 중요하다.

Chitin은 *N*-acetyl-D-glucosamine(Glc NAc)이 β-1,4 결합으로 중합된 고분자물질로서, 게, 새우 등의 갑각류 및 연체류의 껍질과 근육, 그리고 곤충류, 버섯류 및 사상균의 세포벽 등에 함유되어 있다. 연간 생산량은 100억 톤 정도로 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 많이 생산되고 있는 biomass 자원이며, 최근 chitin 및 chitin 유도체는 식품산업, 제약산업, 농업 및 환경분야 등 많은 분야에 서 이용되고 있다[8, 12, 14].

Chitinase(EC 3.2.1.14)는 chitin의 β-1,4-glucosidic 결합을 가수분해하는 효소이며, 작용기작에 따라 chitin 및 chitodextrin의 β-1,4-glucosidic 결합을 무작위로 절단하는 endo형 chitinase, chitobiose를 단량체인 *N*-acetyl glucosamine으로 분해하는 *N*-acetyl glucosaminidase, 그리고 chitin 사슬의 비환원성 말단으로부터 이당체인

diacetyl chitobiose 또는 그 이상의 단위체로 절단하는 exo형 chitinase 등 세 종류가 알려져 있다[3, 9].

Chitinase를 생산하는 미생물로는 *Serratia*[20], *Streptomyces*[7, 11, 28], *Pseudomonas*[14, 16], *Aeromonas* [15, 30], *Bacillus*[19, 31, 32], *Acinetobacter*[24] 등의 세균과 *Trichoderma*, *Aspergillus*[9], *Penicillium* 등의 곰팡이가 있으며, 동식물[1, 29], 곤충, 어패류 등에 넓게 분포하여 있는 것으로 알려져 있다[6]. 최근에는 chitinase 유전자에 관한 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있으며, 현재까지 수십종의 유전자가 cloning 되었다[23].

Chitinase의 분리·정제 및 특성에 관한 연구는 국내 외적으로 많이 보고되어 있으며, 분리·정제 방법으로는 affinity chromatography법과 이온교환수지 chromatography 방법이 주로 이용되고 있다. 일반적으로 chitinase의 최적 pH는 4.0~7.0, 최적온도는 40~50°C인 것으로 알려져 있으며, 그 외의 특성들은 균종에 따라 큰 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다[9, 10].

최근 곰팡이, 세균, 식물체에서의 chitinase의 역할이 규명되면서 이들 사이의 생태적 상호작용에 chitinase가 중요하게 관여하고 있다는데에 큰 관심을 가지게 되었고, chitinase에 의한 식물병원성 진균이 함유한 chitin 성분의 효소적 분해는 작물의 병해를 막는 생물학적 방

*Corresponding author
Tel. 82-42-866-5346, Fax. 82-42-866-5345
E-mail: jtlee@gtr.kgtri.re.kr

제에 효과적인 방법으로 알려져 있다[16, 21, 25]. 따라서 이러한 목적에 적합한 미생물 유래의 chitinase가 분리·정제되었고, 이의 효소적 특성이 조사되어져 오고 있다.

본 연구에서는 식물근부균 *F. solani*에 의한 뿌리썩음병을 억제하는 생물방제균의 구체적 방제기작을 구명하고자 식물병원성 진균의 생육을 억제하는 길항미생물로 분리, 동정된 *Pseudomonas* sp. 3098이 생산하는 chitinase를 분리·정제하였으며, 그 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

균주는 영남대학교 응용미생물학과 미생물유전학 교실에서 분리, 동정하여 보관중인 *Pseudomonas* sp. 3098를 분양받아 사용하였다. 균주의 보관은 Luria broth에 agar 15 g/l를 첨가한 plate에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

사용배지 및 colloidal chitin의 제조

Pseudomonas sp. 3098로부터 효소를 생산하기 위한 배지조성은 glucose 5 g/l, peptone 2 g/l, colloidal chitin 2 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l 그리고 NaCl 0.5 g/l가 되도록 만들었고, pH 7.0이 되도록 조정하였다.

Colloidal chitin은 Jeuniaux[10]의 방법에 따라 제조하였다.

Chitinase의 활성측정

효소활성은 colloidal chitin을 기질로 하여 DNS방법[18]으로 측정하였다. 0.2M acetate buffer(pH 5.0) 0.6 ml, 0.8% colloidal chitin 0.2 ml 및 효소용액 0.2 ml를 가하여 50℃에서 2시간 동안 진탕하면서 반응시켰다. DNS용액 1 ml를 첨가하여 효소반응을 정지시키고 100℃에서 5분간 가열한 후 냉각시켰다. 여기에 증류수 8 ml를 가하고 혼합시킨 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 환원당을 정량하였다. Chitinase의 1 Unit는 1시간 동안에 1 μ M의 glucose를 생산하는 효소량으로써 나타내었다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry법[17]으로 정량하였으며, 정제과정 중 용출분획의 단백질량은 280 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였다.

조효소액의 조제

균주를 효소생산배지에 접종하여 30℃에서 200 rpm

으로 4일간 진탕배양한 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상침액을 회수하였다. 여기에 황산암모늄을 90% 포화시켜 4℃에서 12시간 방치한 후 10,000 g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 증류수로 투석하고 PEG로 농축시킨 것을 -20℃에서 냉동보관하면서 조효소액으로 사용하였다.

효소의 정제

조효소액을 5 mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 평형화시킨 DEAE-cellulose column(21×70 mm)에 흡착시킨 뒤 NaCl농도를 0~0.4M까지 단계적으로 증가시키면서 18 ml/hr의 유속으로 용출시킨 다음 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하였다. 농축액을 증류수로 평형화시킨 Bio-Gel P-100 column(16×700 mm)에 주입하고 8 ml/hr의 유속으로 겔여과한 뒤 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하였다. 농축액을 10 mM potassium phosphate buffer(pH 6.8)로 평형화시킨 hydroxyapatite column(50% celite함유, 22×70 mm)에 흡착시킨 뒤 potassium phosphate buffer농도를 10 mM에서 200 mM까지 농도구배시키면서 8 ml/hr의 유속으로 용출시킨 다음 효소활성이 있는 분획을 모아 농축하였다. 농축액을 상기와 동일한 방법으로 2차 hydroxyapatite column chromatography를 실시하였다. 2차 hydroxyapatite column chromatography에는 buffer의 농도를 50 mM에서 200 mM까지 다르게 농도구배시켜 용출시킨 다음 효소활성이 있는 분획을 모았다.

효소정제의 전 과정은 4℃의 냉장실에서 행하였다. 효소정제과정 중의 활성분획의 농축에는 PEG를 사용하였고, 정제효소의 순도검증을 위한 농축에는 ultrafilter(10,000 NMWL, Millipore Corp.)를 사용하였다.

전기영동

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli[13]의 방법에 따라 7.5% gel를 사용하여 20 mA에서 행하였다. 전기영동한 후 gel은 0.125% Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하고 탈색용액(40% Methanol:10% Acetic Acid)으로 탈색시켜 밴드를 확인하였다.

정제효소의 특성

pH의 영향 pH 3.0~6.0은 0.1M citric acid-sodium citrate완충액으로 pH 6.0~8.0은 0.1M Clark-Lubs 완충액[5]으로 pH를 각각 다르게 조정한 다음 50℃에서 2시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 반응 최적 pH를 검토하였고, 효소액(10 μ g/ml) 0.5 ml에 pH 3.0~8.0은 MaIlvaine 완충액[5], pH 8.0~10.0은 0.1M Clark-Lubs 완충액[5] 0.5 ml를 첨가하여 30℃에서 24

시간 전처리한 다음 효소의 잔존활성도를 측정하여 효소의 pH 안정성을 검토하였다.

온도의 영향 0.8% colloidal chitin 용액 0.2 ml, 0.2 M acetate 완충액(pH 5.0) 0.6 ml 및 정제효소액(10 µg/ml) 0.2 ml를 반응조성물로 하여 30~60°C 범위에서 10°C 간격으로 2시간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 반응최적온도를 검토하였고, 효소의 열안정성은 50°C, 60°C 및 70°C에서 효소액을 보관하면서 경시적으로 효소의 잔존활성도를 측정하여 검토하였다.

금속이온 및 화학물질의 영향 0.2M acetate 완충액(pH 5.0) 에 용해시킨 MgSO₄, CoCl₂ 등의 금속염 및 각종 화학물질을 효소용액(20 µg/ml)에 최종농도가 1 mM 이 되게 첨가하고 40°C에서 30분간 전처리 시킨 후 효소의 잔존활성도를 측정하여 금속이온 및 각종 화학물질이 효소활성에 미치는 영향을 검토하였다.

기질특이성 Chitin(crab shell, shrimp shell) 2종, chitosan(crab shell), glycol chitosan, α-cellulose, soluble starch을 기질로 사용하였다. 0.8%의 각종 기질 0.2 ml, 0.2M acetate 완충액(pH 5.0) 0.6 ml 및 효소용액(10 µg/ml) 0.2 ml를 반응조성액으로 하여 50°C에서 2시간 반응시킨 후 상대활성을 측정하여 검토하였다.

Michaelis 정수 최종농도 0.02~0.32%의 colloidal chitin을 기질로 사용하여 50°C에서 10분간 반응시킨 다음 Lineweaver-Burk법에 의하여 Km값을 구하였다.

분해율 0.2M acetate 완충액(pH 5.0) 0.2 ml에 효소용액(50 µg/ml) 0.4 ml 및 0.8% colloidal chitin 용액 0.4 ml를 첨가하고 50°C에서 24시간까지 일정시간별로

반응시킨 후 유리된 환원당의 양을 N-acetyl-D-glucosamine으로 환산한 값과 기질(colloidal chitin)첨가량과 같은 양을 산분해하여 N-acetyl-D-glucosamine으로 정량한 총량을 100으로 한 값을 비교하여 분해율을 구하였다.

결과 및 고찰

Chitinase의 정제 및 분자량

Pseudomonas sp. 3098의 배양여액을 90%황산암모늄으로 침전시켜 조효소액을 얻고, 조효소액을 DEAE-cellulose column chromatography(Fig. 1), Bio-Gel P-100에 의한 겔여과(Fig. 2), 1차 및 2차 Hydroxyapatite column chromatography(Fig. 3, 4)과정을 거쳐 chitinase를 정제하였다. 정제과정을 요약한 결과는 Table 1과 같다. 정제효소의 정제도는 배양여액에 비해 15.7배 증가하였고, 회수율은 5.8%로 나타났다.

정제효소의 순도 및 분자량을 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 확인한 결과는 Fig. 5와 같이 단일밴드를 나타내었으며, 분자량은 45 kDa으로 추정되었다.

정제효소의 특성

pH의 영향 *Pseudomonas* sp. 3098이 생산하는 chitinase의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 6과 같이 pH 5.0에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *Serratia marcescens*[20], *Streptomyces griseus*[2], *Bacillus licheniformis*[26] 등이 생산하는 대부분의 chitinase 최적 pH가 4.0~7.0으로 약산성인 것처럼 본 균주가

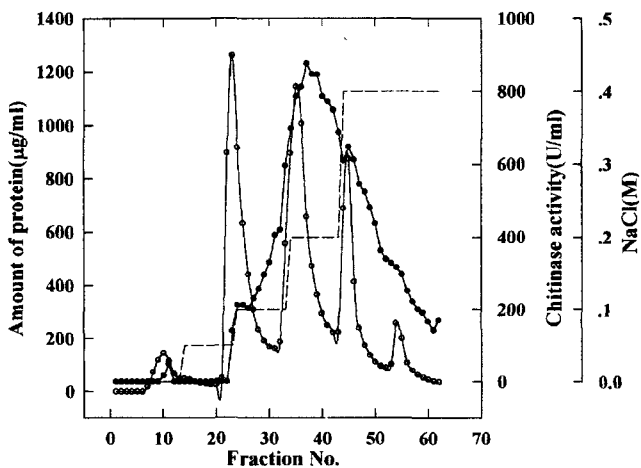


Fig. 1. Ion exchange chromatography of chitinase on DEAE-cellulose column. The column (2.1×7 cm) was equilibrated with 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2). The enzyme adsorbed was eluted by a stepwise elution of NaCl concentration in 5 mM Tris-HCl buffer solution at the flow rate of 18 ml/hr, and the 3 ml fraction was collected. —○—, Protein amount; —●—, Chitinase activity; ·····, NaCl concentration.

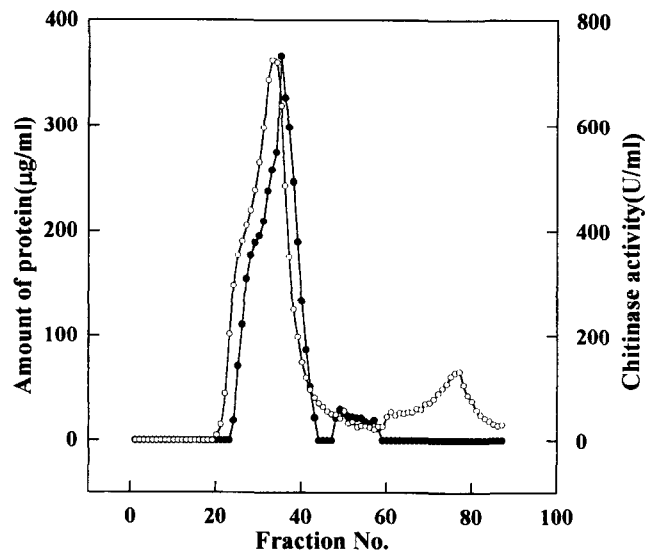


Fig. 2. Gel filtration of chitinase on Bio-Gel P-100. The column (1.6×70 cm) was eluted at the flow rate of 8 ml/hr with distilled water, and the 2 ml fraction was collected. —○—, Protein amount; —●—, Chitinase activity.

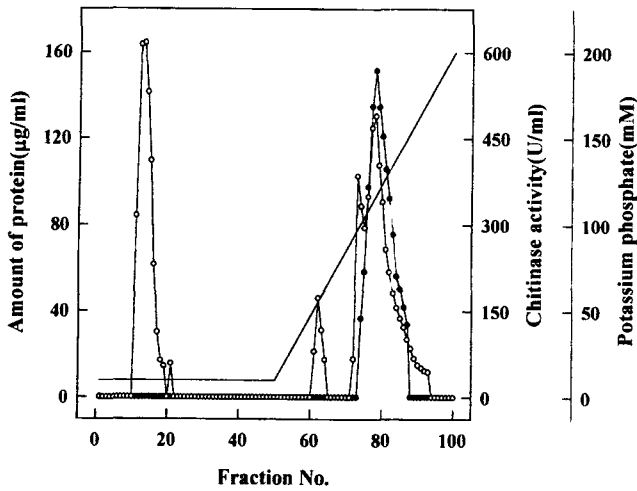


Fig. 3. 1st hydroxyapatite column chromatography of chitinase. The column (2.2×7.0 cm) was equilibrated with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8). The enzyme absorbed eluted by a linear gradient of potassium phosphate concentration at the flow rate 8 ml/hr, and the 2 ml fraction was collected. —○—, Protein amount; —●—, Chitinase activity; —, Concentration of potassium phosphate buffer (pH 6.8).

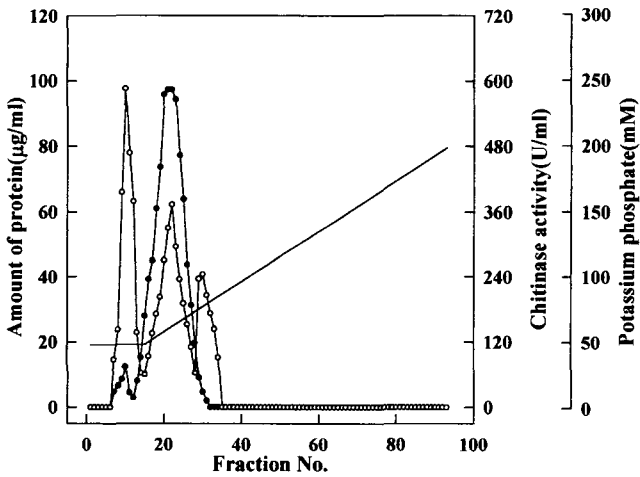


Fig. 4. 2nd hydroxyapatite column chromatography of chitinase. The column (2.2×4.0 cm) was equilibrated with 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8). The enzyme absorbed eluted by a linear gradient of potassium phosphate concentration at the flow rate of 12 ml/hr, and the 1.5 ml fraction was collected. —○—, Protein amount; —●—, Chitinase activity; —, Concentration of potassium phosphate buffer (pH 6.8).

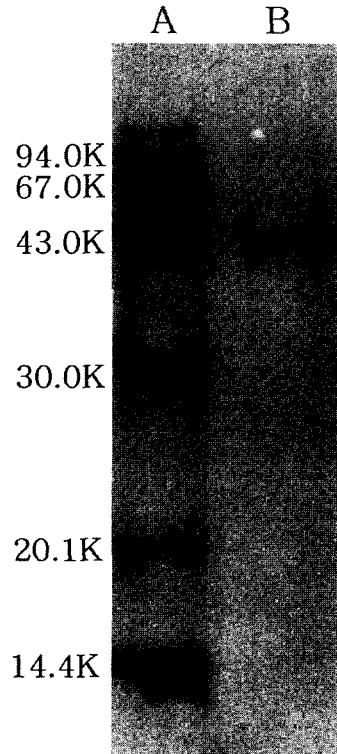


Fig. 5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of purified chitinase. The purified enzyme was electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide slab gel with 0.1% SDS. Lane A, Molecular mass markers (in kDa). Lane B, Purified chitinase.

생산하는 chitinase의 최적 pH 5.0도 약산성으로 거의 일치하였다.

Pseudomonas sp. 3098이 생산하는 chitinase의 pH 안정성을 검토한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같이 pH 5.0~9.0까지의 범위에서 80% 이상의 잔존활성도를 나타내었다. pH 3.0에서는 약 50%, pH 4.0에서는 약 75%의 잔존활성도를 나타내었으나, pH 10.0에서는 급격히 실패되어 약 40%의 잔존활성도를 나타내었다.

온도의 영향 *Pseudomonas* sp. 3098이 생산하는 chitinase의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 8과 같이 45°C에서 최대활성을 나타내었다. 이는 *B. licheniformis*[26], *Streptomyces thermoviolaceus*[28] 등

Table 1. Summary of the purification of the chitinase from *Pseudomonas* sp. 3098

Purification step	Total Protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Culture filtrate	1,963.4	12,095.4	6.2	-	100.0
Salting out and dialysis	861.3	9,917.5	11.5	1.85	82.0
DEAE-cellulose chromatography	196.2	4,626.3	23.6	3.81	38.2
BIO-GEL P-100 gel filtration	121.5	3,701.2	30.5	4.92	30.6
1st Hydroxyapatite chromatography	20.6	1,521.3	73.8	11.90	12.6
2nd Hydroxyapatite chromatography	7.2	702.5	97.6	15.74	5.8

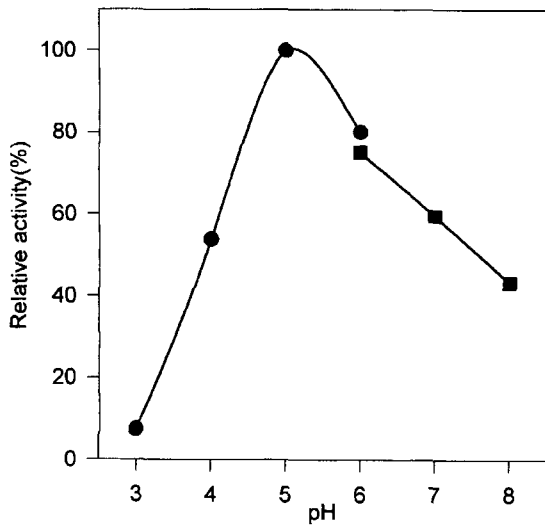


Fig. 6. Effect of pH on activity of the purified chitinase.
 ● : 0.1 M Citric acid-sodium citrate buffer,
 ■ : 0.1 M Clark and Lubs buffer.

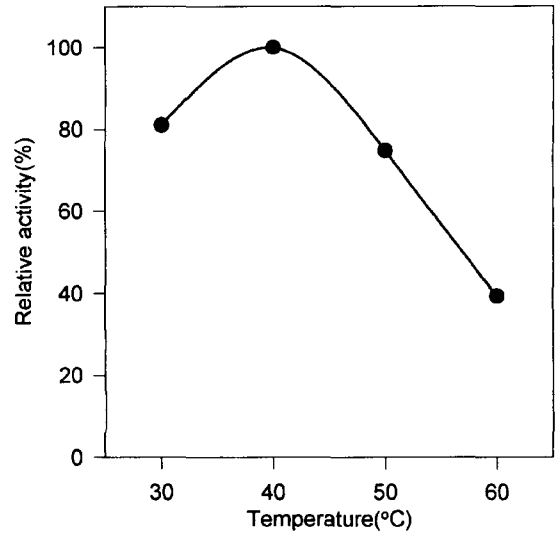


Fig. 8. Effect of temperature on activity of the purified chitinase.

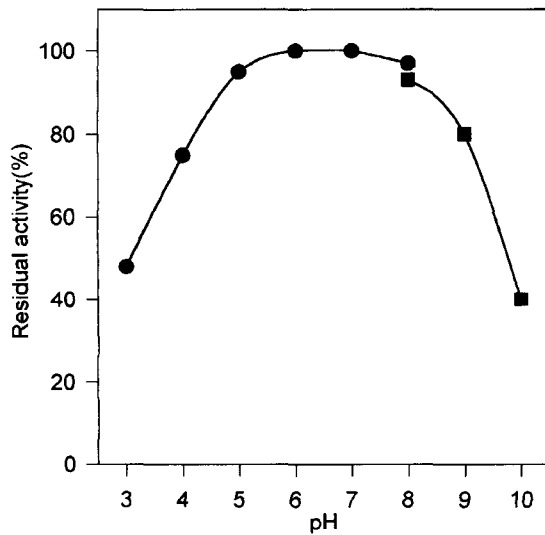


Fig. 7. pH stability of the purified chitinase.
 ● : 0.1 M Citric acid-0.2 M Na₂HPO₄ buffer
 ■ : 0.1 M Clark and Lubs buffer.

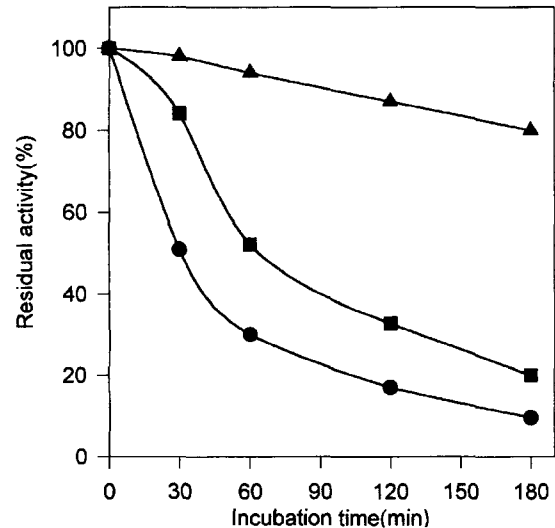


Fig. 9. Thermal stability of the purified chitinase.
 ● : 70°C, ■ : 60°C, ▲ : 50°C

이 생산하는 호열성 효소의 최적온도 70~80°C와는 상당한 차이를 보이나, *Aeromonas salmonicida*[15], *Aspergillus* sp.[9] 등이 생산하는 대부분의 chitinase 최적온도 40~50°C와 일치하였다.

Pseudomonas sp. 3098이 생산하는 chitinase의 열에 대한 안정성을 검토한 결과는 Fig. 9와 같다. 50°C에서 3시간 열처리로 약 80%이상의 잔존활성을 나타내었으며, 70°C에서 30분간 또는 60°C에서 1시간 열처리로 약 50%의 잔존활성을 나타내었다. 이는 *Streptomyces orientalis* [27]가 생산하는 chitinase의 경우 70°C에서 15분간, *Aeromonas salmonicida*[15]가 생산하는 chitinase의 경우

60°C 이상의 열처리로 효소활성이 거의 실패하는 것에 비해 열에 대한 안정성이 비교적 크다는 것을 알 수 있었다.

금속이온의 영향 효소활성에 미치는 각종 금속염의 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같이 단백질 변성제인 Hg²⁺ 이온에 의해 약 72%가 실패되었고, Fe²⁺ 및 Ag⁺ 이온에 의해 약 50%가 실패되었으나, 시험한 그외 이온들은 효소활성에 영향을 주지 않았다. 임 등[16]은 *Pseudomonas stutzeri*가 생산하는 chitinase의 경우 효소활성이 Co²⁺ 이온 1 mM 농도에서 약 40% 증가하였다고 보고하였으나, 본 효소에서는 Co²⁺ 이온이 activator로 작용하지 않음을 나타내었다.

Chelate제, 효소저해제 등 화학물질의 영향 효소활성

Table 2. Effect of metal ions on the chitinase activity from *Pseudomonas* sp. 3098

Metal ions	Residual activity (%)
None	100.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	83.4
CoCl ₂ · 6H ₂ O	80.8
CuSO ₄ · 5H ₂ O	97.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	87.0
FeCl ₂ · 6H ₂ O	48.1
HgCl ₂	28.1
CaCl ₂	94.4
KCl	100.0
MnSO ₄ · χ H ₂ O	95.8
AgNO ₃	43.6
Pb(CH ₃ COO) ₂	91.1

Table 3. Effect of chemicals on the chitinase activity from *Pseudomonas* sp. 3098

Chemicals	Residual activity (%)
None	100.0
NaF	91.9
<i>p</i> -DMBA	101.5
SDS	102.0
Urea	78.4
Na ₂ HAsO ₄	91.1
<i>p</i> -CMB	72.9
2,4-DNP	79.0
<i>o</i> -Phenanthroline	89.5
Iodoacetic acid	73.7
EDTA-2Na	83.4

**p*-DMBA; *p*-dimethylaminobenzaldehyde, SDS; sodium dodecyl sulfate, *p*-CMB; *p*-chloromercuribenzoate, 2,4-DNP; 2,4-dinitrophenol, EDTA; ethylene diamine tetra acetate.

에 미치는 각종 화학물질의 영향을 검토한 결과는 Table 3과 같이 organic mercurial이고 단백질 구조내에 -SH group에 고도의 친화성을 가지고 있으며 -SH group enzyme inhibitor로 알려진 *p*-CMB는 일반적으로 10⁻⁵ M에서 효소활성을 저해하는 것으로 알려져 있는데[4], 본 실험에서는 10⁻³ M에서 약 27% 효소활성을 저해하였다. 또한 halogenated alkylating agent인 iodoacetic acid는 일반적으로 10⁻³ M에서 효소활성을 저해하는 것으로 알려져 있는데[4], 본 실험에서도 10⁻³ M에서 26% 정도 효소활성을 저해하였다. 또한 urea, 2,4-DNP 및 금속염 chelate제인 EDTA는 약 20%내외의 효소활성을 저해하였다. 시험한 그외 화학물질들, 즉 anionic detergent인 SDS 및 각종 효소저해제 등은 효소활성에 거의 영향을 미치지 않았다.

기질특이성

각종 기질을 선정하여 기질특이성을 조사한 결과는

Table 4. Substrate specificity of the chitinase from *Pseudomonas* sp. 3098

Substrates	Relative activity
Colloidal chitin	100
Chitin (shrimp shell)	43.3
Chitin (crab shell)	0
Chitosan (crab shell)	2.0
Glycol chitosan	0
α -Cellulose	4.0
Soluble starch	2.6

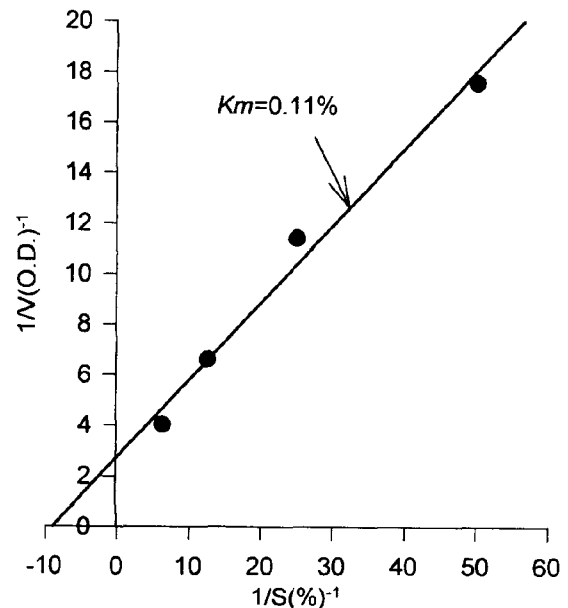
**Fig. 10. Lineweaver-Burk plots for the determination of K_m value of chitinase.**

Table 4와 같다. 본 효소는 colloidal chitin 및 shrimp shell 유래의 chitin은 분해하였으나, crab shell 유래의 chitin과 chitosan, glycol chitosan, α -cellulose 및 soluble starch는 분해하지 못하였다.

Michaelis 정수

Lineweaver-Burk 방법으로 본 효소의 colloidal chitin에 대한 K_m 값을 측정한 결과는 Fig. 10과 같이 본 효소의 K_m 값은 0.11%로 계산되었다.

이 등[15]은 *Aeromonas salmonicida*가 생산하는 chitinase의 colloidal chitin에 대한 K_m 값이 0.13%라고 보고하였는데, 본 효소도 이와 유사한 K_m 값을 나타내었다.

분해율

본 효소의 colloidal chitin에 대한 분해율을 측정한 결과는 Fig. 11과 같이 10분 반응시 약 18%, 1시간 반응시 약 25%의 분해율을 보였으며, 24시간 반응시 최대분해율이 34%였다.

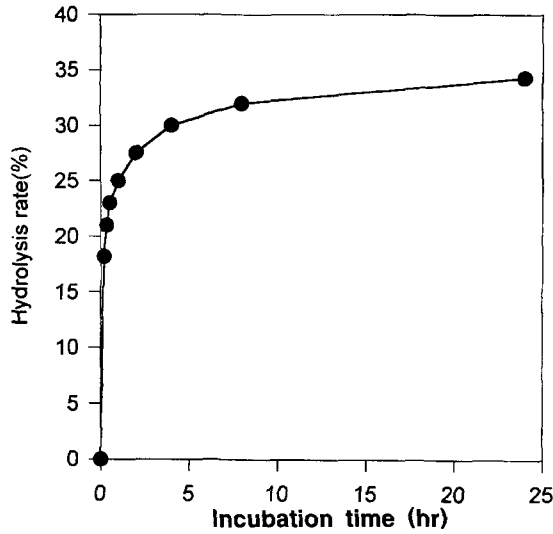


Fig. 11. Progressive curve of colloidal chitin hydrolysis by the chitinase.

요 약

길항미생물로 분리·동정된 *Pseudomonas* sp. 3098이 생산하는 chitinase를 황산암모늄 침전, DEAE-cellulose column chromatography, Bio-Gel P-100에 의한 겔여과, 1차 및 2차 hydroxyapatite column chromatography 과정을 거쳐 회수율 5.8%, 정제도 15.7배의 정제효소를 얻었고, 효소의 순도는 SDS-PAGE로 확인하였으며, 분자량은 45 kDa으로 추정되었다. 정제된 chitinase의 최적 온도와 pH는 45°C와 5.0이었고, 정제효소는 pH 5.0~9.0 사이에서 안정하였고, 50°C, 3시간 및 60°C, 30분까지는 비교적 안정하였다. 금속염 및 화학물질의 영향을 조사한 결과 Fe²⁺, Ag¹⁺ 및 단백질변성제인 Hg²⁺ 이온에 의해 효소활성이 크게 저해되었고, p-CMB, iodoacetic acid, urea, 2,4-DNP 및 EDTA에 의해 효소활성이 약간 저해되었다. 기질특이성을 조사한 결과 colloidal chitin 및 shrimp shell 유래의 chitin은 분해가능하였으나 crab shell 유래의 chitin, chitosan 등은 분해하지 못하였다. Colloidal chitin에 대한 본 효소의 Km 값은 0.11%였고, 분해율은 24시간 반응시 34%였다.

감사의 글

본 연구는 1996-1997년 농림부 특정연구비 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Araki, T., M. Kuramoto, and T. Torikata. 1995. Purification of three acidic chitinases from yam aerial tuber. *Ap-*

plication of quaternary ammonium ion detergent for the separation of yam chitinase from viscous tissue extract. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(3): 430-434.

2. Beger, L. R. and D. H. Reynolds. 1958. The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta* **29**: 522-534.

3. Berman, T. E. 1969. *Enzyme Handbook*, Vol II, pp. 570-571. Springer-Verlag, Berlin.

4. Dawson, Rex M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones. 1986. *Data for Biochemical Research*(3rd ed.), pp. 316-335. Oxford Science Publications, Oxford.

5. Dawson, Rex M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones. 1986. *Data for Biochemical Research*(3rd ed.), pp. 426-441. Oxford Science Publications, Oxford.

6. Flach, J., P. E. Pilet, and P. Jolles. 1992. What's new in chitinase research? *Experientia* **48**: 701-716.

7. Hong, Y. K. and J. H. Seu. 1979. Purification and properties of an extracellular chitinase from *Streptomyces* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **7**(3): 149-153.

8. Jeon, Y. J., E. H. Lee, and S. K. Kim. 1996. Bioactivities of chitin and chitosan(I). *Korean Journal of Chitin and Chitosan* **1**(1): 4-13.

9. Jeong, E. J. and Y. H. Lee. 1995. Isolation of microorganism producing chitinase for chitoooligosaccharides production, purification of chitinase, and its enzymatic characteristics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**(2): 187-196.

10. Jeuniaux, C. 1966. *Methods in Enzymology* **8**, pp. 644-650. Academic Press, New York.

11. Kim, K. H. and J. H. Seu. 1979. Studies of the production and properties of chitinase produced by *Streptomyces* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **6**(4): 149-153.

12. Kim, S. K. 1996. Synthetic techniques of chitin and chitosan derivatives and their analytical methods. *Korean Journal of Chitin and Chitosan* **1**(1): 20-47.

13. Laemmli, J. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

14. Lee, H. S., H. J. Lee, S. W. Choi, S. Her, and D. H. Oh. 1997. Purification and characterization of antifungal chitinase from *Pseudomonas* sp. YHS-A2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**(2): 107-113.

15. Lee, K. P., C. N. Kim, J. H. Yu, and D. H. Oh. 1990. The production and purification of chitinase from *Aeromonas salmonicida* YA7-625. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**(6): 599-606.

16. 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**(2): 134-140.

17. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

18. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent

- for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**(3): 426–428.
19. Mitsutomi, M., H. Kidoh, H. Tomita, and T. Watanabe. 1995. The action of *Bacillus circulans* WL-12 chitinases on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(3): 529–531.
20. Monreal, J. and E. T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol.* **15**: 689–696.
21. Ohta, M., T. Yamagami, and G. Funatsu. 1995. Purification and characterization of two chitinase from the leaves of pokeweed (*Phytolacca americana*). *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(4): 656–661.
22. 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. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(8): 1586–1587.
23. Shin, W. C., D. S. Lee, J. G. Kim, and S. D. Hong. 1995. Molecular cloning of *Acinetobacter* sp. WC-17 gene encoding chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**(2): 87–91.
24. Shin, W. C., D. S. Lee, T. H. Kim, J. H. Woo, J. M. Lee, J. G. Kim, and S. D. Hong. 1995. Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. WC-17 producing chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**(2): 80–86.
25. St Leger, R. J., R. M. Cooper, and A. K. Charnley. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Regulation of production of chitinolytic enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 1509–1517.
26. Takayanagi, T., K. Ajisaka, Y. Takiguchi, and K. Shimahara. 1991. Isolation and characterization of thermostable chitinases from *Bacillus licheniformis* X-7u. *Biochem. Biophys. Acta* **1078**: 404–410.
27. 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**: 2325–2333.
28. Tsujibo, H., K. Minoura, K. Miyamoto, H. Endo, M. Moriwaki, and Y. Inamori. 1993. Purification and properties of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(2): 620–622.
29. Tsukamoto, T., D. Koga, A. Ide, T. Ishibashi, M. H. Matsushige, K. Yagishita, and T. Imoto. 1984. Purification and some properties of chitinases from yam, *Dioscorea opposita thumb.* *Agric. Biol. Chem.* **48**(4): 931–939.
30. Ueda, M., A. Fujiwara, T. Kawaguchi, and M. Arai. 1995. Purification and some properties of six chitinases from *Aeromonas* sp. No. 10S-24. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**(11): 2162–2164.
31. 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**(7): 4017–4022.
32. Woo, C. J., U. J. Yun, and H. D. Park. 1996. Isolation of chitin-utilizing bacterium and production of its extracellular chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**(6): 439–444.

(Received September 3, 1998)