



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월21일
(11) 등록번호 10-1780234
(24) 등록일자 2017년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/04 (2006.01)
B09B 3/00 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12P 19/04 (2006.01) C12R 1/465 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A01N 63/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0113690
(22) 출원일자 2016년09월05일
심사청구일자 2016년09월05일
(56) 선행기술조사문헌
Ann. Microbiol., Vol.61, pp.453-461(2011.)*
KR1020060070224 A
KR1020010107443 A
KR1020020075142 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
유진철
광주광역시 서구 송풍로 30 에스케이뷰아파트
102-502
최윤희
광주광역시 서구 상무공원로 114 해광한신아파트
101-1103
최윤석
광주광역시 남구 노대실로 89 송화마을휴먼시아7
단지아파트 709-603
(74) 대리인
김충호, 박희영, 최성용

전체 청구항 수 : 총 3 항

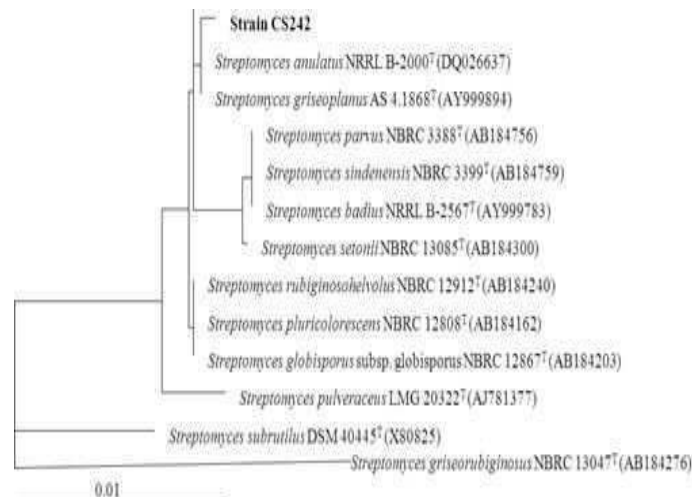
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 스트렙토마이세스 아놀라투스 CS242 유래의 항진균, 생분해성 키틴나아제 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 스트렙토마이세스 아놀라투스 CS242 유래의 항진균 및 생분해성 키틴나아제 및 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 아놀라투스 CS242 유래의 효소는 항진균 활성을 가져서 식물 병원체를 효율적으로 제어할 수 있을 뿐만 아니라, 특별한 처리 없이 폐기되는 산업 공정의 부산물을 미생물을 이용하여 부가가치의 생성물로 전환시켜 자원을 재순환시킴으로써 바이오 폐기물을 효율적으로 활용하는데 대단한 도움이 될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

B09B 3/00 (2013.01)
B09B 3/0075 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
C12P 19/04 (2013.01)
C12Y 302/01014 (2013.01)
C12R 1/465 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545011293
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원
 연구사업명 농생명산업기술개발
 연구과제명 국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교 산학협력단
 연구기간 2015.12.18 ~ 2016.12.17

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345240995
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구지원
 연구과제명 신규 미생물 효소를 이용한 펙틴 올리고머 연구
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711031645
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원
 연구과제명 다제내성균 제어능을 지닌 고분자 펩타이드 항생제 개발
 기 여 율 1/3
 주관기관 조선대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

탄소원으로서 새우 껍질 폐기물의 분말을 사용하여 *Aspergillus niger*에 대한 항진균제 및 키틴성 폐기물의 생분해제로서 유용한 효소 키틴나아제 Chi242를 생산하고, 2016년 8월 5일자 한국생명공학연구원에 KCTC18483P로 기탁된 균주이고,

상기 키틴나아제는 분자량이 SDS-PAGE에 의해 ~38 kDa이고, N-말단 아미노산 서열은 A-P-G-A-P-G-T-G-A-L이며, pH 6.0 및 50℃에서 최적 활성을 나타내고, 30-60℃에서 2시간 동안 열 안정성을 가지며, pH 5.0 ~ 13.0의 범위에서 4℃에서 48시간 동안 pH 안정성을 가지고, 고상 새우 바이오 폐기물을 흡수하고 키틴 마이크로섬유를 분해하는 능력과 교질 키틴을 N-아세틸글루코자민(GlcNAc) 및 N-아세틸 키토비오스(GlcNAc)로 전환시키며, 키틴 폐기물을 생물전환시키는 능력을 지닌 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 키틴나아제는 해안가 및 근해 환경에 버려지는 바이오 폐기물을 생물 전환시키기 위한 용도로 사용되거나, 새우 껍질 폐기물을 올리고당류로의 생물전환에 이용되거나, 식품 및 의약 산업에 있어서 키틴 폐기물을 생분해하여 이를 키토올리고당으로 전환시키는데 이용되는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 아놀라투스 균주 CS242.

청구항 4

a) 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242을 새우 껍질 키틴 분말 10g/L, 펩톤 5g/L, 효모 엑스 5g/L, K₂HPO₄ 1g/L, 및 MgSO₄ 0.5g/L 를 함유하는 키틴 배지에 접종시키는 단계;

b) 상기 접종물을 250 mL 배지를 함유하는 1000 mL Erlenmeyer 플라스크 중에서 28℃에서 120 rpm으로 96 시간 동안 배양시키는 단계;

c) 배양액을 6,000 x g에서 4℃에서 1 시간 동안 원심분리한 후, 상층액에 암모늄 설페이트를 80% 포화도로 첨가하고, 밤새 보관하는 단계;

d) 침전물을 6,000 x g에서 30 분 동안 4℃에서 원심분리하는 단계;

e) 펠렛들을 10mM 시트레이트 완충액(pH 6) 중에서 현탁시키고, 동일한 완충액에 대하여 24 시간 동안 투석한 후, 농축시키는 단계; 및

f) 효소 용액을 10mM 시트레이트 완충액(pH 6)으로 예비 평형시킨 세파오로스 CL-6B 컬럼에 부하하고, 결합 단백질을 용출시켜 키틴나아제 활성을 나타내는 분획들을 얻는 단계;를 포함하고

상기 스트렙토마이세스 아놀라투스 균주 CS242는 2016년 8월 5일자 한국생명공학연구원에 KCTC18483P로 기탁된 균주이고,

상기 키틴나아제는 분자량이 SDS-PAGE에 의해 ~38 kDa이고, N-말단 아미노산 서열은 A-P-G-A-P-G-T-G-A-L이며, pH 6.0 및 50℃에서 최적 활성을 나타내고, 30-60℃에서 2 시간 동안 열 안정성을 가지며, pH 5.0 ~ 13.0의 범위에서 4℃에서 48 시간 동안 pH 안정성을 가지고, 고상 새우 바이오 폐기물을 흡수하고 키틴 마이크로섬유를 분해하는 능력과 교질 키틴을 N-아세틸글루코자민(GlcNAc) 및 N-아세틸 키토비오스(GlcNAc)로 전환시키며, 키틴 폐기물을 생물전환시키는 능력을 지닌 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 아놀라투스 균주 CS242로 부터의

키티나아제의 정제 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) CS242 유래의 항진균 및 생분해성 키티나아제 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근 식품 산업으로부터의 유기성 폐기물의 미생물 분해에 대한 관심은 이것이 폐기물의 용적 관련된 부정적인 결과를 감소시키는데 가장 친환경적이고 지속적인 방법 중 하나로 알려짐에 따라 집중되고 있다.
- [0003] 해양 수산 식품 가공 산업은 일반적으로 많은 바이오 폐기물을 생산한다. 예를 들면, 새우 가공은 거의 새우의 3/4을 바이오 폐기물을 초래하는데, 가공 중 머리, 껍질 꼬리를 제거하기 때문이다. 지구상에서 매년 새우 가공 산업에 의해 수천톤의 바이오 폐기물이 발생한다. 재순환 없이 지속적으로 해안가 및 근해 환경에 버려지는 바이오 폐기물은 심한 환경오염을 일으킬 뿐만 아니라 몇몇 부가가치 생성물을 유도하기 위한 좋은 기회의 상실을 초래한다(참조문헌: Suresh, 2012). 새우 껍질 폐기물을 포함하는 갑각류 바이오 폐기물은 대부분 β -1,4-연결 당(N-acetylglucosamine, GlcNAc)의 비분지쇄의 중합체인 키티인으로 구성된다. 이전의 연구에 의하면 키티 또는 키토산(키티의 데아세틸화에 의해 제조됨)은 생물의약, 식품 및 식품 첨가제, 화장품, 화장품류 및 물의 해독을 포함하는 광범위한 용도에 이용되는 것으로 밝혀졌다(참조문헌: Shahidi et al. 1999; Rinaudo 2006; Bhatnagar and Sillanpaa 2009; Jayakumar et al. 2010). 그러나, 이들의 높은 정도의 중합화 및 고분자량로 인해 키티 및 키토산은 낮은 수용성을 보인다. 다양한 화학적 변형이 키티/키토산의 용해도를 증대시키기 위해 조사되었다(참조문헌: Lu et al., 2004; Chung et al., 2006; Benhabiles et al., 2012). 이러한 제약을 고려하여, 연구자들은 키티 및 키토산의 이들의 대응 과당류 및 이들의 N-아세틸화 유사체로의 전환에 관하여 연구를 집중하였다. 키토-올리고당은 키티의 화학적 또는 효소적 가수분해에 의해 생성될 수 있다. 전자의 타입에 있어서, 키티의 가수분해는 전해질을 사용한 염산, 질산, 인산, 불산 등의 사용에 의하거나 또는 과산화수소산 또는 황산을 사용한 산화 환원법에 의해 처리될 수 있다(참조문헌: Mourya et al., 2011). 산성 가수분해는 소량의 올리고당과 많은 양의 단량체성 GlcNAc를 생산할 수 있다. 그러나, 이들 올리고당은 독성을 갖는데 전환 동안 가능한 화학적 수식, 바람직하지 않은 데아세틸화 중합체(참조문헌: Waldeck et al., 2006), 산 부식 문제, 반응 조건 제어의 어려움, 낮은 반복성, 중화 시 형성되는 고농도의 염으로 인한 탈염의 필요성(참조문헌: Wang et al., 2006)에 기인한다. 헤미셀룰로오스 라이소자임, 파파인, 리파아제 및 펙티나아제(참조문헌: Roy et al., 2003) 등의 효소에 의한 효소적 가수분해를 통한 키티의 탈중합화가 광범위하게 연구되었다. 그러나 가장 많은 관심이 키티나아제라고 알려진 키티에 대해 특이성을 보이는 효소에 집중되고 있다(참조문헌: Green et al., 2005).
- [0004] 키티나아제(E.C.3.2.1.14)는 식물, 동물, 척추동물 및 미생물 등에서 생성되는 자연 발생 글리코실 가수분해효소이다. 키티나아제는 그들의 유래에 따라서 그러한 생물체에 유용한 생리학적 역할을 한다. 척추동물에 있어서 키티나아제는 보통 이들의 소화관의 일부인 반면 곤충에 있어서 키티나아제는 오래된 표피에 대한 필요성이 연관된다(참조문헌: Dahiya et al., 2006).
- [0005] 식물에 있어서, 이들은 균류 병원체의 감염에 대한 방어 기전으로 작용하는 한편, 세균은 키티를 탄소 및 질소 원으로서 동화시키기 위해 키티나아제를 생성할 수 있다(참조문헌: Wang et al., 2006). 많은 세균 종들은 키티나아제의 생성자로서 알려져 있는데 가장 잘 알려진 속으로는 *Aeromonas*, *Serratia*, *Vibrio* 등을 들 수 있다(Cody, 1989).

선행기술문헌

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Ai H, Wang F, Xia Y et al (2012). Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L. Food Chem 132:493-498.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 특별한 처리 없이 폐기되는 산업 공정의 부산물을 미생물을 이용하여 부가가치의 생성물로 전환시켜 자원을 재순환시킬 수 있는 방안을 오랜 동안 예의 연구한 결과, 후술하는 바와 같이 스트렙토마이세스 아놀라투스 CS242 유래의 효소가 항진균 활성을 가져서 식물 병원체를 효율적으로 제어할 수 있을 뿐만 아니라 바이오 폐기물을 효율적으로 재순환시키는데 대단한 도움이 될 수 있다는 점을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은, 일면에 있어서, 탄소원으로서 새우 껍질 폐기물의 분말을 사용하여 항진균제 및 키틴성 폐기물의 생분해제로서 유용한 효소 키틴나아제(Chi242)를 생산하는 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242(KCTC18483P)를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 추가의 목적은, 다른 일면에 있어서, 정제된 키틴나아제의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 ~38 kDa이고, N-말단 아미노산 서열은 A-P-G-A-P-G-T-G-A-L이며, pH 6.0 및 50℃에서 최적 활성을 나타내고, 30-60℃에서 2 시간 동안 열 안정성을 가지며, 5.0 ~ 13.0의 범위에서 4℃에서 48 시간 동안 pH 안정성을 가지고, 고상 새우 바이오 폐기물을 흡수하고 키틴 마이크로섬유를 분해하는 능력과 교질 키틴을 N-아세틸글루코자민(GlcNAc) 및 N-아세틸 키토비오스(GlcNAc)로 전환시키며, 키틴 폐기물을 생물전환시키는 능력을 지닌 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242를 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명이 해결하려는 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 스트렙토마이세스 아놀라투스 CS242 유래의 효소는 항진균 활성을 가져서 식물 병원체를 효율적으로 제어할 수 있을 뿐만 아니라, 특별한 처리 없이 폐기되는 산업 공정의 부산물을 미생물을 이용하여 부가가치의 생성물로 전환시켜 자원을 재순환시킴으로써 바이오 폐기물을 효율적으로 활용하는데 대단한 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 16S rRNA 유전자 서열에 기초한 스트렙토마이세스 균주 CS242 및 관련 스트렙토마이세스의 계통수이다.
 도 2는 CSB40 유래 키틴나아제의 DEAE-sepharose를 사용한 약음이온 교환 크로마토그래피를 통한 용출 프로파일이다.
 도 2는 콩고 레드 플레이트 에세이에 의한 효소 처리된 영역 주위의 후광 사진이다.
 도 3은 Chi242의 용출프로필을 나타낸다.
 도 4는 정제 효소의 SDS-PAGE 분석 및 자이모그램 분석을 나타낸다.
 도 5는 정제 효소의 활성 및 안정화에 영향을 미치는 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그래프도이다.
 도 6은 가수분해된 키틴 분말 및 완충제로 처리한 키틴 분말의 SEM 전자현미경사진이다.
 도 7은 교질 키틴 및 키토올리고당의 가수분해 생성물의 박층크로마토그래피 분석 결과를 나타내는 사진이다.
 도 8은 HPLC 크로마토그램 분석을 사용한 NAG1 및 NAG2를 방출하는 키틴 분말의 가수분해 생성 결과를 나타내는 그래프도이다.
 도 9는 *Aspergillus niger*에 대한 Chi242의 항진균성 활성을 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은, 일면에 있어서, 탄소원으로서 새우 껍질 폐기물의 분말을 사용하여 항진균제 및 키틴성 폐기물의 생

분해제로서 유용한 효소 키티나아제(Chi242)를 생산하는 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242(KCTC18483P)를 제공한다.

- [0014] 본 발명은, 추가의 다른 일면에 있어서, 정제된 키티나아제의 분자량은 SDS-PAGE에 의해 ~38 kDa이고, N-말단 아미노산 서열은 A-P-G-A-P-G-T-G-A-L이며, pH 6.0 및 50℃에서 최적 활성을 나타내고, 30-60℃에서 2 시간 동안 열 안정성을 가지며, 5.0 ~ 13.0의 범위에서 4 ℃에서 48 시간 동안 pH 안정성을 가지고, 고상 새우 바이오 폐기물을 흡수하고 키틴 마이크로섬유를 분해하는 능력과 교질 키틴을 N-아세틸글루코자민(GlcNAc) 및 N-아세틸 키토비오스(GlcNAc)로 전환시키며, 키틴 폐기물을 생물전환시키는 능력을 지닌 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242를 제공한다.
- [0015] 본 발명은, 다른 일면에 있어서, 상기 키티나아제는 재순환없이 지속적으로 해안가 및 근해 환경에 버려지는 바이오 폐기물을 생물 전환시켜 부가가치 생성물을 유도하기 위한 용도로 사용되거나, 새우 껍질 폐기물을 올리고당류로의 생물전환에 이용되거나, 식품 및 의약산업에 있어서 키틴 폐기물을 생분해하여 이를 키토올리고당으로 전환시키거나 또는 식물 병원체의 생물학적 퇴치에 이용되는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242를 제공한다.
- [0016] 본 발명은, 추가의 다른 일면에 있어서,
- [0017] a) 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242을 새우 껍질 키틴 분말 10g/L, 펙톤 5g/L, 효모 엑스 5g/L, K₂HPO₄ 1g/L, 및 MgSO₄ 0.5g/L 를 함유하는 키틴 배지에 접종시키는 단계;
- [0018] b) 상기 접종물을 250 mL 배지를 함유하는 1000 mL Erlenmeyer 플라스크 중에서 28℃에서 120 rpm으로 96 시간 동안 배양시키는 단계;
- [0019] c) 배양액을 6,000 x g에서 4℃에서 1 시간 동안 원심분리한 후, 상층액에 암모늄 설페이트를 80% 포화도로 첨가하고, 밤새 보관하는 단계;
- [0020] d) 침전물을 6,000 x g에서 30 분 동안 4 ℃에서 원심분리하는 단계;
- [0021] e) 펠릿들을 10 시트레이트 완충액(pH 6) 중에서 현탁시키고, 동일한 완충액에 대하여 24 시간 동안 투석한 후, 농축시키는 단계; 및
- [0022] f) 효소 용액을 10mM 시트레이트 완충액(pH 6)으로 예비 평형시킨 세파오로스 CL-6B 컬럼에 부하하고, 결합 단백질을 용출시켜 키티나아제 활성을 나타내는 분획들을 얻는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 스트렙토마이세스 아놀라투스(*Streptomyces anulatus*) 균주 CS242로 부터의 키티나아제의 정제 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 스트렙토마이세스 아놀라투스 유래의 키티나아제의 상세한 생화학적 특성과 새우 껍질 폐기물의 다양하게 응용 가능한 올리고당류로의 생물전환에 그의 적용에 관한 사례 연구를 수행하였다. 보고된 키티나아제는 또한 균류 병원체에 대한 항진균 활성을 나타내었기 때문에 항진균제의 개발에 이용될 수 있다.
- [0024] 다양한 식품 및 의약산업에 있어서 유용하고, 풍부한 키틴 폐기물을 생분해하고, 이를 귀중한 키토 올리고당으로 전환시킬 수 있는 적합한 키티나아제를 발견하기 위한 일환으로 CS242은 다양한 균주 중에서 잠재적인 키틴 분해 생성자로서 선별되었다. CS242 균주는 *Streptomyces* M-20 (137 U/mg), *Streptomyces venezuelae* P10 (8.35 U/mg), *Streptomyces roseolus* (30 U/mg) 등의 다른 스트렙토마이세스 균주에 대해 높은 특이 활성을 갖는 강력한 키티나아제 생성자로서 고려될 수 있다. 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces* sp.) CS242 유래의 Chi242의 N-말단 아미노산 서열은 APGAPGTGAL로 결정되었다. 이 부분적인 아미노산 서열은 NCBI-BLAST database에 의해 분석하고, 다른 보고된 키티나아제와 비교하였을 때, 이는 고도의 서열 유사성을 나타내었다. Chi242는 *Stigmatellaaurantiaca* DW4/3-1 유래의 chitinase A1와 80%의 서열 유사성을 나타내었다. *Streptomyces* 키티나아제와 가장 높은 동일성은 *Streptomyces* sp. Mg1의 70%인 반면, 가장 낮은 동일성은 40%로 *Streptomyces* sp. AA4이었다(표 2 참조).
- [0025] TLC와 HPLC를 통한 가수분해 분석 결과는 새우 껍질 분말의 교질 키틴의 NAG1 및 키토비오스로의 바이오전환에 효율적으로 이용될 수 있는 산업적 용도에 있어서 바이오 촉매로서 Chi242의 적용성을 나타낸다.
- [0026] 시험된 기질 중에서, 최대 친화도는 교질 키틴에 대한 것이었다. 이 키티나아제는 키틴 분말 및 글리콜 키토산을 가수분해할 수 없었다. 기질에 대한 약한 작용은 아마도 키토산에 대한 데아실화에 기인하는 것으로 보이는데, 따라서 효소 활성은 보존된 아세틸기를 갖는 다당류 사슬의 펼침에만 허용된다. 셀룰로오스 및 카복시 메틸 셀룰로오스에 대한 활성은 검출되지 않았다. 이들 결과는 이 효소가 β-1,4-연결 GlcNAc, 즉 키틴의 선형 중합

체의 가수분해에 대하여 특이적임을 나타낸다. 주사 전자 현미경 또한 이들의 키틴성 기질을 분해하여 고수율의 키틴나아제 효소 및 키토올리고당(GlcNAc)을 생성하는 능력에 의해서 새우 바이오폐기물의 분해에 있어서 Chi242의 사용을 강력하게 촉진한다(참조문헌: Suresh, 2012).

[0027] 항진균성 활성 또한 화학적 진균제의 부작용 없이 식물 질병을 치료하기 위한 대체 방법을 제공한다. 진균 감염은 작물에 대해 심각한 위협이고, 다양한 합성 화학제를 사용한 작물 보호는 독성 및 발암성에 기하여 생태학 및 건강에 해로운 문제를 야기한다. 식별 병원체의 생물학적 퇴치는 더 양호한 작물 보호를 제공하고 환경오염을 피하고 경제적이다(참조문헌: Ai et al., 2012). 정제 단백질이 다른 진균 종에 대한 항진균 활성을 나타낸 관찰은 잠재적으로 농업에 연계되어 식물 병원체를 제어할 수 있다. 따라서, Chi242는 미생물 분해 및 효소 및 키토올리고당의 동시 생산을 위한 키틴 폐기물의 이용을 위한 이상적인 바이오촉매이다. 이 관점에서, 본 발명자들은 이 연구가 생산 단가를 고려한 고무적인 접근을 제공한 것으로 판단된다.

[0028] 생화학적 특성에 의하면 이 효소가 적당히 열안정성이고 pH-안정성임을 나타내었다. Chi242는 분자량 및 pH 안정성에 있어서 우월함에 있어서 *Streptomyces* 유래의 것에 비하여 보다 뛰어났다. 그러나, N-말단 아미노산 서열은 유사성을 나타내었다. 정제 키틴은 또한 항진균 활성을 나타내었고 친환경 및 경제성 있는 생물제어제로서 작용한다. 키틴 폐기물을 이용하는 이 효소의 대규모 생산을 위한 기술로의 이전은 키틴성 폐기물의 관리에 공헌하고 의약 및 건강기능식품의 분야에서 수요를 저예산 산업의 발달을 초래할 것이다.

[0029] <실시예>

[0030] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의하여 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0031] 후술하는 실시예에서 사용된 키틴, 글리콜 키토산 및 칼코플루오 화이트 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)로부터 구매하였다. 키틴 올리고당(*N*-acetyl glucosamine, GlcNAc2, GlcNAc3)은 Megazyme (Ireland)로부터 구매하였다. 모든 시약 및 화학약품은 유용한 최상의 분석 등급의 것을 사용하였다.

[0032] 실시예 1: 미생물 균주의 스크리닝, 동정 및 배양

[0033] 한국의 전남 지역에서 수집한 미생물 균주 수 백개를 모아서 보관하였다. 그 중 균주 CS242는 그의 형태학적 및 16S rDNA 서열에 기초하여 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces*)으로 동정되었다. 키틴나아제 검출을 위하여, 균주들을 새우 껍질 키틴 분말 10g/L, 펩톤 5g/L, 효모 엑스 5g/L, K₂HPO₄ 1g/L, MgSO₄ 0.5g/L 및 아가 1%를 함유하는 키틴 아가 배지에 접종하고, 28 °C에서 5일 동안 배양시켰다. 이어서, 플레이트들을 증류수에 준비한 콩고 레드 용액(0.5% w/v)으로 염색하고, 1 M NaCl로 탈염색시켰다.

[0034] 추가로, 키틴나아제를 키틴 아가 플레이트로부터 균사를 접종한 발효 배지 250 mL을 함유하는 Erlenmeyer 플라스크(1000 mL)에서 생산하고, 진탕 인큐베이터(180 rpm) 중에서 28 °C에서 96 시간 동안 배양시켰다. 배양물을 수확하고 여과하고, 원심분리한 후 상층액을 얻고 이를 후속 정제에 사용하였다.

[0035] CS242의 16S rDNA 유전자 서열 분석을 수행하였고, *Streptomyces anulatus*와 99.93%의 최대 서열 상동성을 보였다. *Streptomyces* sp. CS242의 계통수를 도 1에 나타내었다. 도 1은 16S rRNA 유전자 서열에 기초한 스트렙토마이세스 균주 CS242 및 관련 스트렙토마이세스의 계통수이다.

[0036] CS242의 배양액을 키틴 아가 플레이트 상에 접종하고, 28°C에서 24 시간 동안 배양한 후 콩고 레드 용액으로 염색하고 1% NaCl로 탈염색하였다. 도 2는 콩고 레드 플레이트 에세이한 효소 처리된 영역 주위의 후광 사진이다. 도 2에 나타난 바와 같이 맑은 대역(키틴 가수분해)을 나타내었다. 키틴 가수분해의 농도 의존성 (5 ~ 100 µl/웰) 효을 대조군(미처리)에 비교하여 증가되는 규칙으로 관찰할 수 있었다.

[0037] 상기 균주는 한국생명공학연구원에 2016. 08. 05. 일자로 기탁되어 기탁번호 KCTC18483p를 부여받았다.

[0038] 실시예 2: 효소 정제

[0039] CS242 배양액을 6,000 x g로 4 °C에서 1 시간 동안 원심분리시켰다. 배양물로 부터의 단백질을 암모늄 설페이트(80%)에 의해 침전시켰다. 침전물을 6,000 x g로 30 분 동안 원심분리에 의해 수집하고, 시트레이트 완충액(10 mM, pH 6.0) 중에 현탁시켰다. 이것을 동일 완충액에 대하여 24 시간 동안 투석시켰다. 이어서 얻어진 농축 시료를 시트레이트 완충액(10 mM, pH 6.0)으로 평형시킨 세파로오스 CL-6B 컬럼(2.2 cm x 12 cm)로 겔 투과 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0040] 모든 분획들을 단백질 함량 및 키틴나아제 활성에 대하여 분석하였다. 높은 키틴나아제 활성을 보이는 분획들을

모으고 10 kDa 센트리콘(Amicon, USA)을 사용하여 농축시켰다. 겔 전기영동 및 자이모그램 분석에 의해 효소 순도를 모니터링한 후, 이 효소의 다양한 생화학적 특성들을 결정하였다.

실시예 3: 단백질 결정 및 키티나아제 활성의 분석

단백질 농도는 표준으로서 소 혈청 알부민을 사용하여 Bradford (참조문헌: Bradford, 1976)의 방법 후 분광광도계(595 nm)를 사용하여 결정하였다. 키티나아제 활성은 Miller에 의해 기술된 교질 키틴으로 부터 생성된 환원 단부 그룹 N-아세틸 d-글루코자민 (GlcNAc)을 측정함으로써 3,5-dinitrosalicylic(DNS) 방법에 의해 결정하였다(참조문헌: Miller, 1959). 간략하게 설명하자면, 효소 용액 0.1 mL 및 1% (w/v) 교질 키틴(10mM 소듐 시트레이트 중, pH 6.0) 0.1 mL으로 이루어진 표준 반응 혼합물을 50 °C에서 30 분 동안 반응 시켰다. 이어서 반응을 디니트로살리실산(DNS) 시약 0.2 mL을 첨가하여 10 분 동안 가열시켜 종료시켰다. 반응 후, 시료들은 반응 혼합물을 얼음물에 신속히 냉각시키고, 10,000 x g로 10 분 동안 원심분리시켰다. 방출된 GlcNAc를 포함하는 상층액의 흡광도를 Multiskan EX 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다. 키티나아제 활성의 1 유닛은 분당 환원 당 1 μ mol을 유리시킨 효소의 양으로 정의한다.

탄소원으로서 키틴 파우더를 사용하여 Chi242를 액체 배양 배지에서 5 일 동안 배양하고, 암모늄 설페이트 침전 및 겔 투과 크로마토그래피 기술을 사용하여 정제하였다. 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield(%)	Fold
Broth	110	6870	6870	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	51.24	530659	10356	70.21	1.5
Sepharose CL-6B	10	27010	27010	35.73	3.93

측정된 조 단백질 함량은 110 mg이고, 6870 U/mg의 특이 활성을 지녔다. 조 단백질은 암모늄 설페이트 침전에 의해 농축시켰으며 활성에 있어서 1.5 배 증가를 나타내었다.

침전 단백질은 10 mM 시트레이트 완충액 (pH 6.0)에 대하여 투석하였고, Sepharose CL-6B 컬럼(2.2 cm x 12 cm) 상에 부하하여 정제하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 Chi242의 용출프로필을 나타낸다. 가장 높은 키티나아제 활성을 나타낸 분획들을 모으고 10 kDa 컷 오프 멤브레인에 의해 농축시켰다. 전체 10 mg 단백질, 27010 U/mg 특이 활성, 3.93-배 정제, 35.73% 활성 회수율이 얻어졌다.

실시예 4: SDS-PAGE 및 자이모그래피

정제 효소의 분자량은 폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 Laemmli [참조문헌: (Laemmli, 1970)]에 의해 기술된 바와 같이 SDS-PAGE에 의해 결정하였다. 전기영동 후, 겔들을 Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250로 염색하고, 탈염색시켰다.

자이모그램 분석은 Trudel and Asselin(Trudel and Asselin, 1989)의 방법에 따라 수행하였다. 글리콜 키틴의 키티나아제 가수분해에 의해 유발된 용해 반응을 관찰하기 위하여 단백질을 0.1% (w/v) 글리콜 키토산을 병합시킴으로써 15% 폴리아크릴아마이드 겔로 분리하였다.

전기영동 후, 겔들을 세척하고, 1% (v/v) Triton X-100를 함유하는 10 mM 시트레이트 완충액(pH6.0) 중에 37 °C에서 밤새 침지시켰다. 이어서 재차, 겔을 세척하고, 10mM 시트레이트 완충액 (pH 6.0) 중의 0.01% (w/v) calcofluor white M2R로 염색시켰다. 과량의 염료는 증류수로 1 시간 동안 겔을 세척하여 제거하였다. 용해 대역은 UV-transilluminator 상에 겔을 위치시킴으로써 가시화하였다.

그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4는 정제 효소의 SDS-PAGE 분석 및 자이모그램 분석을 나타낸다. Mr(레인 1)

은 표준 분자량 마커를 나타낸다.

[0052] 정제 키티나아제는 SDS-PAGE 상에 단일 밴드로 나타났고, 자이모그래피 분석 상의 키티분해성 활성을 지녔다. 분자량은 38 kDa으로 측정되었고, 이 효소를 Chi242로 명명하였다.

[0053] 실시예 5: N-말단 아미노산 서열 분석

[0054] 정제 효소의 N-말단 아미노산 서열은 Procise Model HT 491 protein sequencer(Applied Biosystems, USA)를 사용하여 Edman degradation법에 의해 결정하였다.

[0055] 이 부분적인 아미노산 서열은 NCBI-BLAST database에 의해 분석하고, 다른 보고된 키티나아제와 비교하여 이를 표 2에 나타내었다. 이는 고도의 서열 유사성을 나타내었다. Chi242는 *Stigmatellaaurantiaca* DW4/3-1 유래의 chitinase A1와 80%의 서열 유사성을, 그 다음에 *Amycolatopsismediterranei* S699와 70%를 나타내었다. *Streptomyces* 키티나아제와 가장 높은 동일성은 *Streptomyces* sp. Mg1의 70%인 반면, 가장 낮은 동일성은 40%(*Streptomyces* sp. AA4)이었다.

표 2

Enzyme	N-terminal amino acid	Identity%
Chi242	APG4PGTG4L	100
chitinase A1 from <i>Stigmatellaaurantiaca</i> DW4 3-1	APG4PGTGIM	80
chitinase from <i>Amycolatopsismediterranei</i> S699	APG4PGTPQA	70
chinitase A from <i>Streptomyces</i> sp. Mg1	VPG4PGXG4A	70
chitinase from <i>Streptomyces glaucus</i> ATCC 14672	KGN4PGTG4D	60
chitinase C from <i>Streptomyces coslitor</i> A3(2)	DGGNPGTG4E	60
chitinase from <i>Streptomyces rimosus</i> ATCC 10970	GAGGPGTG4G	60
chitinase from <i>Streptomyces</i> sp. AA4	VNQNFETG4L	40

[0056]

[0057] 실시예 6: 기질 특이성 결정

[0058] 정제된 Chi242의 기질 특이성은 키티 및 몇 개의 다른 탄소화물 상에서 시험하였다. 사용된 기질은 1% (w/v); 교질 키티, 새우껍질 분말, 글리콜 키토산, 셀룰로오스 및 카복시 메틸 셀룰로오스이었다. 적당히 희석된 Chi242 100 μ l 및 1% (w/v) 기질 100 μ l을 함유하는 반응 혼합물을 10 mM 시트레이트 완충액 중에서 30 분 동안 40 °C에서 반응 시켰다. 키티나아제 활성은 효소 분석 섹션에 기술된 바와 같이 가용성 환원 단부의 방출을 측정함으로써 결정하였다.

[0059] 실시예 7: 키티나아제 활성에 미치는 pH 및 온도의 영향

[0060] Chi242의 최적 pH는 pH 5.0-13.0 사이의 완충액을 사용하여 표준 조건하에서 평가하였다: 100 mM 각 완충액: 시트르산-소듐 시트레이트(pH 5.0-6.5), Tris-HCl (pH 7.0-9.0), 중탄산나트륨-과산화 나트륨 완충액(pH 10.0-11.0) 및 염화 칼륨-수산화 나트륨(pH12-13). 키티나아제의 pH 안정성을 결정하기 위하여, 효소 시료들을 동일한 완충액 시스템을 이용하여 다양한 pH에서 4 °C에서 48 시간 동안 예비배양 시킨 후, 잔여 효소 활성을 표준 에세이 조건하에서 50°C에서 측정하였다.

[0061] Chi242의 최적 온도는 효소 시료를 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에서 30 ~ 80 °C의 상이한 온도에서 인큐베이션시킴으로써 결정하였다. Chi242의 열 안정성은 효소 시료를 10 mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에서

30 내지 80 ℃에 걸친 온도에서 2 시간 동안 예비 반응시킴으로써 결정하고, 잔여 효소 활성을 표준 에세이 조건하에서 측정하였다. 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

StrainName	Mol. Wt. (kDa)	Optimum		Stability		Reference
		pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	
<i>S. sp.</i> CS147	41	11	60	4-12	50	(G. C. et al., 2015)
<i>S. sp.</i> M-20	20	5	30	4-8	40	(Kim et al., 2003)
<i>S. roseolus</i>	40	6	60	6-8	60	(Xiayun et al., 2012)
<i>S. versutus</i> P10	66	7.5	35-40	6.5-8	45	(Mukherjee and Sen 2006)
<i>S. sp.</i> DA11	34	8	45-50	6-9	45	(Han et al., 2009)
<i>S. alborinaceus</i> S-22	43	5.6	40	4-5.6	40	(El-Sayed et al., 2000)
<i>S. raudas</i> TK-VL_333	45	7	30	7-8	30	(Kavitha and Vijayalakshmi 2011)
<i>S. cyanus</i> SP-27	27	7	60	5.5-8.5	60	(Yano et al., 2008)
<i>S. griseus</i> (MITCC 9723)	34	6	40	5-9	20-50	(Rabeeth et al., 2011)
<i>S. griseus</i> HUT 6037	49	5.5-7.0	60	5-9	40	(Tanabe et al., 2000)
<i>Streptomyces mutinus</i> CS242	38	6	50	5-13	30-60	Current study

[0062]

[0063]

Chi242의 최적 pH는 시트레이트 완충액을 사용하였을 때 6.0 이었다. 이 효소는 기질 없이 4 ℃에서 48 시간 동안 반응시킨 후 5.0 ~ 13.0의 넓은 범위의 pH에서 고도로 안정하였다. 흥미롭게도, Chi242는 알칼리성 토양 및 해양부터 단리된 미생물 균주의 것에 비하여 높은 pH 적응성을 나타내었다.

[0064]

이 균주의 극히 높은 pH 관용성은 알칼리 조건하에서 촉매로서 사용되는데에 응용될 수 있다. 이 효소는 50℃에서 최대의 최적 활성을 나타내었다. 온도 안정성을 체크하기 위하여 Chi242을 상이한 온도(30-80 ℃)에서 기질 없이 2 시간 동안 예비 반응시켰고, 잔여 활성의 75% 이상이 30-60 ℃에서 회복되었다. Chi242의 온도 및 안정성에 미치는 pH의 영향 및 그의 분자량은 표 2에 나타난 바와 같이 상이한 *Streptomyces* 균주 유래의 다른 키티나아제와 비교하였다. 키티나아제 활성 및 안정성에 관한 pH 및 온도의 영향은 도 5에 나타내었다. 도 5는 정제 효소의 활성 및 안정화에 영향을 미치는 pH 및 온도의 영향을 나타내는 그래프도이다.

[0065]

실시예 8: 교질 키틴의 효소적 가수분해

[0066]

키토올리고당(G2 - G3) 및 교질 키틴의 효소적 가수분해를 위해 1% (w/v) 교질 키틴 1 mL 및 (G2 - G3) 2mg/mL을 함유하는 반응 혼합물을 Chi 242 10 U와 함께 40 ℃에서 48 시간 동안 반응시켰다. 반응액을 TLC에 의해 상이한 시간 간격 (0.16, 1, 12, 24, 및 48 h)으로 가수분해 생성물에 대해 분석하였다. 반응 혼합물들을 실리카 겔 플레이트 (Merck Silica Gel 60F 254, Germany) 상에 스폿팅하고, 클로로포름/아세트산/물(6:10:2, v/v/v)을 함유하는 용매로 전개시켰다.

[0067]

실시예 9: 불용성 키틴 중합체의 효소적 가수분해(SEM 분석)

[0068]

주사전자현미경(SEM)을 키틴 중합체의 키티나아제 가수분해의 형태학적 관찰을 위해 사용하였다. 키틴 분말 (10mg/mL)을 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에 적당히 희석한 키티나아제 효소 0.09mg/mL로 40 ℃에서 6 시간 동안 반응시켰다. 이어서 혼합물을 10,000 x g로 5 분 동안 원심분리시키고, 침전물을 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중에 행구고, 에탄올에 의해 탈수시킨 후 동결 건조시켰다. 대조군 및 키티나아제 처리 시료들을 박층 금으로 스퍼터 코팅시킨 후 분석 필드 에미션 SEM JSM-7500 (JEOL, Japan)에서 관찰하고 촬영하였다. Chi242의 기질 특이성은 표 4에 제시하였다.

표 4

Substrate (1%)	Relative activity (%)
Colloidal chitin	100=0
Shrimp shell powder	10.7=13.1
Glycol chitosan	10.3=12.7
Cellulose	3.9=5.4
Carboxymethyl cellulose	0.3=0.6

[0069]

[0070] 도 6은 완충제로 처리한 키틴 분말(a) 및 효소 0.09mg/mL로 처리하여 효소 가수분해 후 키틴 분말(b)의 SEM 전 자현미경사진이다(1000 배율). 효소 부재하 새우 바이오폐기물 기질을 사용한 대조군의 SEM 마이크로그래프에서 는 분해가 관찰되지 않았다(도 6a). 반면에, 효소 처리한 새우 바이오 폐기물 기질 유래의 키틴 분말의 SEM 마 이크로그래프는 키틴 마이크로섬유의 분해를 확인하였는데, 이는 가수분해 동안 효소의 키틴 분해 활성을 의미 한다(도 6b).

[0071] 따라서, 이러한 과정을 통하여, Chi242 키틴나아제 효소의 키틴성 재료의 분해 능력뿐만 아니라 키틴성 재료의 재사용에 있어서 이들의 역할이 확인된다. 본 발명의 연구 결과는 키틴성 기질을 분해하여 키틴나아제 효소 및 키토올리고당(GlcNAc)을 고 수율로 생산하는 이들의 능력에 의한 새우 바이오 폐기물의 분해에 있어서 Chi242의 용도를 제시한다(참조문헌: Suresh, 2012).

[0072] 교질 키틴 및 키토올리고당에 따른 Chi242에 의한 효소적 가수분해 후 축적된 당 함량은 분리하고, TLC 및 G1(NAG1; N-acetyl D-glucosamine), G2(NAG2; chitobiose) 및 G3 (chitotriose)를 사용하여 동정하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7은 교질 키틴 및 키토올리고당의 가수분해 생성물의 박층크로마토그래피 분석 결과를 나타내는 사진이다. 라인 C 및 S(표준)은 효소의 부재하에 스포팅하고, 라인 G2 (b) 및 G3 (c)는 Chi242의 존재하에 스포팅하였다.

[0073] Chi242를 교질 키틴으로 인큐베이션 시켰을 때, 12 시간 후, 소량의 G1이 G2와 함께 생성되었다. 반응의 종료시 에 G2가 주된 생성물로서 관찰되었고, G1의 검출 가능한 생산이 그 다음이었다(도 7a).

[0074] G1 및 G2의 생산을 추가로 조사하고, HPLC 분석에 의해 정량화하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8은 HPLC 크로마토그램 분석을 사용한 NAG1(N-아세틸 D-글루코자민) 및 NAG2(키토비오스)를 12 시간(청색) 및 24 시 간(적색) 동안 방출하는 키틴 분말의 가수분해 생성 결과를 나타내는 그래프도이다.

[0075] 인큐베이션 12 시간 후, 교질 키틴의 가수분해는 주된 생성물로서 NAG1 (0.082 mg/mL) 및 NAG2(3.79 mg/mL)을 생성한 것으로 관찰되었다. 24 시간 까지 배양 시간을 증가시키에 따라 NAG1 및 NAG2의 농도는 각각 0.134 mg/mL 및 4.49 mg/mL(NAG2)로 증가되는 것이 관찰되었다. Chi242를 G2와 함께 인큐베이션 시켰을 때, 효소적 가수분해는 48 시간 인큐베이션까지도 어떠한 가수분해 산물도 방출하지 않았는데, 이는 G2가 이 효소에 대한 기질이 아님을 의미한다(도 7b). G3와 함께 인큐베이션 시킨 경우에, G2는 10 분의 매우 짧은 인큐베이션 시간 에 검출되었다. 1 시간 동안 인큐베이션시킨 후, G3의 밴드가 사라지면서 G1 및 G2를 방출하였는데 이는, Chi242가 G3에 대한 활성을 가짐을 의미한다(도 7c)

[0076] 실시예 10: 항진균 활성에 대한 분석

[0077] Chi242의 항진균 활성은 문헌 (참조문헌: Zhang et al., 2013)에 의해 기술된 바와 같이 균사 신장-억제 에세이 를 이용하여 시험하였다.

- [0078] 진균 균주(*Aspergillus niger*)를 미리 PDA 아가 플레이트 상에 스트리킹한 후, 28℃에서 3 일동안 인큐베이션 시켰다. 이어서 PDA 플레이트 상에서 성장한 균사 1 cm를 잘라서 새로운 PDA 플레이트 상으로 옮긴 후, 진균 성장이 관찰될 때까지 인큐베이션 시켰다. 웰(0.8cm)을 아가 플레이트 상에 펀칭하고, Chi242를 마이셀 콜로니의 가장자리로부터 0.5 cm 떨어지게 웰에 첨가하였다. 플레이트들을 28 ℃에서 균사 성장이 대조균을 함유한 웰들을 감싸고 항진균 활성을 가진 키틴아아제 효소를 함유한 웰 주위의 억제 대역을 형성할 때까지 인큐베이션시켰다.
- [0079] 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9는 *Aspergillus niger*에 대한 Chi242의 항진균성 활성을 나타내는 사진이다. 항진균 활성은 균사 신장 억제 에세이에 의해 평가하였다. *Aspergillus niger*에 대한 균사 성장의 맑은 억제 영역이 관찰되었다. 키틴은 진균 세포벽의 주 성분 중 하나이고, 키틴아아제는 진균 세포 벽을 용해하는 것으로 알려져 있다. Chi242는 생물제어제로서 작용할 수 있고, 그의 항진균 활성은 세포벽 합성의 억제에 기인할 수 있다(참조문헌: Patil et al., 2013).
- [0080] [참고 문헌 목록]
- [0081] Ai H, Wang F, Xia Y et al (2012). Antioxidant, antifungal and antiviral activities of chitosan from the larvae of housefly, *Musca domestica* L. Food Chem 132:493-498.
- [0082] Benhabiles MS, Salah R, Lounici H et al (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. Food Hydrocoll 29:48-56.
- [0083] Bhatnagar A, Sillanpaa M (2009). Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater - A short review. Adv Colloid Interface Sci 152:26-28.
- [0084] Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.
- [0085] Chung Y, Tsai C, Li C (2006). Preparation and characterization of water-soluble chitosan produced by Maillard reaction. Fish Sci 72:1096-1103.
- [0086] Cody RM (1989). Distribution of chitinase and chitobiase in *Bacillus*. Curr Microbiol 19:201-205.
- [0087] Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. Appl Microbiol Biotechnol 71:773-782.
- [0088] El-Sayed E-SA, Ezzat SM, Ghaly MF et al. (2000). Purification and characterization of two chitinases from *Streptomyces albovinaceus* S-22. World J Microbiol Biotechnol 16:87-89.
- [0089] G. C. P, Yoo H, Cho S et al. (2015). An Extracellular Chitinase from *Streptomyces* sp. CS147 Releases N-acetyl-d-glucosamine (GlcNAc) as Principal Product. Appl Biochem Biotechnol 175:372-386.
- [0090] Green AT, Healy MG, Healy A (2005). Production of chitinolytic enzymes by *Serratia marcescens* QMB1466 using various chitinous substrates. J Chem Technol Biotechnol 80:28-34.
- [0091] Han Y, Yang B, Zhang F, et al. (2009). Characterization of Antifungal Chitinase from Marine *Streptomyces* sp. DA11 Associated with South China Sea Sponge *Craniella Australiensis*. Mar Biotechnol 11:132-140.
- [0092] Jayakumar R, Menon D, Manzoor K, et al. (2010). Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials-A short review. Carbohydr Polym 82:227-232.
- [0093] Kavitha A, Vijayalakshmi M (2011). Partial purification and antifungal profile of chitinase produced by *Streptomyces tendae* TK-VL_333. Ann Microbiol 61:597-603.
- [0094] Kim KJ, Yang YJ, Kim JG (2003). Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. J Biochem Mol Biol 36:185-189.
- [0095] Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-85.
- [0096] Lu S, Song X, Cao D et al. (2004). Preparation of water-soluble chitosan. J Appl Polym Sci 91:3497-

503.

- [0097] Miller GL (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal Chem 31:426-28.
- [0098] Mourya VK, Inamdar NN, Choudhari YM (2011). Chitooligosaccharides: Synthesis, characterization and applications. Polym Sci Ser A 53:583-12.
- [0099] Mukherjee G, Sen SK (2006). Purification, Characterization, and Antifungal Activity of Chitinase from *Streptomyces venezuelae* P10. Curr Microbiol 53:265-269.
- [0100] Patil NS, Waghmare SR, Jadhav JP (2013). Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation. Process Biochem 48:176-183.
- [0101] Rabeeth M, Anitha A, Srikanth G (2011). Purification of an antifungal endochitinase from a potential biocontrol agent *Streptomyces griseus*. Pakistan J Biol Sci 14:788-797.
- [0102] Rinaudo M (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. Prog Polym Sci 31:603-632.
- [0103] Roy I, Sardar M, Gupta MN (2003). Hydrolysis of chitin by PectinexTM. Enzyme Microb Technol 32:582-588.
- [0104] Shahidi F, Arachchi JKV, Jeon YJ (1999). Food applications of chitin and chitosans. Trends Food Sci Technol 10:37-41.
- [0105] Suresh PV (2012). Biodegradation of shrimp processing bio-waste and concomitant production of chitinase enzyme and N-acetyl-D-glucosamine by marine bacteria: production and process optimization. World J Microbiol Biotechnol 28:2945-2962.
- [0106] Tanabe T, Kawase T, Watanabe T et al. (2000). Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. J Biosci Bioeng 89:27-32.
- [0107] Trudel J, Asselin A (1989). Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 178:362-366.
- [0108] Waldeck J, Daum G, Bisping B, Meinhardt F (2006). Isolation and molecular characterization of chitinase-deficient *Bacillus licheniformis* strains capable of deproteinization of shrimp shell waste to obtain highly viscous chitin. Appl Environ Microbiol 72:7879-7885.
- [0109] Wang SL, Lin TY, Yen YH et al. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. Carbohydr Res 341:2507-515.
- [0110] Xiayun J, Chen D, Shenle H et al. (2012). Identification, characterization and functional analysis of a GH-18 chitinase from *Streptomyces roseolus*. Carbohydr Polym 87:2409-2415.
- [0111] Yano S, Rattanakit N, Honda A et al. (2008). Purification and Characterization of Chitinase A of *Streptomyces cyaneus* SP-27: An Enzyme Participates in Protoplast Formation from *Schizophyllum commune* Mycelia. Biosci Biotechnol Biochem 72:54-61.
- [0112] Zhang J, Kopparapu NK, Yan Q, et al. (2013). Purification and characterisation of a novel chitinase from persimmon (*Diospyros kaki*) with antifungal activity. Food Chem 138:1225-1232.

수탁번호

[0113]

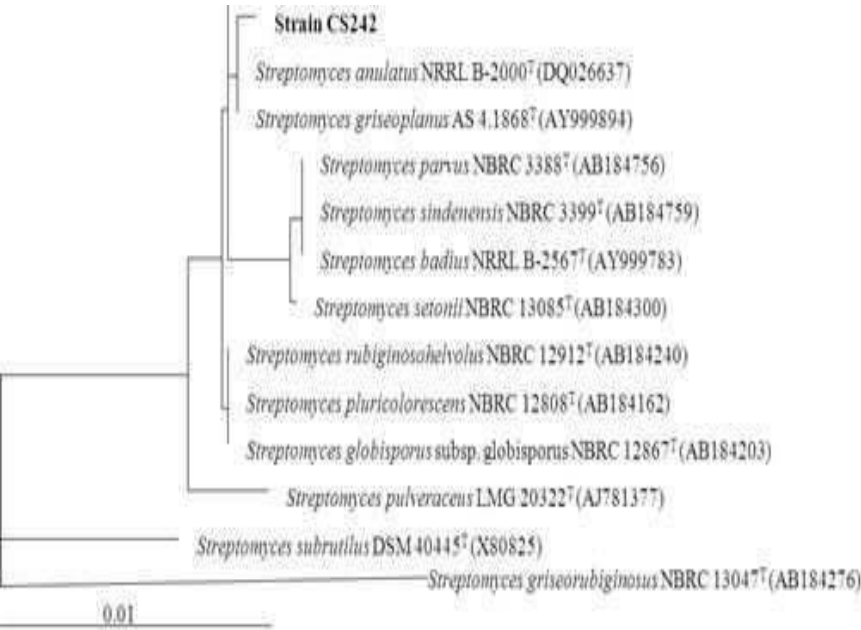
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18483P

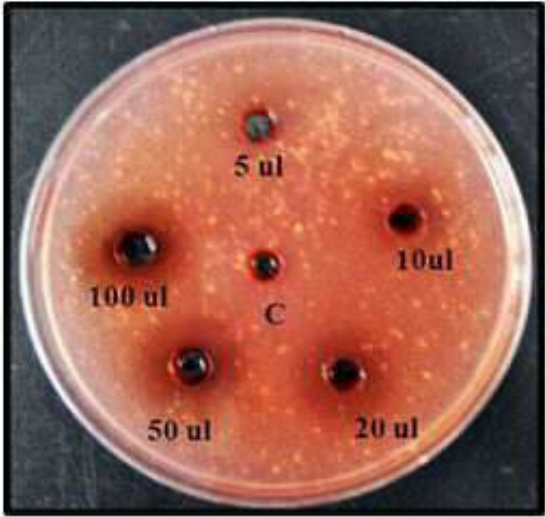
수탁일자 : 20160801

도면

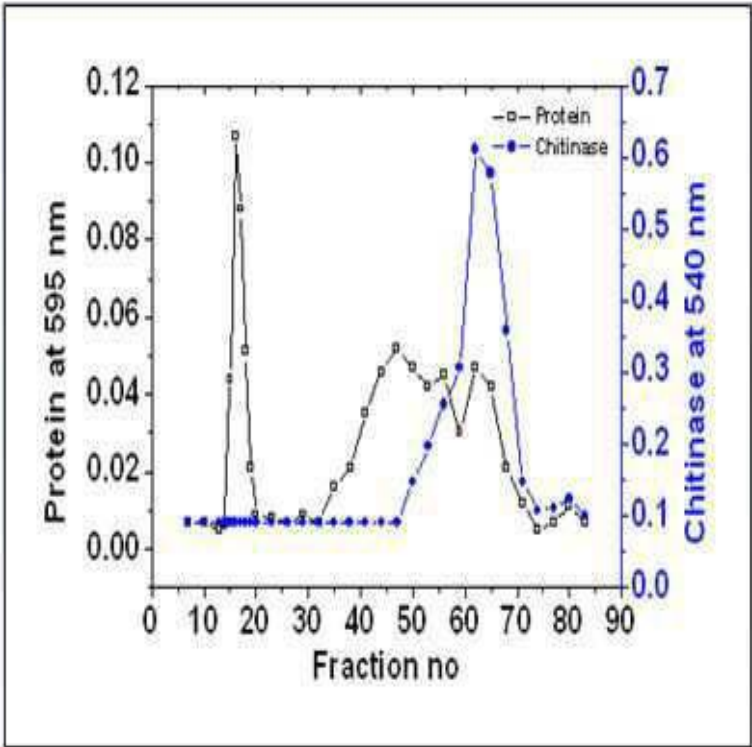
도면1



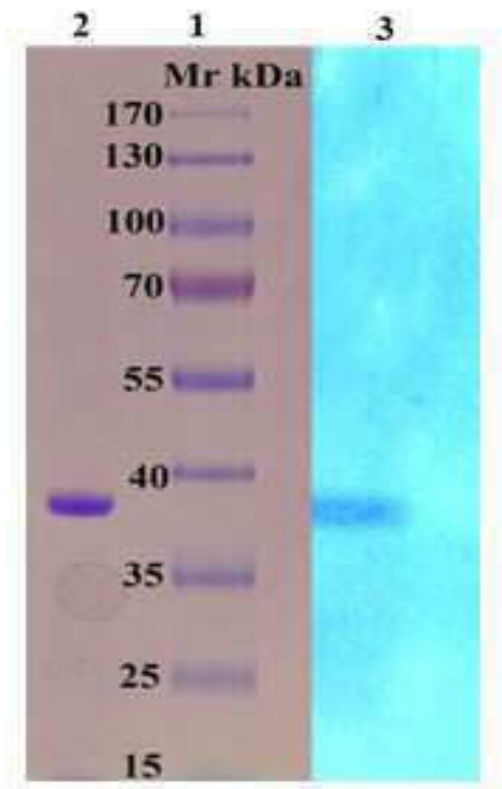
도면2



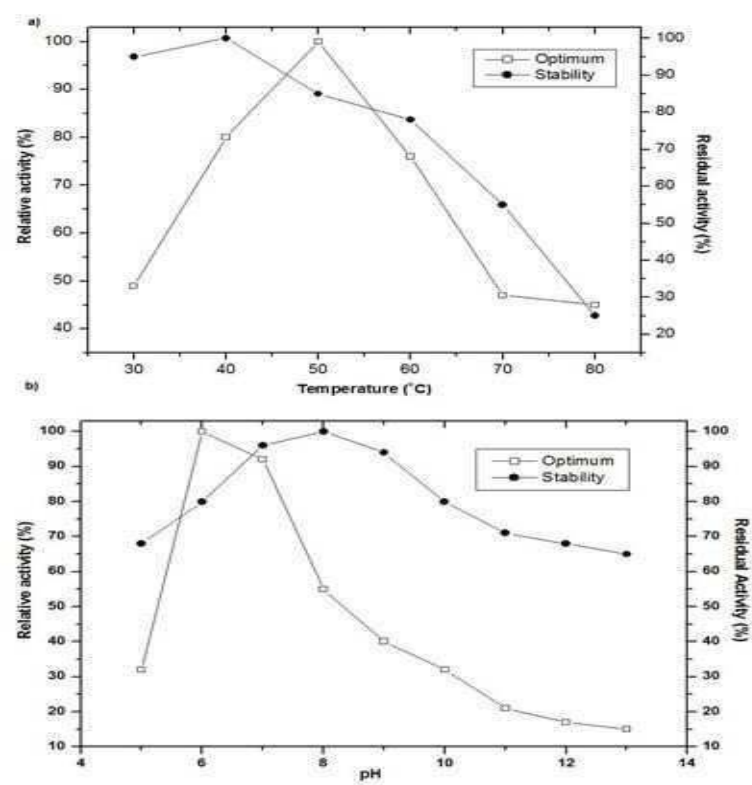
도면3



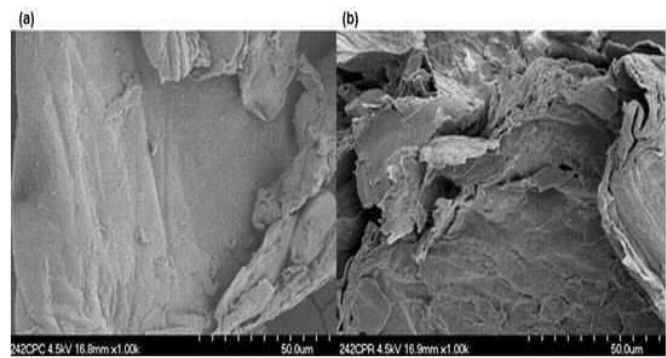
도면4



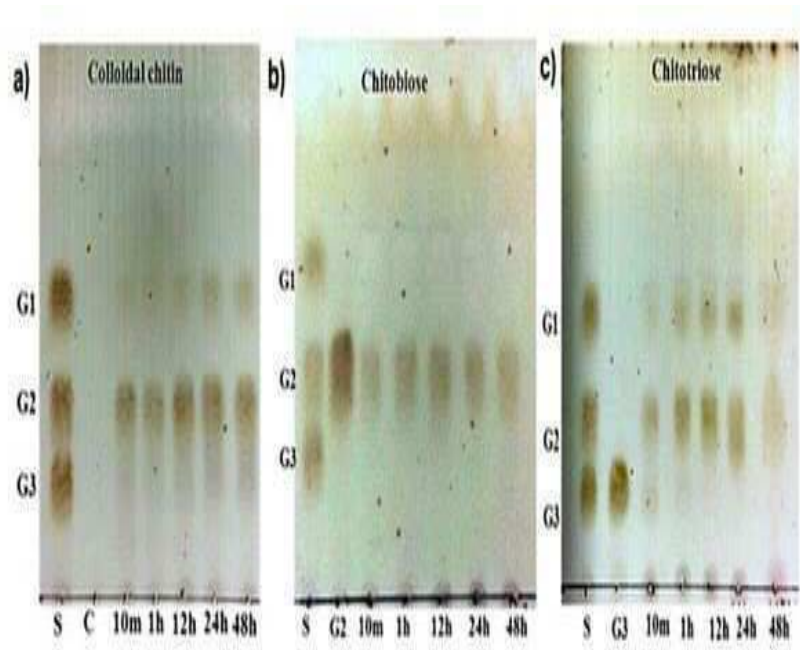
도면5



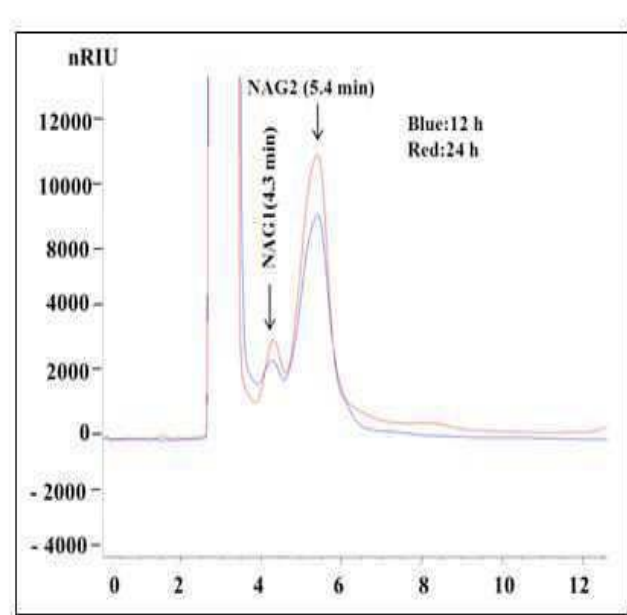
도면6



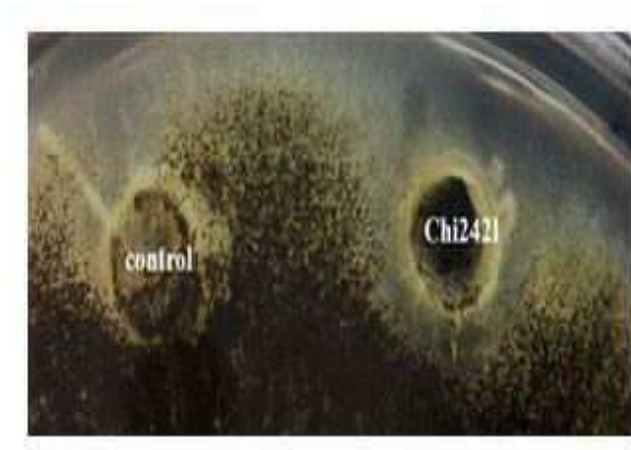
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Chosun University
- <120> Chitinase showing antifungal and biodegradation properties
obtained from Streptomyces anulatus CS242 and the use thereof
- <130> ISP-1548
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Streptomyces anulatus
- <400> 1

Ala Pro Gly Ala Pro Gly Thr Gly Ala Leu

1 5 10