

## 키토산분해효소를 생산 분비하는 *Bacillus* sp. P16의 선발 및 특성

박노동\* · 정미라 · 조유영 · 지연태<sup>1</sup>

전남대학교 농과대학 농화학과, 유전공학과<sup>1</sup>

**초 록 :** 키토산으로부터 고중합도 키토산올리고당을 얻기 위해서, 해안가 갯벌토양 중에서 chitosan 분해활성이 강한 균주를 선발하였다. 선발된 균주를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology을 토대로 형태적, 생화학적 특성을 동정한 결과, 그람 양성, 간상 ( $0.4\text{-}0.6 \times 1.6\text{-}2.2 \mu\text{m}$ ), catalase 양성, 운동성 양성이었으며, pH 4.5~11.0과 2% NaCl을 함유한 배지에서 성장하였고, 42°C 이하에서 성장하였다. 이를 균주의 DNA를 RAPD PCR 분석하여 동정하였다. 이 결과를 종합하여, 가장 강한 내부가수분해능을 보인 균주 P16을 *Bacillus* sp.로 잡정 분류하고 이를 최종적으로 *Bacillus* sp. P16으로 명명하였다. 이 균주의 배양 상등액은 키토산에 대해 강한 액화능을 보였으며, 키토산 용액의 점성을 신속히 감소시켰다. 이 균주가 생산하는 키토산분해효소는 TLC, HPLC, viscometry 등 의 분석결과를 보면 대 중합도 2-7의 올리고당을 생산하는 endo-splitting type의 endochitosanase인 것으로 보였다.(1997년 9월 8일 접수, 1997년 9월 22일 수리)

### 서 론

키토산(Chitosan)은 glucosamine의  $\beta$ -1,4 결합 중합체로서 퇴비 발효촉진제, 식물세포의 활성화제, 식품보존료, 혈중 콜레스테롤 저하제, 면역 보조제(immuno-adjuvant), 생물발효기의 다공성 bead, 막과 섬유 조제, 두발용품, 화장품의 유화제 및 보습제, 폐수처리용 응집제, 유기합성의 solid support 등으로 이용되고 있거나 이용이 가능한 소재로 주목받고 있다.<sup>1-3)</sup> 특히, 키토산의 분해산물인 키토산올리고당(chitooligosaccharides)은 식품 첨가물,<sup>1)</sup> 진단시약,<sup>4)</sup> 감염억제제,<sup>5)</sup> 항암제,<sup>6-7)</sup> 식물 생리조절제<sup>8)</sup> 등 다양한 분야에서 장래 유용한 신기능성 소재로 개발이 기대되며, 이에 따라 이 효율적 제조법이 중요해진다.

키토산 올리고당은 Horowitz *et al.*<sup>9)</sup>의 방법에 따라 키토산을 진한 염산으로 가수분해하여 얻을 수 있는 데 이 때 가수분해의 조건에 따라 다양한 중합도(dp, degree of polymerization)의 올리고머가 생성되지만, 중합도 3 이상의 올리고당 수율은 저조하다. 근래 효소적 가수분해법으로 키토산으로부터 고중합도의 올리고당을 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있으나<sup>10,11)</sup> 고중합도 올리고당의 수율은 여전히 높지 않았다. 그러나 키토산을 내부가수분해하는 키토산분해효소(endochitosanase)를 개발 이용한다면 이 효소법은 산 가수분해법에 비하여 고중합도의 키토산올리고당의 고순도 제조에 적합할 것으로 보인다. 국내에서도 키틴과 키토산으로부터 효소적 방법으로 올리고당을 생산하기 위한 연구가 비교적 활발히 진행되고 있다.<sup>12-16)</sup>

본인 등은 토양으로부터 키토산을 가수분해하여 고중합

도 키토산올리고당의 생산에 유용한 chitosanase를 생산하는 미생물을 선발하고 이의 특성을 chitooligosaccharides 생산의 관점에서 조사 검토했다. 이는 효소법에 의한 chitooligosaccharides 생산을 위한 기초 소재연구로서 그 활용이 기대된다.

### 재료 및 방법

#### 키토산분해효소 생산균의 분리 및 배양

키토산분해효소를 생산하는 미생물을 분리하기 위해 해안의 갯벌 토양으로부터 시료를 채취하여 각 시료 1g을 saline buffer (0.85% NaCl) 100 ml에 진탕 배양한 후 혼탁액 1 ml를 정제 키토산이 함유된 분리용 액상배지에 접종하여 진탕 배양한 후 각 배양액 100  $\mu\text{l}$ 를 취하여 분리용 한천 배지에 도말 접종하고 37°C에서 배양하면서 colony 주변에 clear zone을 형성하는 균주를 1차로 분리하였다.<sup>12,14,15)</sup> 이를 중 clear zone 형성이 가장 크고 선명한 colony를 선별하여 분리용 배지에 최종 접종하여 이를 가운데 chitosanase 활성이 우수한 8균주를 얻었으며 그중 가장 우수한 균주를 하나 선발하고 P16이라 명명하였다. 이 chitosanase 생산균을 0.5% chitosan, 1% tryptone 그리고 1% NaCl을 함유한 LB배지(pH 7.0)에서 37°C에서 진탕 배양하였다. 균의 성장은 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

#### 키토산분해효소 생산균의 동정

선발된 균주 P16의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에<sup>17,18)</sup> 따라 형태학적 특성과 생리생화학적 특성을 조사하여 행하였다. 광학현미경과 주사 전자

찾는말 : chitosanase, chitooligosaccharide, *Bacillus* sp.

\*연락처자

현미경(scanning electron microscope Hitachi S-2400)을 이용하여 운동성, 크기, 형태 등을 관찰하였다.

항생제 저항성 검정을 위하여 LB broth에 여러 항생제들의 농도를 10-50 µg/ml이 되도록 조정한 후 균주를 접종하여 37°C에서 72시간 배양한 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균의 성장 여부를 판단하였다.

한편 균주 P16의 DNA를 통상적 방법으로<sup>19)</sup> 분리하여 이를 template로 하여 RAPD PCR을 수행하였다. PCR kit로는 Takara Co. 제품을 사용하였으며, 반응 조건은 다음과 같다. 즉, 94°C에서 10분간 변성시킨 후 36°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 합성하고, 94°C에서 1분간 변성, 36°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 합성하는 과정을 44회 순환반복하고, 최종 합성반응을 72°C에서 10분간 행한 다음 반응을 종료시켰으며,<sup>20)</sup> 이 PCR 산물을 확인하기 위하여 1.5% agarose gel에서 전기영동을 수행하였다. 이때 primer는 3종류 (OPC 16, 19, 20)을 사용하였으며 이들의 염기서열은 다음과 같다. OPC 16 : CACACTCCAG, OPC 19 : GTTGCCAGCC, OPC 20 : ACTTCGCCAC. 표준균주로는 KCTC 1021 (*Bacillus subtilis*)와 KCTC 1753 (*B. licheniformis*)를 시험하였다.

#### 선발된 균주가 생산하는 키토산분해효소의 성질

TLC 분석 : 균주 P16을 0.5% 키토산이 함유된 LB배지에 48시간 배양한 후 배양액의 상등액 0.1 ml와 1% soluble chitosan (0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5) 0.9 ml을 37°C에서 10시간 반응시킨 후 1 N NaOH로 반응을 정지하여 상등액을 TLC하였다. 전개용매로는 n-propanol : H<sub>2</sub>O : ethylacetate : 암모니아수 (6:3:3:1 (v/v)) 혼합용매를 사용하였고, 발색시약은 에탄올에 녹인 0.2% 닌히드린 시약을 이용하였다.<sup>21)</sup>

HPLC 분석 : 균주 P16의 배양 상등액 0.1 ml와 1% soluble chitosan (0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5) 1.0 ml을 37°C에서 24시간 배양한 다음 1 N NaOH로 반응을 정지시키고 그 상등액을 HPLC하였다. 분리 컬럼으로 carbohydrate column을, 검출기로 RI detector를 사용하였으며, 용매의 조성은 acetonitrile : water (60:40, v/v), 유속은 1.0 ml/min였다.

액화능(Liquefaction activity) : 배양 상등액 0.1 ml와 1% soluble chitosan (0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5) 0.9 ml을 37°C에서 반응시키면서 NaOH로 반응을 정지시켰을 때 침전의 다소에 따라, 또는 침전이 생기지 않을 때까지 걸리는 시간을 측정하여, 그 액화능(liquefaction activity)을 평가하였다.

점도 변화 측정 : 효소용액을 가하였을 때 1% 키토산 용액의 점도의 변화를 Brookfield synchroelectric viscometer를 사용하여 측정하였다.

#### 효소활성의 측정

효소 0.1 ml와 기질인 1% soluble chitosan (pH 5.5, sodium acetate buffer) 0.9 ml을 혼합한 뒤 37°C의 진탕 배양

기에서 1시간 배양한 후 1 M NaOH 0.1 ml을 가하여 반응을 정지시키고 원심분리하였다. 그 상등액 0.75 ml와 Schale's reagent<sup>22)</sup> 1 ml를 혼합한 후 끓는 물에 15분간 담가두었다가 흐르는 물로 냉각시켜 반응을 정지시키고 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 키토산분해효소 생성균의 분리, 동정 및 특성

갯벌시료로부터 키토산을 분해하는 미생물을 분리하기 위하여 키토산을 함유한 분리용 한천배지에 균주를 평판도 밀하여 배양하였을 때 clear zone을 형성하는 균주를 1차 선발하였으며, 이를 다시 분리용 한천배지에 5일간 배양하여 clear zone이 크고 선명한 콜로니를 찾아냈다. 이를 키토산을 포함하는 LB broth에 접종하여 배양하였으며, 그 배양 상등액 조효소의 chitosanase 활성, 액화능력, 생성된 키토올리고당의 조성 등을 평가하여 유망한 키토산 분해 균주 8개(P3, P4, P5, P6, P8, P13, P16, P27)를 선발하였으며, 그중 가장 유망한 것은 P16이었다.

선발된 균주 P16을 광학현미경과 전자현미경으로 관찰

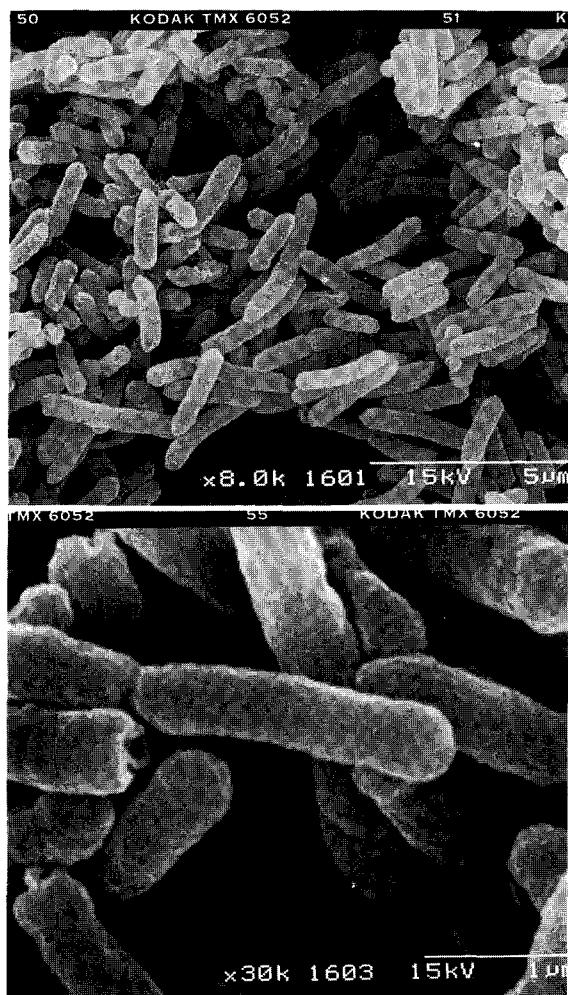


Fig. 1. Scanning electron micrographs of *Bacillus* sp. P16

한 결과 이는 포자를 형성하는 그람양성으로 운동성을 갖는  $0.4\text{-}0.6 \times 1.6\text{-}2.2\mu\text{m}$  크기의 간균이었다 (Fig 1). 이의 생리생화학적 특성을 Table 1에 나타냈다. 이는 전분을 분해하였으며, catalase 반응과 MRVP시험에서 양성을 나타냈고, 2% NaCl 이하에서만 성장하였다. 또한, pH 4.5-11 범위와 42°C 이하에서 성장하였다. 이 균주는 항생제 ampicillin에 대해서 저항성을 보인 반면 tetracycline에는 예민

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the isolated chitosanase-producing strain P16

Characteristics	16
Gram staining	+
Spore	+
Mobility	+
Shape	rod
Hydrolysis of Starch	+
Utilization of	
Mannitol	-
Glucose	-
Sucrose	-
Glycerol	+
Test of	
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	+
Methyl red (Voges-Proskauer)	+
3-Ketolactone production	-
Citric acid utilization	-
Nitrate Reduction	-
Growth in NaCl	
2%	+
5%	+
7%	-
Growth at pH	
4.5	+
9	+
11	+
Growth at	
5°C	-
10°C	+
42°C	+
50°C	-

\* +, positive; -, negative

Table 2. Resistance of the isolated chitosanase-producing strain P16 on antibiotics

Antibiotics	Concentration	Growth
Ampicillin	10 (ppm)	+
	50	+
Streptomycin	10	+
	50	-
Tetracycline	10	-
	50	-
Neomycin	10	+
	50	-
Neomycin	10	-
	50	-
Chloramphenicol	10	+
	50	+
NovobiocinRifampicin	10	+
	50	-

한 감수성을 보였다.(Table 2).

Fig. 2는 선별한 8균주 가운데 P4, P5, P13, P16과 표준 균주로서 *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, 그리고 본실험 실에 보유한 *Lactobacillus* sp.에서 염색체 DNA를 추출하여 3종의 primer를 사용하여 RAPD PCR한 결과이다. 우선 선별된 균주들의 RAPD 패턴이 유산균들의 그것과는 다르지만, *Bacillus* sp.와는 유사한 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 보면 균주 P16은 *Bacillus* sp.의 세균으로 간주되었으며, 이후 이를 *Bacillus* sp. P16이라 명명하였다. Chitosanase는 미생물에 널리 분포하는 효소로 *Bacillus*,<sup>11,12,23-25)</sup> *Pseudomonas*,<sup>26)</sup> *Acinetobacter*,<sup>16)</sup> *Enterobacter*,<sup>27)</sup> *Myxobacter*<sup>28)</sup> 등의 세균과, *Streptomyces*,<sup>29,30)</sup> *Nocardia*,<sup>31)</sup> *Amycolatopsis*<sup>21)</sup> 등의 방선균, *Penicillium*,<sup>32)</sup> *Fusarium*<sup>33)</sup> 등의 곰팡이에서 주로 연구되어 왔다.

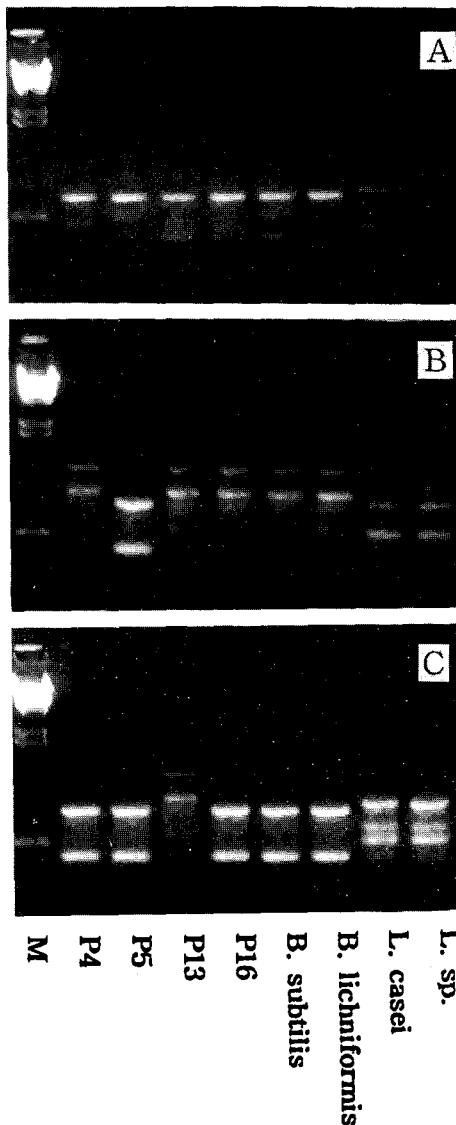


Fig. 2. Rapid PCR patterns of the isolated strains. The chromosomal DNA was purified from the isolated strains (P4, P5, P13, P16), and *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *L. casei* and *L. sp.* as references, and amplified using OPC16 (A), OPC19 (B), and OPC20 (C) as primers.

### 균주 P16이 생산하는 Chitosanase의 키토산 분해 특성

이들 균주의 배양 상등액과 1% 키토산 용액 (pH 5.5)을 일정 시간 배양한 다음 NaOH를 가하여 반응을 정지시키고 키토산의 침전을 조사하여 각 균주가 생산하는 효소의 액화능(liquefaction activity)을 조사한 바, Fig 3에 보인대로 균주 P16의 배양상등액은 기질 키토산과 37°C에서 24시간 배양한 다음 이를 알칼리화 하였을 때 키토산의 침전이 생기지 않도록 가수분해할 수 있는 강력한 액화능을 나타냈다. 또한 효소반응액에 NaOH를 가하였을 때 침전이 생기지 않을 때까지 걸리는 시간을 측정하였을 때에도 P16의 배양상등액의 경우에 가장 짧은 시간이 걸렸다 (미발표 자료). 이는 P16이 생산하는 효소가 키토산을 내부 가수분해한 결과이며, 이는 이 균주가 endochitosanase를 생산 분비하는 것을 의미하는 것이다.

이와 함께 이들 균주가 생산한 효소와 1% 키토산 용액을 혼합한 다음 점도의 변화를 측정하였던 바, 균주 P16의 배양상등액은 아주 신속하게 점도를 감소시켰다 (Fig 4). 이렇게 신속한 점도의 감소는 키토산이 효소에 의하여 내부 가수분해된 결과로 해석되었다.

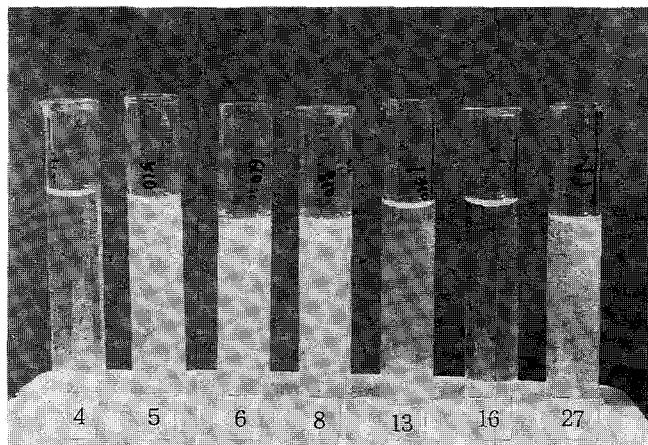


Fig. 3. Chitosan liquefaction activity of the extracellular supernatants of the isolated strains.

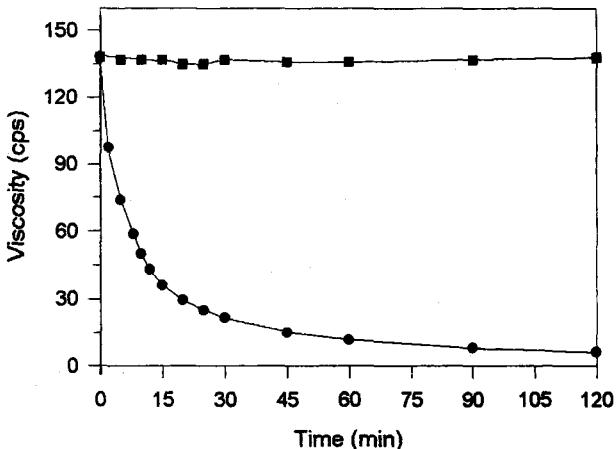


Fig. 4. Viscosity change of 1% chitosan solution in 1% acetic acid during incubation at 25°C with the culture supernatant of the strain P16. ●—●, P16; ■—■, control.

한편, 이들 균주의 배양 상등액과 1% 키토산 용액을 10시간 배양한 다음 그 분해산물을 TLC로 분석하였더니, 그 분해산물은 주로 (GlcN)<sub>n</sub> 이상의 올리고당으로 구성되어 있었으며, 단당류는 생성되지 않았다. 그중 균주 P16의 배양상등액이 가장 강력한 활성을 가지는 것으로 보이며, dimer도 함께 생성되었다 (Fig 5). Fig. 6은 균주 P16의 배양 상등액과 1% soluble chitosan을 37°C에서 24시간 배양한 다음 1 N NaOH로 반응을 정지시키고 그 상등액을 HPLC한 결과이다. TLC 결과에서와 유사하게 3당 이상의 올리고당이 효소 가수분해산물의 주성분인 것을 보여주고 있다.

이상의 결과를 종합하면, 선발된 균주 *Bacillus* sp. P16이

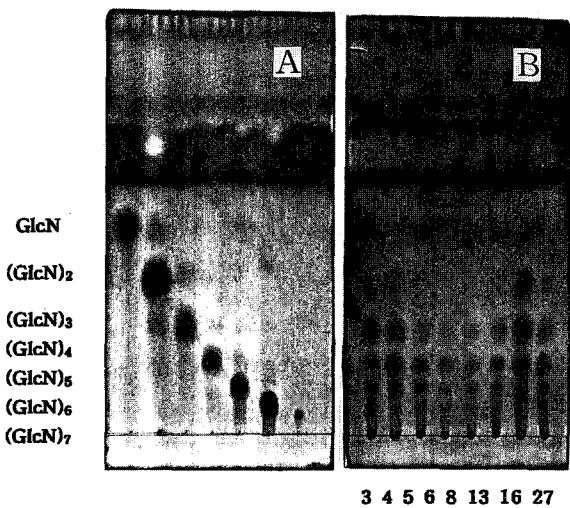


Fig. 5. TLC chromatograms of chitosan hydrolyzates by the supernatant of the strains.  
A, Standards (GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN); B, Chitosan hydrolyzates of *Bacillus* sp. (P3, P4, P5, P6, P8, P13, P16, P27).

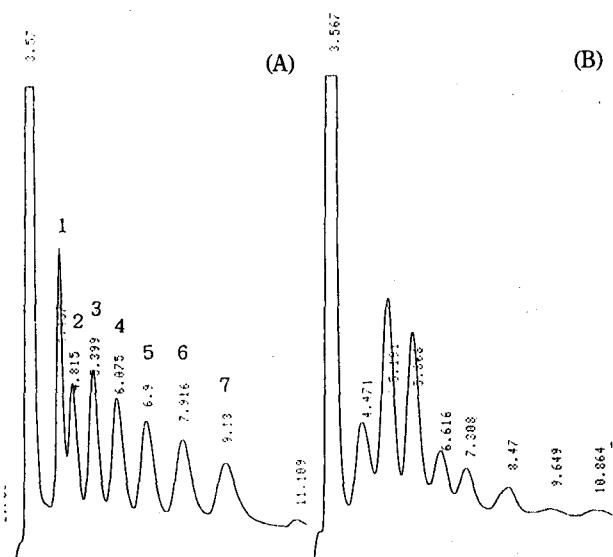


Fig. 6. HPLC chromatograms of chitosan hydrolyzates by the supernatant of the strain P16. A, Numbers represent the standards (GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN),-(GlcN); B, Enzymatic hydrolyzates of *Bacillus* sp. P16.

생산하는 키토산분해효소는 키토산을 가수분해하여 반응 생성물로서 주로 2-7mer까지 또는 그 이상의 올리고머를 생성하지만 monomer는 생성하지 않는 것으로 보이며, 이는 P16 chitosanase의 작용이 exo-splitting type이라기 보다는 endo-splitting type 중심임을 제시하는 것으로, 그러므로 선발 균주 *Bacillus* P16은 endochitosanase를 주로 생산 분비하는 것으로 결론지었다.

지금까지의 연구 결과를 토대로 앞으로 이 선발된 균주 P16의 chitosanase 생산을 위한 최적 배양조건을 확립하고, 이 endochitosanase의 정제와 성질을 규명하며, 그 유전자 구조의 해명과 함께 이 효소를 고증합도 키토산 올리고당의 생산에 응용하기 위한 연구를 수행하여야 할 것으로 본다.

### 감사의 글

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)의 지원을 받아 수행한 내용의 일부이며, 연구비의 지원에 감사를 표합니다.

### 참고문헌

- 日本工業技術會編 (1987) 키텐.키토산 올리고당의 개발과 현황, 키텐. 키토산의 개발과 응용 pp.110-137, 공업기술회, 東京, 일본
- 키텐.키토산研究會編 (1990) 키텐.키토산의 應用. p71-98, 枝報堂, 東京, 일본
- 키텐.키토산研究會編 (1990) 最後の バイオマス キチン.キトサン, 枝報堂, 東京, 일본
- 南條, 坂井, 磯氷, 石戸 (1986) 제59회 일본 생화학회 강연요지집 p601
- Tokoro, A., M. Kobayayashi, N. Tatewaki, K. Suzuki, Y. Okawa, T. Mikami, S. Suzuki, and M. Suzuki (1989) Protective effect of N-acetyl chitohexaose on Listeria monocytogenes infection in mice, *Microbiology and Immunology* 33:357-367
- Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki (1986) Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151: 403-408
- Suzuki, S., M. Suzuki, T. Tokami, T. Matsumoto, T. Watanabe, M. Kobayashi (1992) Host defense mechanism of hexa-N-acetylchitohexaose, in Chitin Derivatives in Life Science, Tokura, S. and I. Azuma, ed., Japanese Society for Chitin and Chitosan, Japan
- Hirano, S., M. Hayashi, K. Miura, H. Tsuchida, and T. Nishida (1988) Chitosan and its derivatives as activators of plant tissues and seeds. *Polym. Sci. Technol.*, 88:45-60
- Horowitz, S. T., S. Roseman, S. and H. T. Blumenthal (1957) The preparation of glucosamine oligosaccharides I. Separation. *J. Am. Chem. Soc.*, 79:5046-5049
- Izume, M. and A. Ohtakara (1987) Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agric. Biol. Chem.*, 51:1189-1191
- Uchida, Y. and A. Ohtakara (1988) Chitosanase from *Bacillus* species, in Meth. Enzymol. vol. 161, pp501-505. Academic Press, Inc., NY
- Lee, H.W., J.W. Choi, D.P. Han, M.J. Park, N.W. Lee, and D.H. Yi (1996) Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6:19-25
- 정의준, 이용현 (1995) Chitoooligosaccharides 생산에 적합한 chitinase를 분비하는 균주의 선별, chitinase의 분리정제 및 반응특성. 산업미생물학회지 23:187-196
- 한범구, 이우진, 유탁, 박인호, 조도현 (1996) 공업적 이용을 위한 식물성 키텐분해효소의 탐색. 한국농화학회지 39:466-471
- 차진명, 진상기, 고한철, 이인화 (1996) Chitinase를 생성하는 *Serratia* sp. JM의 분리 및 특성. 한국생물공학회지 11: 92-99
- 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
- Case C.L. and T.R. Johnson (1984) in Laboratory Experiments in Microbiology. Benjamin and Cummings Publishing Company, NY
- Peter, H. and A. Sneath (1986) in Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 2. Williams and Wilkins, Baltimore
- Ausubel, F., R. Brent, and R. Kingston (1995) in Short Protocols in Molecular Biology (3rd ed.), p2-22, Wiley & Sons, NY
- Cocconcelli, P.S. and D. Dorro (1995) Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:376-379
- Shoji O., A. Ando, H. Shinoyama, and T. Fuji (1994) Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* sp. CsO-2. *J. Fermentation and Bioengineering* 77: 617-620
- Imoto, T., K. Yamashita (1971) A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*, 35: 1154-1156
- Tominaga, Y. and Y. Tsujisaka (1975) Purification and some enzymatic properties of the chitosanase from *Bacillus* R-4 which lyses Rhizopus cell walls. *Biochim. Biophys. Acta.*, 410: 145-155.
- Yabuki, M., A. Uchiyama, K. Suzuki, A. Ando, and T. Fuji (1988) Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 34: 255-270.
- Seino, H., K. Tsukuda, Y. Shimasue (1991) Properties and action pattern of a chitosanase from *Bacillus* sp. P1-7S. *Agric. Biol. Chem.* 55:2421-2423
- Yoshihara, K., J. Hosokawa, T. Kubo, M. Nishiyama (1992) Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Bisci. Biotech. Biochem.* 56:972-973.
- Yamasaki, Y., I. Hayashi, Y. Ohta, T. Makagawa, M. Kawamukai, H. Matsuda (1993) Purification and mode of action of chitosanolytic enzymes from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 444-449 (1993).
- Hedges, A. and R.S. Wolfe (1974) Extracellular enzyme

- from Myxobacter AL-1 that e both -1,4-glucanase and chitosanase activities. *J. Bacteriol.* 120:844-853.
29. Price, J. S. and R. Storck (1975) Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from Streptomyces. *J. Bacteriol.* 124:1574-1585.
  30. Ohtakara, A., H. Ogata, Y. Taketomi, and M. Mitsutomi (1984) In Chitin, Chitosan and Related Enzymes, ed., Zikakis, J. P., p147-160. Academic Press, New York
  31. Sakai, K., R. Katsumi, A. Isobe, F. Nanjo (1991) Purification and hydrolytic action of a chitosanase from *No-*  
*cardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1079, 65-72 (1991).
  32. Fenton, D. M. and D.E. Eveleigh 1981) Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen. Microbiol.* 126: 151-165.
  33. Shimosaka, M., M. Nogawa, Y. Ohno, M. Okazaki (1993) Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* - Purification and some properties. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 231-235 .

### Isolation and Characterization of *Bacillus* sp. P16 Producing Extracellular Chitosanase

Ro-Dong Park\*, Mi-Ra Jung, Yoo-Young Jo, and Yeon-Tae Chi<sup>1</sup>(*Department of Agricultural Chemistry and  
1Department of Genetic Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea*)

**Abstract :** An endochitosanase-producing bacterium was isolated from soil and identified as a strain of *Bacillus* sp. The isolate was gram positive, rod shape ( $0.4\text{-}0.6 \times 1.6\text{-}2.2 \mu\text{m}$ ), endospore-forming, catalase positive, and mobility positive, and grown at pH 4.5-11.0 and upto 42°C in the medium containing 2% NaCl. RAPD analysis of the DNA purified from the strain was also performed, and the chitosanase-producing strain was named as *Bacillus* sp. P16. The culture supernatant of the strain showed strong liquefaction activity and rapidly decreased viscosity of chitosan solution. By TLC and HPLC, chitooligosaccharides of DP 2-7 were separated and identified from the enzyme hydrolyzates of chitosan. The chitosanase from *Bacillus* sp. P16 was thus regarded as an endo-splitting type.

Key words : chitosanase, chitooligosaccharide, *Bacillus* sp.

\*Corresponding author