

키토산 올리고당의 제조용 소재로서 *Bacillus* sp. P21 기원의 키토산분해효소

박노동* · 조유영 · 이현철¹ · 조종수² · 조도현³

전남대학교 농과대학 농화학과, ¹의과대학 미생물학교실,
²공과대학 고분자공학과, ³아주대학교 생물화학공학과

Endochitinase Produced by *Bacillus* sp. P21 as a Potential Source for the Production of Chitooligosaccharides. Park, Ro-Dong*, Yoo-Young Jo, Hyun-Chul Lee¹, Chong-Su Cho², and Do Hyun Jo³. Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, ¹Department of Microbiology, Medical School, ²Department of Polymer and Fine Chemical Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, ³Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 441-749, Korea - In an effort to develop a potent system for the production of various dp (degree of polymerization) chitooligosaccharides, 32 enzymes or microbial systems were screened for chitosanolytic activity using chitosan as a substrate. The efficiency of each enzyme system was evaluated by the changes of turbidity and viscosity of chitosan solution, the amount of precipitate and the reducing sugar-producing activity in the enzymatic reaction mixture. Based on these assay methods for the chitinase activity, *Bacillus* sp. P21 out of 32 screened systems showed highly potent endochitinase, which was comparable with a commercially available enzyme (E7). Chitooligosaccharides of dp 3-7 were separated by TLC as major enzymatic reaction products, suggesting that the chitinase from *Bacillus* sp. P21 be endo-splitting type.

Key words: endochitinase, chitooligosaccharides, *Bacillus* sp. P21

키토산의 가수분해물인 키토올리고당(chitooligosaccharides)은 식품 첨가물[18], 감염억제제[24], 항암제[23], 화장품[5], 혈중 콜레스테롤 강하제[22], 식물 생리조절제[6] 등 다양한 분야에서 개발이 기대되는 유용한 신기능성 소재로 등장하였으며[4, 19], 이에 따라 키토산 올리고당의 제조법에 관한 관심이 커졌다[7, 15].

키토산 올리고당은 일반적으로 Horowitz 등의 방법에 [8] 따라 키토산을 진한 염산으로 가수분해하여 얻는다. 이때 가수분해의 조건에 따라 다양한 중합도의 올리고당이 생성되지만, 생물활성이 강한 DP 3 이상의 올리고당의 수율은 저조하다. 키토산 및 키틴 올리고당은 chitinase나 chitinase를 이용하여 효소적 방법으로 생산할 수 있으며, 산가수분해법에 비하여 반응과정과 올리고당의 분포를 보다 용이하게 조절할 수 있는 장점이 있다[15]. 키토산 올리고당의 생산을 위해 *Bacillus* sp., *Penicillium* sp., *Streptomyces griseus*, *Serratia marcescens* 등 다양한 기원의 chitinase들이 개발되었으나[10, 14, 26], 아직까지 상업적 다량 생산이 되지않아 이들 효소를 이용한 올리고당의 상업적 생산은 경제성 측면에서 한계가 있다 [7, 28]. 한편, Yalpani 등은 glucanase, protease, lipase 등의 상업용 시판효소에서 키토산용액의 점도를 신속히

저하시키는 키토산분해효소 활성을 확인하고, 상업용 효소를 이용한 키토산 올리고당의 경제적 생산 가능성을 제시한 바 있다[15, 28].

본 연구에서는 키토산 키토올리고당의 생산에 적합한 효소원을 개발하기 위해서, 토양에서 미생물을 분리하고 이들이 생산하는 조효소에서 키토산 분해능을 탐색하였으며, 아울러 다양한 시판효소에서도 키토산 분해능을 탐색하였다.

재료 및 방법

효소

시판효소는 Sigma, Yakult, Wako 등에서 구입하여, 이를 50 mM sodium acetate(pH 5.5) 완충액에 1 mg/ml의 농도로 녹여서 사용하였다(Table 1). 본 실험실에서 분리한 미생물의 경우는 배양 상등액을 그대로 사용하였다. 이 미생물들은 해안의 갯벌 토양 시료에서 분리한 것들로 대부분(P1, P2, P11, P20, P21, P30, P53, P54)이 *Bacillus*속에 속하였으며 하나(A1)는 *Aspergillus* 속이었다.

효소활성의 측정

기질인 1% soluble chitosan(pH 5.5, sodium acetate buffer) 1.8 ml에 효소 0.2 ml를 가하고 잘 혼합한 뒤

*Corresponding author
Tel. 82-62-530-2133, Fax. 82-62-530-2139
E-mail: rdpark@orion.chonnam.ac.kr

Table 1. Sources of the enzymes

No.	Enzyme	Company	Source	Activity
E1	Chitinase	Wako Chem.	<i>Bacillus</i> sp	0.065 U/mg
E2	Chitinase	Sigma (C-6137)	<i>Streptomyces griseus</i>	4 U/mg
E3	Chitinase	Sigma (C-1650)	<i>Serratia marcescens</i>	1 U/mg
E4	Protease	Sigma (P-4880)	Papaya	0.5 U/mg
E5	Protease	Sigma (P-6911)	<i>Streptomyces griseus</i>	-*
E6	Peroxidase	Sigma (P-8125)	Horse radish	90 U/mg
E7	Chitosanase	Wako Chem.	<i>Bacillus pumilus</i> BN-262	800 U/g
E8	Lysozyme	Sigma (L-6876)	Chicken egg white	58,100 U/mg
E9	Catalase	Sigma (C-10)	Bovine liver	1,600 U/mg
E10	Macerozyme	Yakult	Living cells	-
E11	Cellulase	Yakult	Protoplast	-
E12	Hemicellulase	Sigma (H-2125)	<i>Aspergillus niger crude</i>	0.051 U/mg
E13	Neuraminidase	Sigma (N-2876)	<i>Clostridium perfringens</i>	1.1 U/mg
E14	β -Glucuronidase	Sigma (G-0876)	<i>Helixpomatia</i>	107,200 U/ml
E15	Lyticase	Sigma (L-8137)	<i>Arthrobacter luteus</i>	2,500 U/mg
E16	Sulfatase	Sigma (S-8629)	Limpets	18 U/mg
E17	β -Glucosidase	Sigma (G-8625)	Almonds	5 U/mg
E18	Glucose oxidase	Sigma (G-6891)	<i>Aspergillus niger</i>	2,500 U/g
E19	Drieselase	-	-	-
E20	α -Amylase	Wako Chem.	-	20 U/mg
E21	Pectinase	Sigma (P-5146)	<i>Aspergillus niger</i>	9 U/mg
E22	Pectolyse	Sigma (P-3026)	<i>Aspergillus japonicus</i>	3.9 U/mg
E23	Xanthine oxidase	Sigma (X-1875)	Butter milk	0.6 U/mg
P1	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
P2	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
P11	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
P20	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
P21	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
P30	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
P53	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
P54	Culture supernate	This lab	<i>Bacillus</i> sp.	-
A1	Culture supernate	This lab	<i>Aspergillus</i> sp.	-

*Not specified or measured.

37°C shaking water bath에서 60분 배양한 후 1 N NaOH 0.2 ml를 넣고 반응을 정지시키고 원심분리하였다(10,000 rpm×5 min). 생성된 총환원당은 Schales변법으로[9], 그리고 free glucosamine은 Reissig법으로 [17] 정량하였다. 이와 같은 조건에서 1 μ mole glucosamine/min 상당의 환원당을 생성하는 효소활성을 1 효소단위로 정의하였다. 1% soluble chitosan은 다음과 같이 조제하였다[26]. 10 g의 chitosan(금호화성 제품)을 증류수 400 mL에 부유시킨 다음, 1 M CH₃COOH 90 mL를 가하여 녹이고, 1 M CH₃COONa로 pH를 5.5로 맞추는 다음 0.1 M sodium acetate buffer(pH 5.5)로 부피를 1 L가 되게 조절하였다. 단백질 함량은 Bradford법 또는 파장 280 nm의 흡광도로 측정하였다.

액화능 분석

시판효소 용액 또는 배양 조효소액 1 ml를 취하여 1% soluble chitosan 9 ml와 혼합하여 진탕수조에서 10시간 동안 배양한 후 1 M NaOH 500 μ l를 가하여 vortexing 하고 이들의 탁도와 침전물을 비교하여 액화능(Liquefaction activity)을 평가하였다[16].

생성물 분석

TLC 시판효소 용액 또는 배양 조효소액 0.1 ml와 1% soluble chitosan 0.9 ml를 혼합하여 37°C에서 10시간 반응시켰다. 여기에 1 N NaOH를 가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리하여 상등액 10 μ l를 TLC plate에 점적한 다음 전개시켰다. 표준품으로는 monomer에서 heptamer

로 이루어진 glucosamine oligomer들의 혼합물을 사용하였으며, TLC plate는 Sigma에서 구입한 precoated plate(mean pore diameter: 60Å, Particle size: 5-17 µm, layer: 250 µm)를 사용하였다. 전개용매로는 n-propanol: ethylacetate: 암모니아수: H₂O(6:3:1:3) 혼합용매를 사용하였다. 발색시약은 에탄올에 녹인 0.2% 닌히드린 용액이었다[16].

HPLC 시판효소 용액 또는 배양 조효소액 0.1 ml와 1% soluble chitosan 1.0 ml을 혼합하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 1 N NaOH로 반응을 정지시키고 원심분리하여 상등액을 HPLC로 분석하였다. 분리컬럼으로 Carbohydrate column을, 검출기로는 RI detector를 사용하였으며, 용출용매는 acetonitrile:water(6:4)이었다[16].

점도 측정

효소의 작용에 따른 1% 키토산 용액의 점도 변화를 Brookfield synchroelectric viscometer(Model LVT, Spindle number 18, Temperature 37°C)를 사용하여 측정하였다[16].

활성 염색

Trudel 등의 방법을[25] 원용하여 SDS-PAGE 상에서 endochitosanase를 활성 염색하였다. 즉, 0.1% soluble chitosan이 포함된 12.5% SDS-PAGE를 조제하고 전기영동한 다음, gel을 1% Triton X-100/1% skim milk/100 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에서 2시간 동안 37°C에서 배양한 후, 다시 1% Triton X-100/100 mM sodium acetate buffer에서 1시간 배양하였다. 이 gel을 0.01% Calcofluor White M2R/0.5M Tris-HCl (pH 8.9) 용액에서 7분간 배양한 후 증류수로 충분히 세척하고 UV illuminator 위에서 lytic zone을 관찰하고 사진을 찍었다.

결과 및 고찰

Chitosanase 활성 검색

Chitosanase는 주로 미생물 *Actinomycete*[1], *Acinetobacter*[20], *Myxobacter*[3], *Amycolatopsis*[21], *Bacillus* [12, 16, 26], *Streptomyces*[14], *Penicillium*[2], *Pseudomonas*[11], *Fusarium*[13] 등에서 분리 연구되고 있으며, 이들을 고중합도 키토산올리고당의 생산용 소재로 개발하기 위한 응용연구도 활발하다[7, 10, 14, 18, 26]. 본 연구에 사용한 효소들은, Table 1에 나타낸대로, 23종의 시판효소, 8종의 *Bacillus* sp.의 배양 조효소, 1종의 *Aspergillus* sp.의 배양 조효소 등 32종이었다. 8종의 *Bacillus* sp.는 본 연구실에서 선별된 것이며 비교적 키토산분해효소능이 우수한 것들이다. 시판효소들은 대부분

Table 2. Chitosanase activity of the enzymes by the decrease in turbidity and precipitate of reaction mixture

Enzymes	Turbidity	Precipitation
E1	+++	++
E2	+++	+++
E3	+++	+++
E4	++++	+++
E5	+++++	+++++
E6	+++	+++
E7	-	+
E8	++++	++++
E9	+	+++
E10	+	+++++
E11	++	+++++
E12	+++++	+++++
E13	+	+++++
E14	+++	+++
E15	++	++++
E16	++	+++++
E17	++++	+++++
E18	++	+++++
E19	++++	+++
E20	++	+++++
E21	++	++++
E22	+++++	+++++
E23	+	+++
P1	+	++
P2	+++	+++
P11	+++	+++
P20	-	+
P21	-	+
P30	+++	++
P53	+	+
P54	+++	++
A1	+	+++

*Chitosanase activity was measured by the decrease in turbidity and the amount of precipitate after incubation of each enzymes with the substrate chitosan and neutralization. -; no turbidity or precipitation (most active), +++++; heaviest turbidity or precipitation. (least active).

상당한 활성의 다른 효소를 함유하고 있는 것으로 알려져 있으므로[14, 15, 28] 본 연구에 함께 사용하였다.

각 효소의 키토산에 대한 가수분해활성을 배양 후 반응액의 pH를 약알칼리로 조절한 다음 나타나는 탁도와 침전물의 양을 기준하여 평가하였다(Table 2). 반응물의 탁도는 E7, E9, E10, E13, E23, P1, P20, P21, P53, A1에서 뚜렷이 감소하였다. 침전물의 양의 감소는 E7, P20, P21, P53에서 뚜렷하였다. 이 두가지 효소활성은 키토산에 대한 내부기수분해활성을 정성적으로 나타내는 것으로, E10과 E13에서 보는 바와 같이 그 결과가 항상 일치하지는 않았다.

그리고 키토산 분해활성을 보다 정량적으로 평가하고자

Table 3. Chitosanase activity of the enzymes by the production of total reducing sugar and free glucosamine

Source	Chitosanase activity (U)	
	Reducing sugar	Free glucosamine
E1	6.12	0.31
E2	1.54	0.29
E3	2.02	0.15
E4	0.88	0.48
E5	0.70	0.10
E6	1.30	0.58
E7	9.99	0.60
E8	2.18	0.13
E9	0.84	0.03
E10	0.75	0.03
E11	1.06	0.17
E12	1.23	0.23
E13	0.86	0.00
E14	0.97	0.01
E15	1.06	0.03
E16	0.72	0.04
E17	1.32	0.38
E18	0.79	0.05
E19	0.97	0.06
E20	0.84	0.03
E21	0.92	0.02
E22	0.84	0.06
E23	10.44	0.01
P1	6.10	0.47
P2	3.30	1.32
P11	2.92	0.44
P20	10.59	0.44
P21	10.12	0.47
P30	7.01	0.86
P53	14.99	0.94
P54	2.39	0.02
A1	16.57	2.85

*The amounts of total reducing sugar and free glucosamine were measured by the modified Schales method and Reissig method, respectively, after incubation of each enzyme with the substrate soluble chitosan. One enzyme unit defines as the production of 1 μmole glucosamine equivalent per min at 37 C.

총환원당 생성능력과 free glucosamine의 생성능력을 조사하였다. Table 3에 나타낸 바와 같이 시판효소들은 0.7-10.4 효소단위 범위의 키토산 분해능을 보였으며, 선발한 균주 배양상등액은 2.3-16.5 효소단위 범위의 분해능을 보였다. 이 중 E1, E7, E23, P1, P20, P21, P30, P53, A1 등이 강한 총환원당 생성능력을 나타냈다. 균주 P21 등의 환원당 생성능은 조효소 중의 다양한 동위효소들의 작용으로 강하게 나타났을 것으로 추정되었다. 이 중에서 free glucosamine의 생성활성은 exochitosanase 활성을 나타내는 것이며, E6, E7, P2, P30, P53, A1 등에서 비교적 강하게 나타났다. 각 효소의 총환원당 생성능은 탁도 또는 침

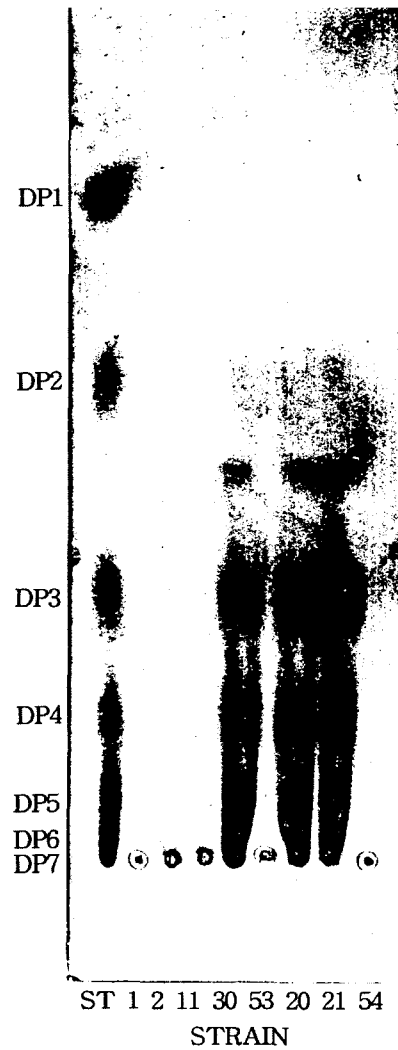


Fig. 1. TLC chromatograms of chitosan chitoooligosaccharides. Soluble chitosan was incubated with the each supernatant of the screened *Bacillus* spp. P1, P2, P11, P20, P21, P30, P53 and P54, and the products were analyzed by TLC.

전량의 저감 능력과 항상 일치하지는 않았다. 이런 불일치는 다른 연구자들의 연구에서도 관찰되는 것이다[14]. Pantaleone 등은 38종의 시판효소가운데 35종에서 키토산 분해효소의 활성을 확인하였으며, 이 중 17종은 60-100% 정도 감소를 일으키는 강한 키토산분해효소 활성을 보였다[15]. 이러한 효소활성은 시판효소 제품에 미량으로 존재하는 chitosanase에서 비롯된 것으로 추정하였다[15, 28]. Murakami 등도 다양한 기원의 42종의 시판효소에서 키토산 분해활성을 검색하여, 4종의 제품을 제외한 38종의 제품에서 키토산 분해효소 활성을 검출하였으며 이들 효소 반응의 생성물을 TLC로 분석한 바 있다[14].

Chitosanase의 선발

이들 32종의 효소들 가운데 본 실험실에서 선발한 미

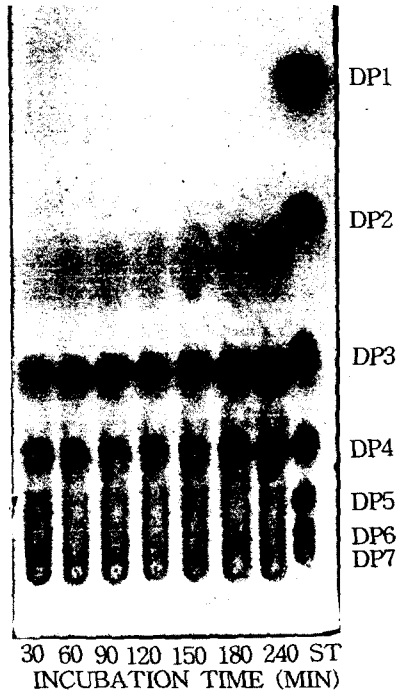


Fig. 2. Effect of enzyme reaction time on the composition of chitoooligosaccharides. Soluble chitosan was incubated with the culture supernate of *Bacillus* sp. P21, for various time intervals and the products were analyzed by TLC.

생물들이 생산하는 조효소들이 상대적으로 강한 키토산 분해능을 보였으며 (Table 2, Table 3), 다양한 중합도를 갖는 키토산 올리고당의 생산에 적합한 효소원으로 주목을 끌었다. 이들 효소의 키토산 분해산물을 TLC로 분석하여 그 분해 패턴을 검토하고자 하였으며, 그 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 균주 P20, P21, P30이 선발한 미생물들 가운데 키토산에 대한 강한 분해활성을 가지는 효소를 생산하였다. 이들의 키토산 분해산물의 조성은 3당류 이상의 올리고당이 대부분이었다. 단당류는 거의 생성되지

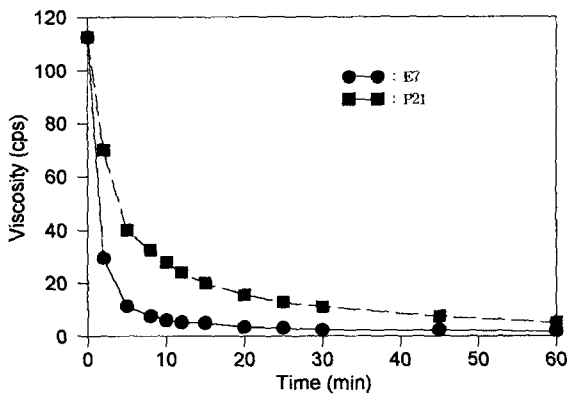


Fig. 3. Viscosity changes of 1% chitosan solution during incubation with the culture supernate of *Bacillus* sp. P21 or commercial enzyme E7.

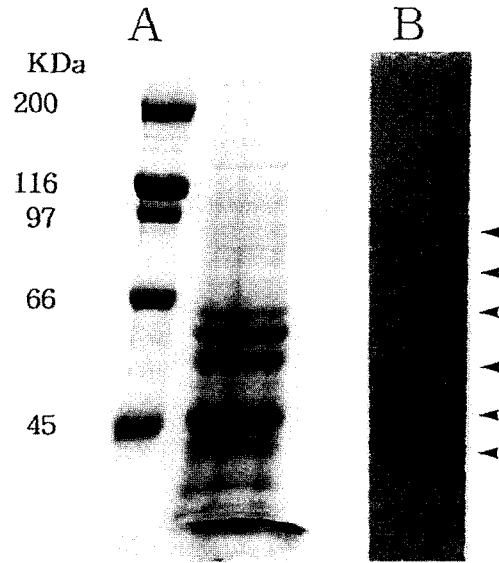


Fig. 4. SDS-PAGE (A) and active staining of endochitosanase after electrophoresis (B).

SDS-PAGE was performed in 10% polyacrylamide gel containing 0.01% soluble chitosan. For active staining, the gel was renatured, incubated and stained with Calcofluor white M2R. Arrow heads are the bands with chitosanolytic activity. The left lane in panel A contains molecular weight markers as indicated.

않는 것으로 보아 이들 효소는 주로 내부기수분해 활성이 강한 것으로 추정되었다. 그러므로 이들은 고중합도 키토올리고당의 생산을 위한 소재로 활용 가능성이 큰 것으로 평가되었다. 이 중에서 P21은 반응물의 탁도와 침전량의 감소, 총환원당 생성능, 낮은 exochitosanase 활성 등에 근거하여 판단할 때, 다양한 중합도의 키토올리고당의 생산에 적합한 효소 생산 균주로 간주되었다.

키토산분해효소의 반응 특성

Fig. 2는 균주 P21이 생산하는 조효소와 키토산을 반응시키며 시간에 따른 분해산물의 조성을 TLC로 분석한 것이다. 반응시간을 30분부터 4시간까지 조사한 결과, 중심 생성물은 DP 3-7 또는 그 이상의 고중합도 키토올리고당이었으며 반응시간에 따라 그 조성이 크게 변하지 않았다. 이는 이 효소가 당전이활성(Transglycosylation activity)을 갖는다는 것을 기인할 수도 있을 것이다[27].

Fig. 3은 키토산 분해효소와 키토산 반응혼합액의 점성 변화를 반응시간에 따라 측정된 것이다. E7과 균주 P21이 생산하는 조효소는 다 같이 신속히 키토산의 점성을 감소시켰다. 균주 P21의 배양 상등액은 본 실험실에서 선발한 균주들 가운데 키토산 용액의 점성 감소 활성이 가장 높았으나, 이의 키토산분해효소 활성을 시판효소 E7의 활성과 단순히 점성 감소 활성으로 비교하였을 때, E7의 그것에는 미치지 못하였다. 그러나 E7은 시약급의 효소로 이를 1 mg/ml로 희석하여 사용하는데 비하여

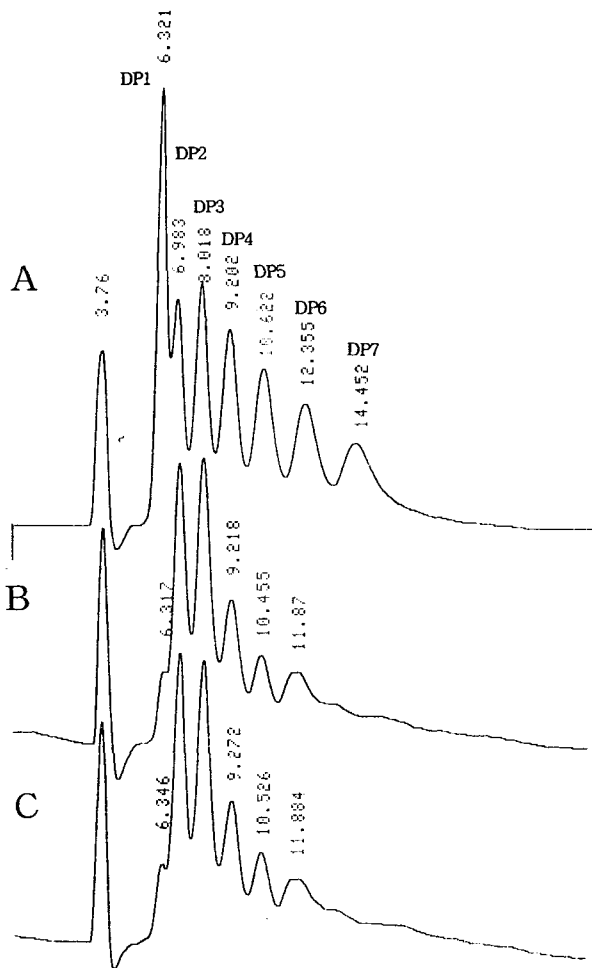


Fig. 5. HPLC chromatograms of chitosan hydrolyzates. Soluble chitosan was incubated with the culture supernate of *Bacillus* sp. P21 or commercial enzyme E7, and the products were analyzed by HPLC.

A; Mixture of standard chitooligosaccharides (monomer DP1 to heptamer DP7), B; Chitosan hydrolyzate by P21, and C; Chitosan hydrolyzate by E7

P21의 그것은 조효소액을 그대로 사용하였음을 고려한다면 P21이 생산하는 효소는 키토산을 내부가수분해하는 효소활성이 큰 것으로 평가되었다. 고분자 용액의 점성의 감소는 고분자 내부 사슬의 절단과 직접 관계되므로, 이는 곧 endochitosanase의 활성으로 평가된다. 그러므로 키토산 분해효소의 활성을 단순히 효소의 키토산 용액의 점성 감소 활성으로만 평가하기도 하며[15, 28], 이는 총환원당 생성능력과 비교적 일치하였다[28].

키토산내부분해효소(endochitosanase)의 활성을 평가하는 또 다른 방법으로 활성염색법을[25] 시도하였다. Fig. 4는 균주 P21의 배양 상등액을 SDS-PAGE와 활성염색한 것이다. 단백질을 색소 Coomassie Blue로 염색하였을 때 분자량 35-66 kDa 범위의 6 단백질이 중심 단백질로 나타났으며, 이를 활성염색하였을 때는 분자량 40-

90 kDa 범위의 6개의 분해활성 띠를 확인하였다. 그중 분자량 40 kDa과 45 kDa의 단백질이 가장 강한 키토산내부분해효소(endochitosanase) 활성을 보였다. 이러한 다중의 동위효소(multiple isoform)에 의한 분해활성 띠는 키틴분해효소의 경우에도 마찬가지로 관찰된다[25].

Fig. 5는 시판효소 E7과 선발균주 P21이 생산한 조효소의 키토산 분해산물을 HPLC로 분석 비교한 결과를 보여 준다. 어느 것에서나 이당류 이상의 올리고당을 주 생성물로 확인할 수 있었으며, 두 효소의 키토산 분해산물의 조성에서는 별 차이를 발견할 수는 없었다. 그러나, 균주 P21 효소의 키토산 분해산물의 HPLC 결과는 Fig. 1과 2의 TLC 결과와 약간 상이한 점이 있었다. 즉, TLC에서는 이당류의 함량이 미미하게 나타났으나 HPLC에서는 그 함량이 전체 올리고당의 약 30%를 차지하는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보건대, 균주 P21은 다양한 중합도의 키토산올리고당의 효소적 생산을 위한 응용 소재로 개발할 가치가 있는 것으로 평가되었다. 이 균주가 생성하는 효소의 최적 반응조건 등을 면밀히 검토하여 조절하면 생물활성이 강한 고중합도의 키토산올리고당을 효소적으로 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

다양한 중합도의 키토산 올리고당의 생산에 적합한 효소원을 개발하기 위해서 23종의 시판효소와 토양에서 분리한 8종의 *Bacillus* sp.와 1종의 *Aspergillus* sp.가 생산하는 조효소에서 키토산분해효소의 활성을 검색하였다. 각 효소의 키토산에 대한 가수분해활성은 탁도의 변화, 반응 후에 생성되는 침전물의 양, 총환원당 생성능력, 점도의 감소 속도 등을 기준하여 평가하였다. 시험한 효소원 가운데서 키토산에 대한 강한 분해활성을 가지는 효소는 P21이 생산하는 것이었다. 이 균주가 생성하는 chitosanase는, HPLC와 TLC에 의한 분해산물의 분석과, 점도 변화의 측정과 활성염색 등에 근거하여, 주로 내부가수분해활성을 갖는 것으로 판단되었다. 이 효소는 키토산 올리고당의 생산에 적합한 효소 소재로 가능성이 큰 것으로 평가되었다.

감사의 글

본 연구는 농림부의 농림수산 특정연구 개발비의 지원을 받아 수행된 내용의 일부이며, 연구비의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ando A., H. Morosawa, H. Sato, M. Yadome, S. Oka-

- jima, M. Nakanishi, H. Shinoyama, and T. Fujii. 1993. Primary structure of chitosanase produced by an *Actinomyces*, pp. 49–50. Proceeding of the 7th Chitin/Chitosan Symposium, *J. Soc. for Chitin and Chitosan*.
2. Fenton, D. M. and E. D. Eveleigh. 1981. Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen. Microbiol.* **126**: 151–165.
 3. Hedge, A. and R. S. Wolfe. 1974. Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both B-1,4-glucanase and chitosanase activities. *J. Bacteriol.* **120**: 844.
 4. Hirano, S. 1989. Production and application of chitin and chitosan in Japan, pp. 37–43. In G. Skjak-Break, T. Anthonsen, and P. Sandford (eds), *Chitin and Chitosan*, Elsevier.
 5. Hirano, S., K. Hirochi, K. Hayashi, T. Mikami, and H. Tachibana. 1991. Pharmaceutical and cosmetic uses of chitin and chitosan, pp. 95–104. In C. G. Gebelein(ed.), *Cosmetic and Pharmaceutical Polymers*, Plenum, New York.
 6. 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.
 7. Hong, G. P. and D. S. Kim. 1998. Chitinolytic characteristics of cellulases from *Tricoderma viride* and *Tricoderma reesei*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**(2): 245–252.
 8. Horowitz, S. T., S. Roseman, and H. T. Blumenthal. 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharides I. Separation. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 5046–5049.
 9. Imoto, T. and K. Yagishita. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1154–1156.
 10. Izume and Ohtakara A. 1987. Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1189–1191.
 11. Kazutoshi, Y., J. Hosokawa, T. Kubo, M. Nishiyama, and Y. Koba. 1992. Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(6): 972–973.
 12. Lee, H. W., J. W. Choi, D. P. Han, N. J. Park, N. W. Lee, and D. H. Yi. 1996. Purification and characteristics of chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**(1): 19–25.
 13. Makoto, S., M. Mogawa, Y. Ohno, and M. Okazaki. 1993. Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*-Purification and some properties. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(2): 231–235.
 14. Murakami, E., K. Hasekawa, J. Tamura, and K. Kadowaki, 1992. The Efficient production of high dp chitoooligosaccharides by enzymatic hydrolysis of chitosan, pp. 259–267. In C. Brine, P. Sandford, and J. Zikakis (eds), *Advances in Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, London.
 15. Pantaleone, D., M. Yalpani, and M. Scollar. 1992. Unusual susceptibility of chitosan to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **237**: 325–332.
 16. Park, R. D., M. R. Jung, Y. Y. Jo, and Y. T. Chi. 1997. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. P16 producing extracellular chitosanase. *Agric. Chem. and Biotechnol.* **40**(5): 369–374.
 17. Reissig, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugar. *J. Biol. Chem.* **217**: 965–968.
 18. Sakai, W. 1987. Development of chitoooligosaccharides from chitin and chitosan. pp. 110–137. *Advances and Application of Chitin and Chitosan*, Japanese Society for Engineering and Technology, Tokyo. Japan
 19. Sandford, P. A. 1989. Chitosan: commercial uses and potential applications, pp. 51–50. In G. Skjak-Break, T. Anthonsen, and P. Sandford(eds), *Chitin and Chitosan*, Elsevier.
 20. 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.
 21. Shoji, O., A. Ando, H. Shinoyama, and T. Fujii. 1994. Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* sp. CsO-2. *J. Ferment. Bioeng.* **77**(6): 617–620.
 22. Sugano, N., K. Yoshida, M. Hashimoto, K. Enomoto, and S. Hirano. 1992. Hypocholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosans, pp. 472–478. In C. J. Brine, P. A. Sandford, and J. P. Zikakis(eds), *Advances in Chitin and Chitosan*, Elsevier.
 23. Suzuki, S., M. Suzuki, T. Tokami, T. Matsumoto, T. Watanabe, and M. Kobayashi. Host defense mechanism of hexa-N-acetylchitohexaose, pp. 1–6. In S. Tokura and I. Azuma(eds), *Chitin Derivatives in Life Science*, Japanese Society for Chitin and Chitosan.
 24. Tokoro, A., M. Kobayashi, 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. *Microbiol. Immunol.* **33**: 357–367.
 25. Trudel, J. and A. Asselin. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **178**: 362–366.
 26. Uchida, Y., M. Izume, and A. Ohtakara. 1989. Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus* sp. No. 7-M. *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.* **66**: 105.
 27. Usui, T., Y. Hayashi, F. Nanjo, K. Sakai, and Y. Ishido. 1987. Transglycosylation reaction of a chitinase purified from *Nocardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta* **923**: 302–309.
 28. Yalpani, M. and D. Pantaleone. 1994. An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **256**: 159–175.

(Received December 22, 1997)