

키토사네이즈 유전자의 클로닝과 키토산 올리고머의 정량적 생산

박유미 · 장혜란 · 허태린 · 김사열*
경북대학교 생명공학부

Molecular Cloning of Chitosanase Gene and Quantitative Production of Chitosan Oligomer. Park, You-Me, Hye-Lan Chang, Tae-Lin Huh, and Sa-Youl Ghim*. School of Life Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea – Six bacterial strains which formed large halo on chitosan-containing agar plate were isolated from beach mud and crabs at South coast of Korean peninsula. They were designated as *Bacillus cereus* KNUC51, *B. cereus* KNUC52, *B. cereus* KNUC53, *B. cereus* KNUC54, *B. cereus* KNUC55, and *Paenibacillus favisporus* KNUC56 by analysing their morphologies and 16S rDNA sequences. Chitosanase activities of all isolates were similar to that of *B. subtilis* 168. To enhance the activity of chitosanase, a powerful mutagen, MNNG was treated for *P. favisporus* KNUC56. Three mutants showed higher activity of chitosanase than that of the original strain. The DNA fragments containing chitosanase gene from *B. cereus* sources were cloned, sequenced, and their deduced amino acid sequence analysis showed over 93% homologies with that of the known *B. cereus* ATCC14579. Extracellular sample from the isolates was incubated in proper reaction mixture including chitosan for 5 minutes at 37°C to produce 3~10 chitosan oligomers which has been known to be active for clinical agents and agronomical agents.

Key words: Chitosan, 16S rDNA, chitosanase, *csn*

키토산 올리고당은 키토산 중합체를 가수분해한 산물로써 식품 첨가물, 향암제, 화장품 첨가물, 혈중 콜레스테롤 강하제, 식물 생리조절제 등 다양한 분야에서 개발이 기대되는 유용한 신 기능성 소재로 등장하였다[17, 5, 16, 6]. 키토산 올리고당을 제조하는 방법에는 키토산에 염산을 가하여 저분자로 만드는 방법과 키토산을 가수분해하는 효소인 chitosanase를 이용하는 방법이 있다[7]. 염산을 이용하는 방법은 비용이 저렴하고 제조 방법이 간단하다는 이점이 있지만, 사용한 염산의 제거가 쉽지 않고, 안정성이 떨어지며 맛이 저하되는 등의 문제가 있어서 효소를 이용하는 방법을 적극적으로 고려하게 되었다.

현재까지 비용 상의 문제로 염산 처리 방법을 채택하고 있는 공장들이 많이 있는데, 그것은 키토산 올리고머의 잔기 숫자 조절이 용이하지 않기 때문이다. 실제로는 현재 시판되고 있는 키토산 올리고당 제품들이 올리고당이 아닌 단당인 경우가 많아 그 효능을 신뢰하기 어렵다. 단당의 경우 기존에 알려진 키토산 올리고당과 비교하여 그 기능이 약한 것으로 보고 되고 있다[19]. 이에 따라, 일차적으로 효소를 분비하는 균주를 확보하고, 효능이 뛰어난 3~10 정도의 잔기를 가진 올리고당을 생산할 수 있는 적절한 생산 조건을 찾아내는 것이 필요하게 되었다.

그동안 chitosanase는 *Bacillus* sp.[8, 20, 21], *Matsuebacter chitosanotabidus* 3001[12], *Pseudomonas* sp. H-14[22], *Streptomyces griceus*[14], *Acinetobacter* sp.[15] 등의 다양한 미생물에서 분리, 연구되어왔다. 또한, 효소의 기질 인식 특성에 따라 3가지 그룹으로 구분되고 있다[8]. 이들은 그 그룹에 따라 효소의 형태와 아미노산 서열 및 DNA 염기 서열의 유사 정도가 서로 다르다.

본 연구에서는 한반도 남해에서 채집한 시료에서 chitosanase를 분비하는 세균들을 분리하고 동정하였으며, 그 분비 효소의 활성을 측정하였다. 동시에 기질을 원하는 크기의 oligomer로 분해 할 수 있는 가장 적절한 반응 시간을 측정하였다. 또한 그 효소를 지정하며 생산하는 유전자를 찾아내어, 염기 서열을 결정하였다.

재료 및 방법

선별 배지 및 키토산 분해 효소 분비 균주 선별

키토산 분해 효소를 분비하는 균주를 선별하기 위해 남해안의 여러 곳에서 갯벌의 진흙과 게를 채취하였다. 채취한 시료는 0.9% NaCl 용액에 희석하여 선별 배지에 도말 하였다. 선별 배지로는 0.4% 키토산을 각각 첨가한 LB 고체 배지(1.5% agar, 1% Bacto tryptone, 0.5% Bacto yeast extract, 0.5% NaCl, 0.1% glucose)와 chitosan medium plate(1.5% agar, 0.25% Bacto yeast extract, 0.25% polypeptone, 0.5% MgSO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.7% K₂HPO₄)를 사용하였다[1, 12].

*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5374, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ghimsa@knu.ac.kr

선별 배지에 나타난 균집 중에서 투명환이 생성되는 부위의 집락에서 균주를 순수 분리하였다.

선별된 균주의 형태 관찰과 분류

선별된 균주는 30°C에서 6시간 동안 LB 배지에서 배양한 후 염색체 DNA를 분리하였다. 이것을 주형으로 GF1과 GR1 primer(GF1:5-TAACACATGCAAGTCGAACG-3, GR1:5-GGTGTGACGGCGGTGTGTACAAG-3)를 이용해서 denaturation(94°C, 3분)시킨 후, annealing(60°C, 30초), elongation(72°C, 30초) 단계를 35회 반복하여 incubation(72°C, 15분)하는 조건으로 PCR을 수행하였다[13]. 증폭시킨 DNA 단편들을 전기 영동으로 분리한 다음 DNA Prep mate™ II(Bioneer, Korea)를 사용하여 회수하였다. 얻어진 DNA 단편을 pGEM®-T EASY vector systems(Promega, USA)에 클로닝한 후 *E. coli* XLI-Blue에 calcium chloride 방법[4]으로 형질 전환시켰다. 형질 전환된 균주를 ampicillin을 첨가한 LB 배지에 접종한 후, 16시간 동안 배양하고 Plasmid extraction kit(Bioneer, Korea)를 이용해 insert DNA가 삽입된 플라스미드 DNA를 분리하여서 그 염기 서열을 결정하였다. 각각의 결정된 염기 서열은 NCBI BLAST search를 이용해서 분석하였다.

또한, 선별된 균주를 LB 배지에 배양한 후 건조시켜 시료로 준비하였다. 준비한 시료는 백금(Pt)으로 15 mA에서 90 초 동안 코팅(E-1030 ION SPUTTER-HITACHI, Japan)하였으며 Field Emission Scanning Electron Microscope(FE-SEM, HITACHI S-4300)로써 형태를 관찰하였다[11].

키토산 분해 효소 활성의 측정

Chitosanase 활성 측정에는 modified Schales' method를 사용하였다[18]. 균주를 30°C에서 8시간 동안 LB 배지에 배양한 후 원심분리하여 그 상등액 30 µl를 조효소로 사용하였다. 1% soluble chitosan(pH 5.5, sodium acetate buffer) 1 ml를 기질로 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1N NaOH 200 µl로 반응을 중단시키고 원심분리하여 상층액 750 µl를 0.5 M sodium carbonate(anhydrous) 1 L에 0.5 g potassium ferricyanide를 첨가한 발색 시약 1 ml와 반응시켜 15분간 100°C에서 중탕한 후 실온에서 식혀 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검정 곡선으로는 D-glucosamine을 양에 따라 반응시켜 사용하였다. 1 unit은 단백질 1 mg이 1분 동안 생산해 내는 환원성 말단의 양(µmol)으로 정의하였다.

단백질 정량을 위해서는 Coomassie protein assay reagent(Pierce, U.S.A.)를 사용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하였다[3].

효소 활성 증기를 위한 돌연변이 유발 물질 처리

활성이 약한 한 균주의 키토산 분해 효소 활성을 높이기

위해서 강력한 돌연변이 유발 물질인 *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine(MNNG)를 처리하였다[9]. 우선 LB 배지에 8시간 배양한 균주를 집균한 후 0.1 M citrate buffer(pH 5.5) 15 ml로 두 번 씻어내었다. 15 ml citrate buffer로 재현탁한 후 6개의 시험관에 나누어 담았다. 50 µg/ml의 MNNG를 100 µl씩 각 시험관에 넣은 다음 37°C에서 교반 배양하여 시간대 별로(0분, 5분, 10분, 15분, 30분, 45분) 처리하였다. 처리한 시료를 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0) 5 ml로 두 번 씻어낸 다음 500 µl phosphate buffer로 재현탁 시켰다. 준비된 시료를 각각 선별 배지에 도말하여 30°C에서 48 시간 동안 배양하였다. 원 균주와 비교하여 비슷하거나 더 큰 투명환을 형성하는 집락을 선택하여 2차로 선별 배지에 배양하였으며 그 중 큰 투명환을 형성하는 집락을 선택하여 3차로 선별 배지에 옮겨 배양하였다. 시료에 대해서는 modified Schales' method로 키토산 분해 효소 활성을 측정하였다.

csn 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

선별된 균주는 30°C에서 6시간 동안 LB 배지에서 배양한 후 염색체 DNA를 분리하였다. 이것을 주형으로 BOF와 BOR primer(BOF-AAAAGGAAGCTGACAACATA, BOR-AAAACATTAATAAAGGAAGACTAGCG)를 이용하여 denaturation(94°C, 3분)시킨 후, denaturation(94°C, 30초), annealing(55°C, 30초), elongation(72°C, 30초) 단계를 35회 반복하여 incubation(72°C, 15분)하는 조건으로 PCR을 수행하였다. 증폭시킨 DNA 단편들을 전기영동으로 분리한 다음 DNA Prep mate™ II(Bioneer, Korea)를 사용하여 회수하였다. 얻어진 DNA 단편을 pGEM®-T EASY vector systems(Promega, U.S.A.)에 클로닝한 후 *E. coli* XLI-Blue에 형질 전환하였다. 형질 전환된 균주를 ampicillin을 첨가한 LB 배지에 접종한 후, 16시간 동안 배양하고 Plasmid extraction kit(Bioneer, Korea)를 이용해 Plasmid DNA를 분리하여서 삽입 부위 DNA의 염기 서열을 결정하였다.

결정된 염기 서열은 NCBI BLAST search를 이용해서 동정하였고 NCBI translated BLAST search 및 EXPASY translation program을 이용하여 아미노산 서열을 결정하였다. 이것을 다시 CLUSTAL-W를 이용하여 *Bacillus cereus* ATCC14579의 chitosanase와 아미노산 서열의 유사성을 비교하였다.

효소 반응 산물의 키토산 올리고머 크기 측정

박층크로마토그래피(Thin-layer chromatography)를 이용해 적정 올리고당을 생산해내는 시간을 측정하였다[2]. 이 때 전개판은 Kieselgel 60 plate(Merk, U.S.A.)를 사용했고, 전개 용매는 *n*-propanol과 30% ammonia를 2:1의 부피로 섞어 사용하였다. 전개 후, 전개판에 acetone에 녹인 4%(w/v) diphenylamine, 4%(w/v) aniline과 ortho-phosphoric acid를

5:5:1(v/v/v)의 부피로 혼합한 용액을 도포하였다. 이를 건조한 후, 100°C에서 10분간 발색시켜 chitosan oligomer를 확인하였다. 생성물의 분석을 위하여 표준시료로 chitosan oligomer mixture(Seikagaku, Japan)를 이용하였다.

결과 및 고찰

키토산 분해 효소 분비 균주의 선별과 분류

남해안에서 갯벌 진흙 5종과 계 3종의 시료를 채집하여 키토산 분해 효소 분비 세균 분리 재료로 사용하였다. 선별 배지로 사용한 2종류의 고체 배지에서 나타난 수백 가지의 균주 중에 투명환을 크게 형성하는 균주들을 분리하여 최종적으로 6종을 선별하였다.

부분 동정용 16S rDNA sequencing analysis를 위해 설계된 한 쌍의 primer를 사용해 예상했던 약 1.4 Kb 정도의 ribosomal DNA 단편을 얻을 수 있었다. 결정된 염기서열을 NCBI BLAST search를 이용해 확인해 본 결과, 5가지 균주는 *Bacillus cereus*로, 나머지 한 균주는 *Paenibacillus favisporus*로 각각 99%와 98%의 염기서열 상동성을 가지는 것으로 나타났다. 각각의 염기서열의 정보는 NCBI에 등록했고 *Bacillus cereus*로 나타난 균주들에 각각 KNUC51, KNUC52, KNUC53, KNUC54, KNUC55라는 분리 균주명을 붙였고, *Paenibacillus favisporus*로 나타난 균주에는 KNUC56이라는 분리 균주명을 붙였다. 각 균주의 16S rDNA sequence에 대하여 NCBI에 등록된 accession number는 AY279194, AY279196, AY279195, AY279192, AY279191, AY279193 등이다.

국내에서 분리된 키토산 분해 효소 분비 균주는 *Bacillus* 속 혹은 *B. cereus*로 보고된 경우가 다수이고, 본 연구에서도 그런 결과로 나타났다. 반면에 *Paenibacillus*가 chitosanase를 분비한다는 보고는 일본에서 한 번 발표되었고 그 후로는 발표된 바가 없어서 희소가치를 가지는 것으로 여겨진다[10].

Field Emission Scanning Electron Microscope로써 *B. cereus* KNUC54(Fig. 1A)와 *P. favisporus* KNUC56(Fig. 1B) 두 균주의 형태를 관찰하였는데, 전자는 후자보다 좀 더 간균에 가까운 형태를 가지고 있었다. 후자의 경우에는 균과 균 사이에 끈끈한 물질이 관찰되는 것으로 보아 어떤 종류인지는 확인할 수 없었지만 상당한 양의 다당류를 생성하여 분비하는 것으로 추측되었다.

키토산 분해 효소 활성의 측정

Schales' method는 환원성 말단 당의 양을 측정할 수 있는 방법으로 chitosanase가 chitosan polymer를 oligomer로 가수 분해할 때 생겨나는 환원성 말단 당량을 측정한다. *B. cereus* 균주들은 현재 국내에서 산업적으로 사용되고 있는 *Bacillus* sp. P21 보다는 낮은 활성을 나타냈지만 *B. subtilis*

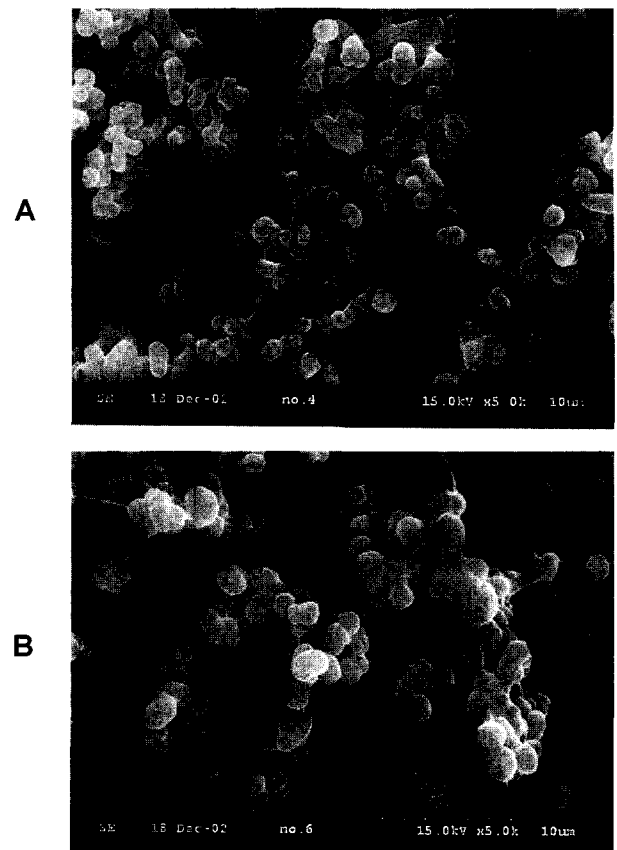


Fig. 1. Photographs of FE-SEM of chitosanase-producing bacteria at 5,000 magnifications. A, *Bacillus cereus* KNUC54; B, *Paenibacillus favisporus* KNUC56.

168과는 유사하거나 조금 낮은 활성을 나타냈으며 *P. favisporus* KNUC56의 조효소는 Table 1에 표시한 것처럼 기준에 chitosanase를 분비한다고 알려진 *B. subtilis* 168의 조효소와 비교하여 유사한 활성을 나타내었다.

돌연변이 균주의 효소 활성

P. favisporus KNUC56의 chitosanase 활성을 더욱 높이기

Table 1. Chitosanase activities of isolates, *Bacillus* sp. P21 and *Bacillus subtilis* 168

Sample	Amount of protein	Amount of reduced end	Activity (unit/ml)
	mg/ml	mg/ml	
KNUC51	0.0397	0.405	860.45
KNUC52	0.0423	0.46	917.23
KNUC53	0.0376	0.395	886.03
KNUC54	0.0412	0.415	849.60
KNUC55	0.046	0.44	806.78
KNUC56	0.048	0.43	750.58
<i>Bacillus</i> sp. P21	0.036	0.475	1112.8
<i>B. subtilis</i> 168	0.0417	0.465	940.53

위해서 돌연변이 유발 물질인 MNNG를 시간대 별로 처리하여 선별 배지에 도달하여 투명환이 원균주와 비교해 비슷하거나 더 크게 형성되는 200여개의 집락을 1차 선별하였다. 선별한 균주를 선별 배지에 다시 streaking하여 형성된 집락 주변의 투명환 크기를 비교하였을 때 원균주에 비해 투명환을 크게 형성하는 50여개의 집락을 2차 선별하였다.

2차로 선별된 집락을 단백질 정량을 거치지 않은 약식의 효소 활성 측정 방법을 통해 원균주보다 활성이 높은 15균주를 3차 선별하였다. 3차로 선별된 균주를 단백질 정량과 Modified Schales' method를 통해 효소 활성을 측정하여 원균주보다 활성이 높게 나타나는 3균주를 최종적으로 선별하였다(Fig. 2). 선별한 균주는 집락에 붙인 번호대로 균주명을 정하여 각각 *P. favisporus* MKNU223, *P. favisporus* MKNU231 및 *P. favisporus* MKNU242로 명명하였다. 효소의 활성은 원균주보다 높아지긴 했지만 획기적으로 향상된 정도는 아니었다.

csn 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

분리한 모든 균주의 chromosomal DNA와 BOF, BOR primer를 이용하여 PCR 증폭을 해 보았을 때, *B. cereus* 5 균주에서는 약 1.5 kb의 band가 생겼으나 *P. favisporus* KNUC56에서는 band가 증폭되지 않았다. 이것은 *P. favisporus* KNUC56의 *csn* 유전자가 기존에 알려진 것과 염기 서열이 크게 다르기 때문인 것으로 여겨진다. 증폭된 5개의 DNA 단편들의 염기 서열을 결정하였다.

NCBI에서 BLAST 분석 결과 *B. cereus* ATCC14579의 *csn* 염기서열과 93% 이상의 상동성을 보였다. DNA 염기서열 결과를 NCBI translating BLAST와 EXPASY translation program을 이용해 아미노산 서열을 결정하였고 예상되는 아미노산 잔기의 개수는 453개였다. 염기서열 결정된 DNA 단편은 *csn* 유전자 주위에 리보솜 결합 부위와 mRNA상의 종결 구조로 예상되는 부위를 포함하고 있었다(Fig. 3). 이들의 아미노산 서열 상동성을 비교해본 결과 서로 91% 이상

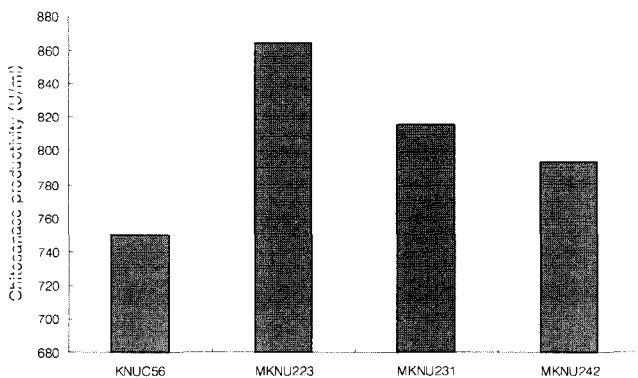


Fig. 2. Comparative graph of chitosanase productivity of mutant strains. KNUC56, control; MKNU223, MKNU231, MKNU242, MNNG-treated mutants.

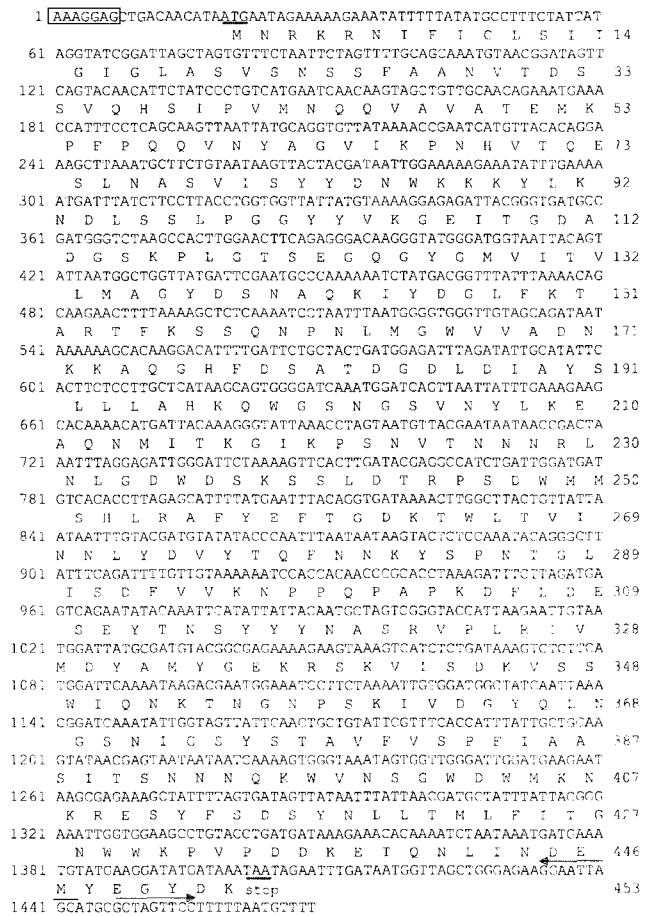


Fig. 3. Nucleotide and amino acid sequences of the *csn* gene of *Bacillus cereus* KNUC55. The ribosome binding site (RBS) is represented as an open box. The putative terminator structure on its mRNA is marked by inverted arrows.

의 상동성을 나타내었으며 *B. cereus* ATCC14579와의 상동성은 93% 이상으로 나타났다(Table 2).

효소 반응 산물로서의 키토산 올리고머 크기 측정

TLC를 이용하여 균주가 분비하는 효소가 trimer 이상 decamer 이하의 키토산 올리고머를 생산하기 위한 적절한 반응 시간을 측정하였다. 효소로는 분리해낸 균주를 키운 상

Table 2. The homology of deduced amino acid sequences of *csn* from isolated *B. cereus* species and the known *B. cereus* ATCC14579.

	Homology (%)				
	KNUC52	KNUC53	KNUC54	KNUC55	ATCC14579
KNUC51	95.4	97.1	96	92.3	96.9
KNUC52	100	96.2	95.6	91.8	96.5
KNUC53	-	100	97.6	92.9	98.5
KNUC54	-	-	100	91.8	97.4
KNUC55	-	-	-	100	93.4

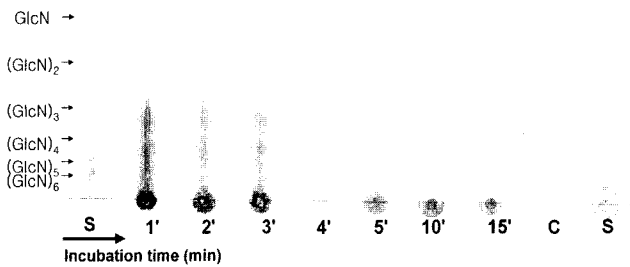


Fig. 4. Thin layer chromatogram of degraded chitosan. S, monomer glucosamine (GlcN) to hexamer (GlcN)₆ as standard; C, control (chitosan polymer with no chitosanase); 1'~15', products with different incubation time.

등액을 사용했으며 대조군으로 효소를 처리하지 않은 키토산 복합체를 사용하였다. 표준 시료로서 monomer, dimer, trimer, tetramer, pentamer와 hexamer가 동량으로 구성된 chitosan oligomer mixture를 사용하였으며, 크기에 따라 아래에서 위로 전개되었다.

OD436에서 0.8이 되도록 키운 균주의 상등액의 단백질 양이 0.0421 mg/ml이었고 그 상등액 30 μ l를 넣어 37°C에서 5분 이하로 처리했을 때, 우리가 원하는 크기인 trimer 이상의 oligomer를 얻을 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 여기서 적은 양으로 실험을 했지만 더 많은 양의 키토산 올리고당을 생산하고자 할 때도 원하는 크기의 산물을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

Chitosanase 분비 세균을 찾아내기 위해 남해안의 서로 다른 다섯 지역의 해안 갯벌과 계를 채취하였다. 시료를 키토산선별 배지에 도말하여 얻은 균주 중에 투명환을 형성하는 6종의 균주를 선택하여 분리하였다. 그들은 FE-SEM을 이용한 형태 관찰과 16S rDNA sequence analysis를 통해 *Bacillus cereus* KNUC51, *B. cereus* KNUC52, *B. cereus* KNUC53, *B. cereus* KNUC54, *B. cereus* KNUC55, *Paenibacillus favisporus* KNUC56 등으로 균주명이 정해졌다. Chitosanase 활성을 측정한 결과 기존에 알려진 *B. subtilis* 168과 유사한 활성을 나타내었다. 효소 활성을 높이기 위해 강력한 돌연변이 유발 물질인 MNNG를 사용하여 돌연변이주를 만든 결과 원균주와 비교해 효소활성이 높은 3개 균주를 선별할 수 있었다. *B. cereus* 5균주의 chitosanase를 지정하며 생산하는 *csn* 유전자를 분리 정제하여 DNA 염기서열을 결정하고 아미노산 서열을 예상하였다. 예상된 아미노산의 잔기는 453 잔기였고 *B. cereus* ATCC14579의 것과 93% 이상의 상동성을 나타내었다. 분리 균주의 배양 상등액을 키토산 중합체와 반응시킨 후 반응물로 박층크로마토그래피를 실시한 결과 5분 이하로 반응을 시켰을 때 효

능이 좋은 3~10개 사이의 잔기를 가진 키토산 올리고당을 만들 수 있다는 것을 볼 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 산학연 공동 기술 개발 컨소시엄 사업단의 연구비로 연구되었음.

REFERENCES

- Bertani, G. 1951. Studies of lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 290-300.
- Boucher, I., A. Duppy, P. Vidal, W. A. Neugebauer, and R. Brzezinski. 1992. Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 188-193.
- Bradford, M. M. 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.
- Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 2110-2114.
- Hirano, S., 1996. Chitin biotechnology applications. *Biotechnol. Annu. Rev.* **2**: 237-257.
- Hirano, S., M. Hayashi, K. Niura, 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, and H. J. Blumenthal. 1957, The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. separation. *J. Am. Chem. Soc.* **79**: 5046-5049.
- Jun-ichi, S., K. Akikio, H. Yoshiki, N. Yoshiho, A. Alilazu, and M. Kuino. 1999. Crystal structure of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1 at 1.6-Å resolution and its substrate recognition mechanism. *J. Biol. Chem.* **274**: 30818-30825.
- Kimball, R. F. and J. K. Setlow. 1974. Mutation fixation in MNNG-treated *Haemophilus influenzae* as determined by transformation. *Mutat. Res.* **22**: 1-14.
- Kimoto, H., H. Kusaoke, I. Yamamoto, Y. Fujii, T. Onodera, and A. Taketo. 2002. Biochemical and genetic properties of *Paenibacillus glycosyl hydrolase* having chitosanase activity and discoidin domain. *J. Biol. Chem.* **277**: 14695-14702.
- Lee, D. M., E. L. Lee, and K. M. Lee. 2000. Isolation and characterization of chitosanase-producing microorganism *Aureobacterium* sp. YL, from crab shells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 208-214.
- Park, J. K., S. Kumiko, O. Nobuhisa, S. Kazutaka, K. Masako, O. Yukari, T. Katsunori, M. Hideyuki, and K. Makoto. 1999. Purification, characterization, and gene analysis of a chitosanase (ChoA) from *Matsuebacter chitosanota*

- bidus* 3001. *J. Bacteriol.* **181**: 6642-6649.
13. Park, R. D., M. R. Jung, Y. Y. Jo, and Y. T. Chi. 1997. Isolation and Characterization of *Bacillus* sp. P16 producing extracellular chitosanase. *Hangug Nonghwahag Hoeji* **40**: 369-374.
 14. Rivas, L. A., V. Parro, M. Moreno-Paz, and R. P. Mellado. 2000. The *Bacillus subtilis* 168 *csn* gene encodes a chitosanase with similar properties to a *Streptomyces* enzyme. *Microbiology* **146**: 2929-2936.
 15. Makoto, S., M. Nogawa, X. Wang, M. Kumehara, and M. Okazaki. 1995. Production of two chitosanase from a chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB101. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 438-442.
 16. Sugano, N., K. Yoshida, M. Hashimoto, K. Enomoto, and S. Hirano. 1992. Hypocholesterolemic activity of partially hydrazinized chitosan pp. 472-478, In C. J. Brine, P. A. Sandford, and J. P. Zikakis(eds), *Advances in Chitin and Chitosan*. Elsevier.
 17. Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki. 1986. Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexose and chitohexose. *Carbohydr. Res.* **151**: 403-408.
 18. Taiji, I. and Y. Kazuyoshi. 1971. A simple activity measurement of lysozyme. *Agr. Biol. Chem.* **35**: 1154-1156.
 19. Usami, Y., S. Minami, Y. Okamoto, A. Matsuhashi, and Y. Shigemasa. 1997. Influence of chain length of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine residues on direct and complement-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells. *Carbohydrate polymers* **35**: 115-122
 20. Yasushi, U., M. Izume, and A. Ohtadakara. 1989. Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus* sp. No. 7-M. *Bull. Fac. Agr.* **66**: 105-116.
 21. Yoon, H. G. and H. Y. Cho. 2000. Genetic and biochemical analysis of a thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. CK4. *Proc. KSAM Spring meeting*, pp. 157-167.
 22. Yoshihara, K., J. Hosokawa, T. Kubo, M. Nishiyama, and Y. Koba. Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. 1992. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 972-973.

(Received Sep. 6, 2003/Accepted Feb. 2, 2004)