

## 키토산분해효소 생산을 위한 *Bacillus* sp. P16 배양조건의 최적화

박노동\* · 정미라 · 조유영 · 지연태<sup>1</sup>

전남대학교 농화학과, <sup>1</sup>유전공학과, 생물공학연구소

**초 록** : 키토산분해효소를 분비하는 세균 *Bacillus* sp. P16의 최적배양조건을 조사하였다. 키토산분해효소 생산을 위한 최적 탄소원은 0.5% 분말 키토산이었으며, 최적 질소원은 1% tryptone이었다. 최적온도는 37°C였으며, 최적 초기 pH는 7.0이었다. 이 조건에서 60~72시간 배양하였을 때 효소 생산이 최고에 도달하였으며, 효소활성은 약 30% 증가하였다. 이를 발효조에서 배양하면 6~12시간 배양으로 최대활성에 도달하였으며, 효소 생산은 약 100% 증가하였다. (1999년 4월 29일 접수, 1999년 6월 17일 수리)

### 서 론

키토산은 지구상에서 섬유소 다음으로 풍부하게 존재하는 천연고분자물질로서 N-acetyl-D-glucosamine(NAG)의  $\beta$ -1,4 결합을 기본 구조로 하는 중합체이며, 키토산은 키토산을 화학적 또는 생물학적 처리로 탈아세틸화시켜서 형성된 글루코사민 중합체이다. 일반적으로 키토산은 100% 탈아세틸화된 것이 아니라 어느 정도 아세틸기가 결합돼 있는 것이 보통이며, 키토산과는 달리 묽은 염산, 유기산 수용액 등에 용해하는 것이 키토산의 한가지 특징이다.<sup>1)</sup>

키토산은 식물세포의 활성화제, 식품보존료, 혈중 콜레스테롤 저하제, 면역보조제, 화장품, 폐수처리제, 퇴비발효촉진제 등으로 이용되고 있는 생물소재이며, 키토산의 분해산물인 키토올리고당은 식품첨가물, 진단시약, 감염억제제, 항암제, 식물생리조절제 등 다양한 분야에서 응용이 기대되는 생물소재이다.<sup>1)</sup> 키토산 올리고당은 일반적으로 Horowitz 등의 방법<sup>2)</sup> 따라 키토산을 진한 염산으로 가수분해하여 얻지만, chitinase나 chitinase를 이용한 효소적 방법으로도 생산할 수 있다. 키토산 올리고당의 효소적 생산을 위해 다양한 chitinase들이 *Acinetobacter* sp.,<sup>3,4)</sup> *Aeromonas hydrophila*,<sup>5)</sup> *Amycolatopsis* sp.,<sup>6)</sup> *Bacillus* sp.,<sup>7-10)</sup> *Enterobacter* sp.,<sup>11)</sup> *Myxobacter* sp.,<sup>12)</sup> *Nocardia orientalis*,<sup>13)</sup> *Streptomyces* sp.,<sup>14-16)</sup> *Pseudomonas* sp.,<sup>17,18)</sup> *Penicillium islandicum*<sup>19)</sup> 등 다양한 미생물에서 연구되었다. Chitinase를 생산하는 대부분의 미생물은 유도물질로서 키토산을 필요로 하지만,<sup>5,6,10)</sup> *Bacillus* sp. HW-002는 키토산을 유도물질로서 요구하지 않았다.<sup>7)</sup> 이들 가운데 *Myxobacter* sp.,<sup>12)</sup> *Streptomyces griseus*<sup>15)</sup> 등이 생산하는 chitinase는 carboxymethylcellulase(CMCase) 활성을 갖는 것으로 알려졌으며, *Aeromonas hydrophila*,<sup>5)</sup> *Bacillus circulans* WL-2,<sup>9)</sup> *Enterobacter* sp. G-1,<sup>11)</sup> *Acinetobacter* sp. CHB 101<sup>3)</sup> 등이 생산하는 chitinase는 키토산도 어느 정도 가수분해하는 것으로 알려졌다.

이러한 연구에도 불구하고 아직까지 저렴한 가격의 상업적 생산이 되지 않아 이들 효소를 이용한 올리고당의 상업적 생산은 경제성 측면에서 한계가 있다. 이에 강력한 키토산분해효소를 생산하는 미생물의 선발과 이 효소의 산업적 대량생산에 관한 관심이 높아지고 있다.

저자들은 전보에서<sup>20)</sup> 키토올리고당 생산에 적합한, 키토산을 endotype으로 가수분해하는 미생물을 토양에서 분리하여 그의 형태적, 생화학적 특성을 보고하였다. 본 연구에서는 이 미생물 *Bacillus* sp. P16로부터 효소 chitinase 생산을 위한 최적 배지 및 배양 조건을 확립하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주

키토산분해효소 생성 균주는 토양으로부터 분리 동정하여 전보에<sup>20)</sup> 보고한 *Bacillus* sp. P16이었다.

#### 배양시간

0.5% 미세 분말 키토산을 함유한 LB배지에 균주 *Bacillus* sp. P16을 접종하여 32°C, 200 rpm 조건하에서 96시간 플라스크에서 배양하면서 세포성장과 효소 활성을 조사하였다.

#### 배양온도

0.5% 미세분말 키토산을 함유한 LB배지에 균주를 접종하여 200 rpm 조건하에서 위의 실험 결과로 결정된 배양시간 동안 20, 24, 28, 32, 37, 40°C에서 배양하였다.

#### 탄소원의 종류

*Bacillus* sp P16을 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl 및 다양한 0.5% 탄소원을 함유한 배지에 접종하여 37°C, 200 rpm, pH 7.0 조건하에서 60시간 배양하여 세포성장, pH 변화, 효소활성을 측정하였다. 탄소원으로는 콜로이드 키토산, 분말 키토산, 불용성 키토산, 팽윤 키토산 (swollen chitin), 글루코사민, 솔비톨, 만니톨, 전분, 라피노스 (raffinose), 포도당, 갈락

찾는말 : 키토산, 키토산분해효소, *Bacillus* sp. P16

\*연락처

토스, xylose를 이용하였다.

**키토산 농도**

1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl과 다양한 농도의 분말 chitosan을 함유한 배지에 균주를 접종하여 37°C, 200 rpm 조건하에서 60시간 동안 배양하였다.

**질소원의 종류**

탄소원의 종류에 대한 실험 결과로 선택된 탄소원을 함유한 배지에 LB배지 대신 다양한 0.5% 질소원을 첨가하여 균주 P16을 접종한 후 37°C, 200 rpm 조건하에서 60시간 배양하여 세포성장, pH, 효소활성을 측정하였다. 질소원으로는 tryptone, yeast extract, peptone, albumin, L-asparagine, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>을 사용하였다.

**질소원의 농도**

0.5% 분말 chitosan, 1% NaCl과 다양한 농도의 tryptone을 함유한 배지에 균주 P16을 접종하여 37°C, 200 rpm 조건하에서 60시간 동안 배양하였다.

**초기 pH**

1% tryptone, 0.5% 분말 chitosan, 1% NaCl을 함유한 배지의 초기 pH를 pH 4에서 pH 9까지 조정하여 균주 P16을 접종하여 37°C, 200 rpm 조건하에서 60시간 동안 배양한 후 세포 성장과 효소활성을 측정하였다.

**최적조건에서의 효소생산**

위의 실험에서 결정된 최적배양조건, 즉 1% tryptone, 0.5% 분말 키토산, 1% NaCl, 초기 pH 7.0, 37°C, 200 rpm 조건하에서 flask culture를 실시하였다. 또 발효조 (한국발효기기 KF-5L, 240 rpm, air flow rate 2 NL/min)를 이용하여 위와 동일한 배지에서 또는 질소원을 2배 증가시킨 조건에서 배양하였다.

**분석방법**

미생물의 생장은 파장 660 nm에서 현탁도를 측정하여 조사하였다. 효소활성은 Dinitrosalicylic acid(DNS) method를 이용하여 효소에 의해 생성된 환원당의 양을 측정하였다.<sup>20-22</sup> 즉, 0.1 ml 조효소와 0.9 ml 1% 가용성 키토산을 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 1 N NaOH로 반응을 정지시킨 후 원심분리(12,000 rpm×5 min)하여 반응액을 얻었다. 반응액 0.5 ml와 DNS 시약 0.5 ml를 혼합하여 물중탕에서 15분간 끓인 다음 흐르는 물에 식혀 파장 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 글루코사민을 표준용액으로 이용하여 작성한 표준곡선을 토대로 생성된 환원당을 정량하였다. 효소 활성 1 unit는 이 분석조건에서 1분당 1 μmole 글루코사민 상당의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

기질인 1% 가용성 키토산 용액은 다음과 같이 조제하였다. 즉, 입경 0.5-1.0 mm의 키토산 2 g을 증류수 40 ml 에 부유시킨 후 1 M 초산 9 ml를 가한 다음 2시간 이상 저어주면서 녹였다. 여기에 1 M 초산나트륨을 가하여 pH를 5.5로 맞춘 후

0.1 M 초산 완충용액(pH 5.5)으로 부피를 200 ml로 맞췄다. DNS 시약은 증류수 1 l에 7.5 g의 디니트로살리실산과 14.0 g의 NaOH를 녹인 다음 216.1 g의 Rochelle염, 5.4 ml의 페놀 및 5.9 g의 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>을 넣고 녹인 다음 Whatman No. 1로 여과하여 조제하였다.<sup>21)</sup>

**결과 및 고찰**

**배양시간**

LB broth에 0.5% 분말 키토산을 함유한 기본배지에 chitosanase 생성균 *Bacillus* sp. P16을 접종하여 32°C에서 96 시간 동안 배양하면서 균의 성장과 효소활성을 측정하였다 (Fig. 1). 균체 성장곡선은 전형적인 diauxy curve에 가까운 것으로, 배양 24 시간에 1차 생장의 정지기에 도달하였고 84 시간에 2차 정지기에 도달하였으며 그 이후 쇠퇴기에 접어드는 것으로 보였다. 한편 키토산분해효소의 활성은 생육초기에 낮은 수준을 유지하다가 50시간 이후 급격히 증가하였으며, 이후 거의 일정하게 1.3 U/ml 수준을 유지하였다. 이는, 성장곡선과 비교해보면, 1차 생육기에는 chitosanase 암호 유전자가

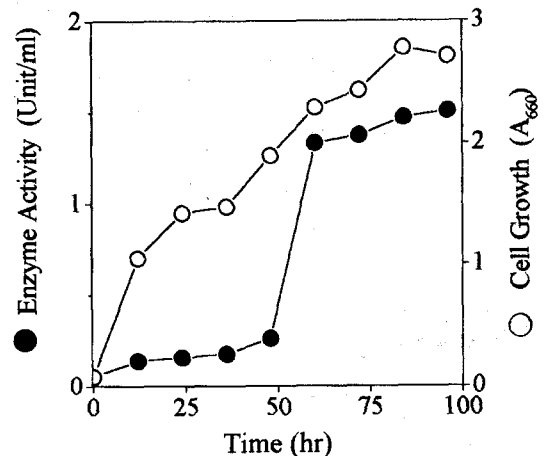


Fig. 1. Time course of chitosanase production by *Bacillus* sp. P16 in LB broth.

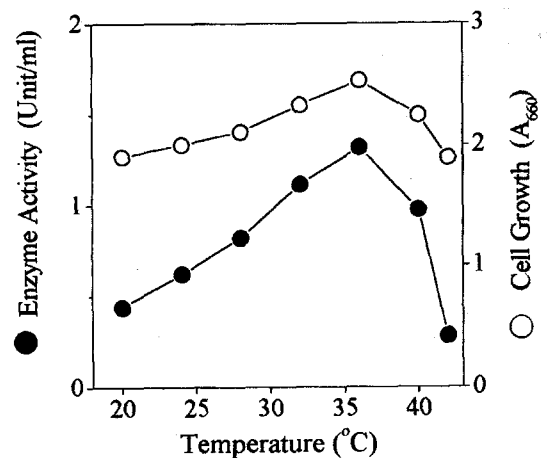


Fig. 2. Effect of temperature on the production of chitosanase by *Bacillus* sp. P16. Medium contains 0.5% powdered chitosan in LB broth.

**Table 1. Effect of carbon sources on the production of chitosanase by *Bacillus* sp. P16**

Carbon source	Cell growth	pH	Enzyme activity (Unit/ml)	Relative activity (%)
Colloidal chitosan	1.99	7.82	0.51	30.5
Powdered chitosan	2.14	8.40	1.67	100
Powdered chitin	1.98	8.22	0.65	38.9
Swollen chitin	1.10	7.61	0.42	25.1
Glucosamine	0.52	4.80	1.12	67.1
Sorbitol	1.77	5.58	0.30	17.9
Mannitol	1.81	4.62	0.37	22.1
Starch	1.80	5.72	0.10	5.9
Raffinose	1.97	5.35	0.60	35.9
Glucose	2.20	6.23	1.40	83.8
Xylose	2.41	6.88	1.58	94.6
Galactose	2.27	6.83	0.93	55.6

The medium contained 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl and 0.5% various carbon sources. The cultivation was done at 37°C for 60 hr.

억제된 상태로 유지되다가 50시간 전후 억제물질이 소진되면서 유도물질에 의하여 chitosanase 유전자가 발현되는 대사산물 억제현상 (catabolite repression)의 결과로 보였다. 이러한 균체 성장 및 효소 생산의 양상은 *Bacillus* sp. HW-002<sup>7)</sup>와 *Pseudomonas* sp.에서<sup>17,18)</sup> 관찰된 양상과 비슷한 것이며, *Bacillus* sp. P16이 생산 분비하는 chitosanase는 일종의 mixed growth-linked metabolite로 보였다.<sup>7)</sup> 이상의 결과를 바탕으로 최적 배양시간을 60시간으로 결정하였다.

**배양 온도**

키토산을 함유한 LB 기본배지에 chitosanase 생성균을 접종하여 20°C, 24°C, 28°C, 32°C, 37°C 그리고 40°C에서 60시간 배양시킨 다음 균의 성장과 효소 활성을 측정하였다. Fig. 2에서 보인 바와 같이 37°C에서 세포성장과 효소활성이 가장 높게 나타났으며, 42°C에서는 균체 생장이 급격히 감소하였다. 따라서 최적 배양온도를 37°C로 결정하였다. 이는 *Acinetobacter* sp.의<sup>1)</sup> 최적온도 30°C, *Pseudomonas* sp.의<sup>20)</sup> 28°C, *Bacillus* sp.의<sup>7)</sup> 32°C, *Streptomyces* sp.의<sup>18)</sup> 28°C 등에 비하여 높은 편이다.

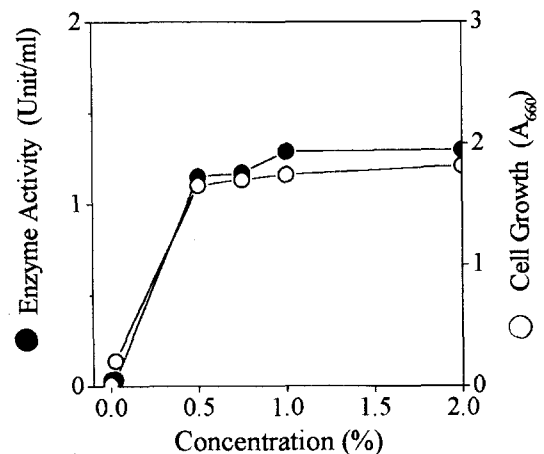
**탄소원의 종류 및 농도**

0.5% 농도의 각종 탄소원을 함유한 LB broth에 P16을 접종하여 37°C에서 60시간 배양하여 균의 성장과 효소의 활성을 측정하였다. Table 1에 보인 바와 같이 분말 키토산이 함유된 배지에서 세포성장이 다른 탄소원들에 비해 다소 높았다. 키토산의 분해산물인 글루코사민이 함유된 배지에서는 균의 성장이 강하게 억제되었으며 효소 활성도 낮았다. 한편, 포도당, 갈락토스, xylose 등이 함유된 배지에서의 균체 생장은 키토산 첨가 배지의 그것과 비슷하였다.

효소 활성은 키토산 함유배지에서 가장 높았으며, 이 효소는 키토산에 의하여 유도되는 유도효소로 일단 간주되었다.<sup>5,6,10)</sup> 전분, 솔비톨, 만니톨, 키틴 등의 탄소원에서는 효소의 생산이 미미하였다. 따라서 분말 키토산을 chitosanase 생산을 위한 최적 탄소원으로 선택하였다. 콜로이드 키토산 배지에서 효소 생산이 미미하게 나타난 것은 흥미롭다.

어떤 균주들은 키토산 이외의 탄소원에서 chitosanase를 생산하는 경우가 있다. *B. thuringiensis* strain GM44는<sup>23)</sup> 가용성 전분을 탄소원으로 사용하였을 때 가장 높은 효소 활성을 보였으며, *Acinetobacter* sp. CHB 101은<sup>3)</sup> 포도당 탄소원 배지에서, *Bacillus* sp. HW-002는<sup>7)</sup> 0.5% 설탕 배지에서 가장 높은 활성을 나타내 이들은 구성효소(constitutive enzyme)로 간주되었다. 한편, *Bacillus* sp. HW-002는<sup>7)</sup> 본 실험의 *Bacillus* sp. P16과 같이 키토산의 분해산물인 글루코사민에 의하여 효소의 생성이 강하게 억제된 반면, *Streptomyces* sp.의<sup>16)</sup> 경우에는 글루코사민에 의하여 효소의 활성이 유도되었다 한다.

탄소원으로 선택된 분말 키토산의 농도와 균체 성장 및 효소 생산과의 관계를 0~2.0% 키토산 농도 범위에서 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 0.5% 이상의 키토산 농도에서 높은 활성이 나타났다. 따라서 0.5% 키토산 농도를 최적 농도로 정하였다. 이는 균주 P16은 chitosanase의 생산 분비를 위한 유도물질로서 일정 농도의 키토산을 요구한다는 것을 시사한다. 다른 미생물들에서도 키토산의 첨가는 chitosanase의 생산을 유도하



**Fig. 3. Effect of chitosan concentration on the production of chitosanase by *Bacillus* sp. P16.** Medium contains 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl and various concentrations of chitosan. The culture was done out at 37°C for 60 hr in a rotary shaker (200 rpm).

**Table 2. Effect of various nitrogen sources on the production of chitosanase by *Bacillus* sp. P16**

Nitrogen source	Cell growth	pH	Enzyme activity (Unit/ml)	Relative activity (%)
Yeast extract	1.84	7.70	0.32	19.5
Tryptone	2.11	8.80	1.64	100
Peptone	2.03	8.74	1.50	91.5
Albumin	2.46	8.29	0.11	6.8
L-Asparagine	1.23	8.91	0.07	4.3
NH <sub>4</sub> Cl	1.20	7.49	0.05	3.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.74	7.37	0.02	1.2
KNO <sub>3</sub>	1.57	6.93	0.22	13.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.20	7.50	0.18	11.0
NaNO <sub>3</sub>	1.06	7.65	0.23	14.0

The medium contained 0.5% powdered chitosan, 1% NaCl, and 0.5% various nitrogen sources. The cultivation was done at 30°C for 60 hr.

는 것으로 알려져 있다.<sup>5,6,10)</sup>

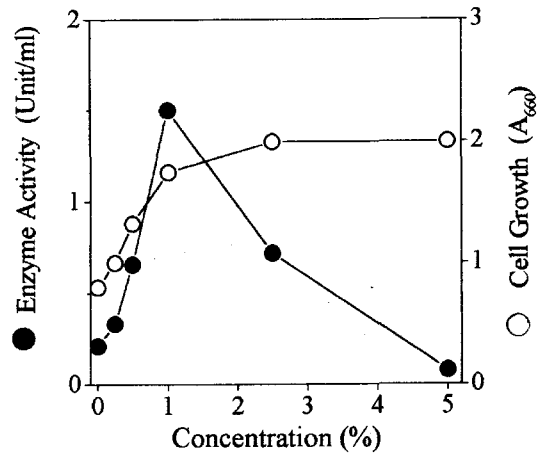
**질소원의 종류 및 농도**

0.5% 분말 키토산을 함유한 배지에 LB배지를 대체하여 0.5% 농도의 다양한 질소원을 첨가하여 37°C에서 60시간 배양한 다음 균의 성장과 효소의 활성을 측정하였다(Table 2). 사용한 질소원 가운데 tryptone과 peptone 배지에서 높은 균체 생산과 효소활성을 보였으며, 이는 *Bacillus* sp. HW-002<sup>7)</sup> 경우와는 상이하였다. HW-002의 경우, yeast extract와 yeast extract-tryptone(1 : 1 w/w)을 함유한 배지에서 가장 높은 활성을 보인 반면 peptone만을 첨가한 배지에서는 낮은 활성을 나타냈다.

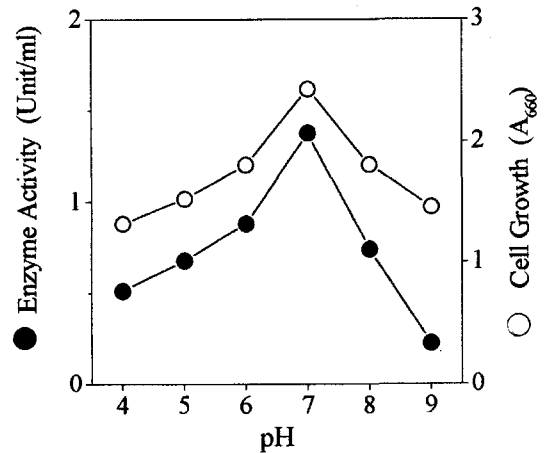
LB배지의 기본조성의 일부인 yeast extract에는 각종 미네랄과 비타민 등이 함유되어 있어 미생물의 성장을 향상시키는 배지로 흔히 사용되고 있지만, 균주 마다 그 영향은 다르다. 본 실험에서 0.5% yeast extract의 첨가는 효소의 생산을 급격히 감소시켰다. 이는 0.4% yeast extract의 첨가시에 *Bacillus licheniformis* NS70의 alkaline protease의 생산이 강하게 저해받았다는<sup>24)</sup> 보고와 유사한 것이다. 앞에서 언급한 대사산물 억제에 관계된 chitosanase 생합성 억제물질이 yeast extract에 함유되어 있을 가능성이 예상된다.

한편, 무기질소원을 첨가한 경우에는 현저히 낮은 효소활성을 보였다. 이는 *Pseudomonas* sp.의 배양배지에 2% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 첨가한 경우 chitosanase의 생산이 거의 정지하였다는 보고와<sup>18)</sup> 유사한 결과이다.

이에 최적 질소원의 농도를 결정하고자, tryptone의 농도를 0-5.0%의 수준으로 첨가하여 37°C에서 60시간 배양한 다음 균의 성장과 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 4). 균체의 생산은 tryptone 1.0% 이상에서 활발하였으나, 효소의 활성은 1% 농도에서 가장 높았으며 2.5-5.0%에서는 효소 활성이 현저히 저하되었다. 이는 *Pseudomonas* sp.의 배양배지에 3~10%의 polypeptone이나 yeast extract를 첨가한 경우, chitosanase의 생산이 오히려 억제되었다는 결과와 유사한 것이다.<sup>18)</sup> 이상의 실험으로 LB배지를 대체하여 탄소원으로 0.5% 키토산을, 질소원으로 1.0% tryptone을 함유한 배지를 선택하여 1.6 U/ml 수



**Fig. 4. Effect of tryptone concentration on the production of chitosanase by *Bacillus* sp. P16.** Medium contains 0.5% powdered chitosan, 1% NaCl and various concentrations of tryptone. The culture was done at 37°C for 60 hr in a rotary shaker (200 rpm).



**Fig. 5. Effect of initial pH of culture medium on the production of chitosanase by *Bacillus* sp. P16.** Medium contains 1% tryptone, 0.5% chitosan and 1% NaCl. The culture was carried out at 30°C for 60 hr in a rotary shaker (200 rpm).

준으로 chitosanase를 생산할 수 있었다.

**초기 pH의 영향**

배지의 초기 pH를 4.0~9.0까지 조절하여 37°C에서 60시간 배양하여 효소의 생산을 조사한 결과는 Fig. 5와 같았다. 균체의 성장과 효소의 활성은 초기 pH 7에서 가장 높았으며 알칼리 pH에서 효소 활성의 감소가 뚜렷하였다. 키토산분해효소 생산 균주들의 최적 초기 pH를 비교해 보면, *B. thuringiensis* strain GM44의<sup>23)</sup> 6.0, *Bacillus* sp. HW-002의<sup>7)</sup> 6.5 등으로 약산성이다.

한편, 배양 경과에 따른 배지 pH 변화는 탄소원과 질소원에 따라 다르게 나타났다. 탄소원의 경우, 키토산과 키틴 첨가시에는 pH가 증가하였으나 나머지 탄소원의 첨가시에는 감소하거나 변화가 미미하였다 (Table 1). 한편, 질소원의 첨가시에는 pH가 증가하였다 (Table 2).

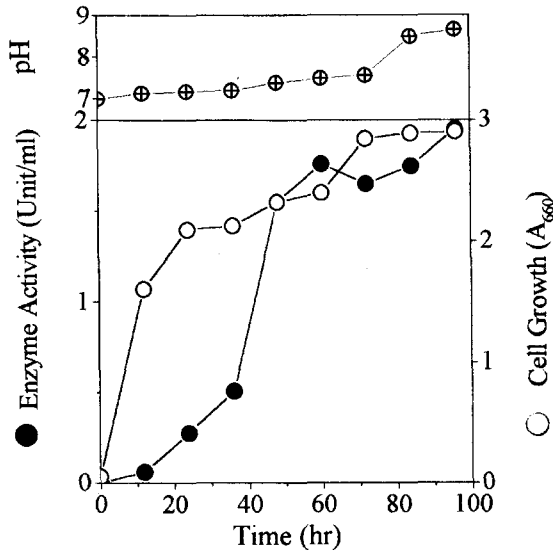


Fig. 6. Time course of chitosanase production in the optimized condition by *Bacillus* sp. P16. The medium contains 1% NaCl, 1% tryptone, and 0.5% chitosan(pH 7.0). The culture was done at 37°C in a rotary shaker(200 rpm).

최적 조건에서 chitosanase 생산

이상의 결과들로부터 chitosanase 생산을 위한 *Bacillus* sp. P16의 최적 배양조건으로, 탄소원은 0.5% 분말 키토산, 질소원은 1% tryptone 그리고 1% NaCl을 함유한 pH 7인 배지를 기본배지로 하여 배양온도는 37°C, 배양시간은 60시간으로 결정하였다

최적 배양조건에서 *Bacillus* sp. P16을 접종하여 96시간 동안 배양한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 균체는 24시간까지 급속히 성장하다가 이후 거의 일정하게 유지되는 반면 효소 생산은 급속한 균체의 성장에 따라 12시간 이후부터 대수적으로 증가하였으며, 72시간 후에 효소의 농도는 최고수준에 (1.7 U/

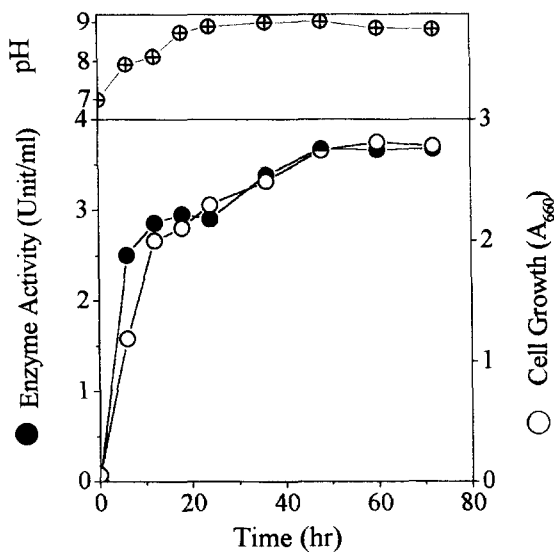


Fig. 7. Profiles of cell growth and chitosanase production by *Bacillus* sp. P16 in a jar fermenter.

ml) 도달하였다. 최적배양조건에서의 pH 변화는 Fig. 6에 나타난대로 배양시간에 따라 증가하였다. 이와 같은 최적화를 통하여, Fig. 1과 비교하건대, 배양시간을 12시간 앞당길 수 있었으며, 효소의 생산은 30% 증가시킬 수 있었다.

이 최적배지에다 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03% CaCl<sub>2</sub>, 0.03% MgSO<sub>4</sub> 등의 혼합 무기원소를 첨가한 경우에 효소 생산에 별 영향을 미치지 않았으며, 효소의 체외 분비에 영향을 미칠 수 있는 Tween 80을 첨가한 경우에는 오히려 효소 생산이 억제되었다(미제시 자료).

Fig. 7은 발효조에서의 균체 생산과 효소생산의 패턴을 나타낸 것이다. 삼각플라스크 배양(Fig. 4)과 비교할 때, 발효조 배양은 3가지 점에서 판이한 양상을 보였다. 즉, 배양시간이 48시간에서 6시간으로 대폭 단축되었으며, pH 증가가 급격하였다. 그리고, 균체의 생산은 삼각플라스크 배양과 별 차이를 나타내지 않았으나, 효소 생산은 약 100% 증가하였다.

종합하건대, 키토산분해효소 생산을 위한 최적 탄소원은 0.5% 분말 키토산이었으며, 최적 질소원은 1% tryptone이었다. 최적온도는 37°C였으며, 최적 초기 pH는 7.0이었다. 이 조건에서 60~72시간 배양하였을 때 효소 생산이 최고에 도달하였다. 이를 발효조에서 배양하면 6~12시간 배양으로 최대활성에 도달하였으며, 효소활성은 약 100% 증가시킬 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 교육부 1996년도 학술연구조성비(유전공학)의 지원을 받아 수행한 내용의 일부이며, 연구비의 지원에 감사를 표합니다.

참고문헌

1. Japanese Society for Chitin and Chitosan (1990) In "Application of Chitin and Chitosan", Chap. 4-9, Kibodang Publisher, Tokyo, Japan.
2. Horowitz, S. T., Roseman, S., and Blumental, H. T. (1957) The preparation of glucosamine oligosaccharides. I. Separation. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5046-5049.
3. Shimosaka, M., Nogawa, M., Wang, X. Y., Jumehara, M. and Okazaki, M. (1995) Production of two chitosanases from chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB 101. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 438-442.
4. Shin W. C., Lee, D. S., Kim, T. H., Woo, J. H., Lee, J. M., Kim, J. G. and Hong, S. D. (1995) Isolation and characterization of *Acinetobacter* sp. WC-17 producing chitinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**(2), 80-86.
5. Misutomi, M., Ohtakara, A., Fukamizo, T., and Goto, S., (1990) Action of *Aeromonas hydrophila* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 871-877.
6. Shoji, O., Ando, A., Shinoyama, H. and Fujii, T. (1994) Purification and characterization of an extracellular chitosanase produced by *Amycolatopsis* sp. CsO-2. *J. Ferment. Bioengin.* **77**(6), 617-620.

7. Lee, H. W., Choi, J. W., Han, D. P., Lee, N. W., Park, S. L. and Yi, D. H. (1996) Identification and production of constitutive chitosanase from *Bacillus* sp. HW-002. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**(1), 12-18.
8. Masato, I., Nagae, S., Kawagishi, H., Mitsuromi, M. and Ohtakara, A. (1992) Action pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(3), 448-453.
9. Mitsutomi, M., Kidoh, H., Tomita, H. and Watanabe, T. (1995) The action of *Bacillus circulans* WL-12 chitinases on partially N-acetylated chitosan. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 529-531.
10. Pelletier, A. and Sygush, J. (1990) Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* P1. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 844-848.
11. Yamasaki, Y., Hayashi, I., Ohta, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H. (1993) Purification and mode of action of chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 444-449.
12. Allan, H. and Wolfe, R. S. (1974) Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both  $\beta$ -glucanase and chitosanase activities. *J. Bacteriol.* **120**, 844-853.
13. Sakai, K., Katsumi, R., Isobe, A. and Nanjo, F. (1991) Purification and hydrolytic action of a chitosanase from *Nocardia orientalis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**, 65-72.
14. Isabelle, B., Dupuy, A., Vidal, P., Meugebauer, W. A. and Brzezinski, R. (1992) Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 188-193.
15. Ohtakara, A., Matsunaga, H. and Mitsutomi, M. (1990) Action pattern of *Streptomyces griseus* chitinase on partially N-acetylated chitosan. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3191-3199.
16. Price, J. S. and Storck, R. (1975) Production, purification, and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **124**, 1574-1585.
17. Kazutoshi, Y., Hosokawa, J., Kubo, T., Nishiyama, M. and Koba, Y. (1992) Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(6), 972-973.
18. Yoshihara, K., Hosokawa, J., Kubo, T. and Nishiyama, M. (1990) Isolation and identification of a chitosan degrading bacterium belonging to the genus *Pseudomonas* and the chitosanase production by the isolate. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3341-3343.
19. Fenton, D. M. and Evleigh, E. D. (1981) Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium islandicum*. *J. Gen. Microbiol.* **126**, 151-165.
20. Park, R. D., Jung, M. R., Jo, Y. Y. and Chi, Y. T. (1997) Isolation and characterization of *Bacillus* sp. P16 producing extracellular chitosanase. *Agric. Chem. Biotechnol.* **40**(5), 369-374.
21. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. (1986) In *Carbohydrate Analysis*, Chaplin, M. F. Ed. Chap. 1, IRL Press., Oxford, UK.
22. Uchida, Y. and Ohrakara, A. (1988) In *Meth. in Enzymol.* 161, pp 501-505. Academic Press, Inc., NY, USA.
23. Choi, Y. J., Kim, E. J., Kim, Y. S. and Shin, Y. C. (1997) Development of chitosanase for the production of chitooligosaccharides. *Kor. J. Chitin Chitosan* **2**(3), 40-48.
24. Koo, J. H., Choi, I. J., Nam, H. S., Lee, H. J., Shin, Z. I. and Oh, T. K. (1997) Medium optimization for production of thermostable alkaline proteases from *Bacillus licheniformis* NS70. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**(2), 207-211.

---

#### Optimization of Culture Conditions of Chitosanase-producing *Bacillus* sp. P16

Ro-Dong Park\*, Mira Jung, Yu-Young Jo and Youn-Tae Chi<sup>1</sup>(Department of Agricultural Chemistry, <sup>1</sup>Department of Genetic Engineering, and Institute of Biotechnology, Chonnam National University, Kwangju, 500-757, Korea)

**Abstracts** : The optimal culture condition of *Bacillus* sp. P16 was investigated for production of an extracellular endo-splitting chitosanase. The best carbon and nitrogen sources for the chitosanase production were chitosan and tryptone, respectively. The best condition for the maximum activity was at 37°C in a medium containing 0.5% powdered chitosan, 1% tryptone, and 1% NaCl(at initial pH 7.0) in a rotary shaker(200 rpm). In a jar fermenter, the culture duration shortened to 6~12 hr for maximum activity and the enzyme activity increased about 100% compared with that of flask culture.

---

**Key words** : chitosanase, chitosan, optimization of enzyme production, *Bacillus* sp. P16

\*Corresponding author