

Chitosanase from *Bacillus subtilis* Strains : Purification, Characterization, Cloning and Expression of the Gene

오철홍 · 전유진 · 이제희
제주대학교 해양생물공학과

서론

키토산은 D-glucosamine이 β -1,4 결합으로 연결된 고분자 다당류로 chitosanase에 의해 분해되어진다(No & Meyers, 1995). 키토산이나 그 분해산물인 올리고당은 항암, 항균 및 인체면역강화등의 기능이 밝혀지면서 기능성 식품, 의약품등에 이용할 수 있다(Dunn *et al.*, 1992).

키토산은 체내에서 생리활성 기능이 뛰어난 것으로 알려져 있지만 중성이나 알카리의 물에서 녹지 않는 고분자물질이기 때문에 복용시 체내로 흡수되지 못한다. 이로 인해 수용성인 키토산 올리고당의 제조가 필요하게 되었다.

본 연구는 갑각류를 주식으로 하는 쏨뱅이의 내장으로부터 chitosan을 분해하는 균주를 분리·동정하였고, 이 균주로부터 생산되는 chitosanase의 특성을 분석하고 유전자서열을 밝혀 *E. coli*내에서 과발현을 유도하였다.

재료 및 방법

갑각류를 주식으로 하는 쏨뱅이의 내장으로부터 chitosan을 단일 탄소원으로 하는 기본배지를 이용하여 chitosanase 분비 미생물들을 분리하였다. 최적탄소원과 최적 질소원을 확인하기 위해 단일 탄소원들과 단일 질소원들을 각각 0.5%, 0.3%가 되도록 기본배지에 첨가하여 활성을 확인하였다. 이 균주를 30℃ 배양하여 균주로부터 단백질을 침전시켜 gel permeation chromatography를 실시하여 SDS-PAGE를 통해 chitosanase 단백질을 선별하였다. 또한, 분리된 chitosanase의 열안정성도 확인하였다. 분리된 chitosanase를 PVDF membran으로 transfer하여 N-말단 아미노산 서열분석을 수행하고, 이 아미노산 서열을 기초로하여 chitosanase 단백질 암호화 서열 증폭을 위한 primer를 제작하였고 LA PCR 방법을 이용하여 완전한 chitosanase의 염기서열을 분석하였다. 이 서열은 pET11a vector에 삽입하여 재조합 chitosanase 발현 벡터를 제작하고 *E. coli* BL21 내에서 과발현을 유도하였으며 발현된 단백질은 SDS-PAGE로 확인하였다.

결과 및 요약

갑각류를 주식으로 하는 썩뱅이의 내장으로부터 chitosanase를 분리하는 2개의 활성이 뛰어난 균주를 분리하였으며 형태학적 생화학적 유전학적 방법에 의해 각각을 동정하였다. SEM 촬영결과 균주들의 size는 둘 다 1.5~2.5 μ m 였으며, 두 균주의 16S rRNA 서열들은 *B. subtilis*의 표준균주와 99%이상 일치함을 보였다. 이들의 결과를 바탕으로 두 균주를 *B. subtilis*와 같은 종일것으로 판단하여 *Bacillus subtilis* CH1과 *Bacillus subtilis* CH2로 명명하였다. 탄소원에 의한 chitosanase 생산성을 확인한 결과 *B. subtilis* CH1에서는 Starch, *B. subtilis* CH2에서는 fructose에서 가장 높은 활성을 보였다. 최적 탄소원을 가지고 농도에 따른 test를 한 결과 *B. subtilis* CH1에서는 Starch를 2%로 사용했을때, *B. subtilis* CH2에서는 fructose를 4%로 사용했을때 가장 높은 활성을 보였다. 질소원에 따른 chitosanase 생산성을 확인한 결과 두 균주 모두에서 yeast extract에서 가장 높은 활성을 보였다. 최적 질소원을 가지고 농도에 따른 test를 한 결과 *B. subtilis* CH1에서는 1.0%로 사용했을때, *B. subtilis* CH2에서는 1.4%로 사용했을때 가장 높은 활성을 보였다.

두 균주로부터 정제된 chitosanase는 SDS-PAGE를 통해 확인 결과, 두 chitosanase 모두 31 kDa으로 확인되었다. 정제된 chitosanase의 최적 반응온도는 두 균주 모두 60 $^{\circ}$ C로 나타냈으며, 열안정성 시험에서도 모두 40 $^{\circ}$ C에서 지속적으로 안정화하며, 50 $^{\circ}$ C 이후 시간 경과에 따라 빠르게 감소하였다. N-terminal 아미노산 서열 분석시 두 균주가 동일하게 AGLNKDQKRRAEQL로 일치하였으며, LA PCR을 통한 염기서열 확인시 *B. subtilis* CH1의 chitosanase coding 유전자 서열은 834 bp (277 amino acid), mature sequence는 729 bp (242 amino acid)였고, *B. subtilis* CH2의 chitosanase coding 유전자 서열은 816 bp (272 amino acid), mature sequence는 729 bp (242 amino acid)로 나타났다. 또한, 이들 서열을 *E. coli*에서 IPTG를 가지고 과발현을 유도시켰을 ml당 최고 활성이 *B. subtilis* CH1에서는 16unit, *B. subtilis* CH2에서는 21unit까지 나타났다.

참고문헌

- No H. K. and Meyers S. P., Preparation and Characterization of chitin and chitosan-A Review. *J. aquat. food prod. technol.*, 4(2), 27-52 (1995).
Li, Q., Dunn, E. T., Grandmason, E. W., and Goosen, M. F. A., Applications and properties of chitosan, *J. Bioactive and Compatible Polymers.*, 7, 370-397 (1992).