

Bacillus amyloliquefaciens MJ-1 유래의 chitosanase 유전자의 클로닝 및 특성

박찬수^{1*} · 오해근^{1*} · 홍순광² · 박병철³ · 현영^{1**} · 강대경^{**}

단국대학교 생명산업과학부 동물자원학전공, ¹(주)이지바이오시스템 생물자원연구소,
²영지대학교 생명정보과학부, ³뉴트리바이오

본 연구는 다양한 생리활성을 가지고 있는 chitosan oligosaccharides를 효소적 방법으로 생산하기 위한 기초 연구로서, 전통발효식품인 메주에서 chitosan 분해능이 우수한 균주를 분리하였다. 분리한 균주를 형태학적, 생화학적 및 분자생물학적 방법을 이용하여 동정한 결과, *Bacillus amyloliquefaciens* MJ-1으로 명명하였다. *B. amyloliquefaciens* MJ-1으로부터 chitosanase 유전자를 포함하는 1,049 bp DNA 단편을 클로닝하였으며, chitosanase 유전자는 825 염기로서 274 개의 아미노산으로 구성되어 있었고, 예상 분자량은 30.9 kDa이었다. 클로닝한 chitosanase의 homology search 결과, glucoside hydrolase family 46에 속하는 chitosanase로 추정되었다. *B. amyloliquefaciens* MJ-1 chitosanase 유전자를 *E. coli* BLR (DE3)에 도입하였으며, 1 mM의 IPTG로 chitosanase 과잉 발현을 유도하고 정제한 후, pH 및 온도에 대한 특성을 조사하였다. 효소 활성의 최적 온도는 60°C이었으며, 80°C에서도 75%의 활성을 나타내었으므로 내열성을 가진 효소로 추정되었다. 한편, 최적 pH는 5.0이었으며, pH 5-7 사이에서 80% 이상의 높은 활성을 유지하였다.

Key words □ *Bacillus amyloliquefaciens* MJ-1, chitosanase, gene expression

Chitosan은 곰팡이, 곤충 및 계 등 하등생물 껍질을 구성하는 chitin의 탈아세틸화 산물이며, chitosan이 분해되어 생성되는 chitosan oligosaccharides는 체내 면역증강, 항균효과, 항암효과, 혈중 콜레스테롤 강하, 식물 생리조절제 등의 다양한 생리활성을 가지고 있기 때문에 의약품, 기능성 식품, 화장품 등 다양한 용도로 사용되고 있다(4, 7, 12, 20, 21). Chitosan oligosaccharides의 제조를 위해서는 chitosan을 산-알칼리로 분해하는 화학적 방법 또는 chitosanase를 이용하는 효소적 방법이 일반적으로 사용된다. 화학적 분해법은 제조과정 중에 발생하는 다량의 폐수로 인한 환경 오염을 유발시키기 때문에, chitosanase를 분비하는 미생물을 직접 이용한 발효법 또는 미생물로부터 정제한 chitosanase를 이용한 효소적 방법이 더 바람직한 방법으로 인식되고 있다(5, 14). 지금까지 미생물로부터 유래한 여러 종류의 chitosanase가 분리되었고(3, 8, 10, 15, 22, 24, 25), 유전자들이 클로닝되었는데(6, 9, 16, 26), 이 효소들은 대부분 chitosan을 기질로 하여 chitosan oligosaccharides를 생산하였다. 이미 알려진 chitosanase들의 분자량은 10~50 kDa으로서 크기가 다양했으며, 일반적으로 최적 pH는 4.0~8.0, 최적온도는 30~60°C로 보고되고 있다(8, 10, 12, 22, 25).

본 연구는 chitosan oligosaccharides 생산에 적합한 chitosanase를 개발하기 위한 기초연구로서, 전통발효식품인 메주로부터 chitosan 분해 미생물 *Bacillus* sp. MJ-1을 분리하였고, chitosanase 유전자를 클로닝하여 유전자의 특성을 분석하였다. 또한, 클로닝한 chitosanase 유전자를 대장균에서 과발현시킨 후에 분리, 정제하여 온도 및 pH 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Chitosan 분해균주의 분리

Chitosan 분해능을 가진 미생물을 분리하기 위해서 토양, 곡물, 계껍질, 청국장, 메주 등 다양한 자원으로부터 시료를 채취하였다. 시료를 생리식염수에 현탁, 희석시켰으며, 그 상등액을 0.5% colloidal chitosan이 함유된 평판배지(0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.03% KH₂PO₄, 0.07% K₂HPO₄, 0.001% FeSO₄, 0.0001% ZnSO₄, 0.0001% MnCl₂, 1.5% agar, pH 7.0)에 도말한 후에 30°C와 37°C에서 각각 배양하였다. 배양 3-5일 후에 투명환을 형성하는 콜로니를 chitosan 분해능이 있는 균주로 추정, 선발한 후에 균주동정을 실시하였다.

Colloidal chitosan의 제조

Colloidal chitosan은 Yabuki 등(24)의 방법을 변형하여 다음과 같은 방법으로 제조하였다. Chitosan (Sigma, USA) 20 g에 2리터의 2% acetic acid를 첨가하여 6시간 이상 충분히 chitosan을 녹인

*These authors contributed equally to this work

**To whom correspondence should be addressed.

Dae-Kyung Kang (Tel: 041-550-3655, Fax: 041-550-3604, E-mail: dkkang@dankook.ac.kr)

Young Hyun (Tel: 041-585-2881, Fax: 041-585-2887, E-mail: yhyun@edodram.net)

후, 증류수 8리터를 첨가하고 여과하여 불용성 물질들을 제거하였다. 5 N NaOH를 이용하여 pH 5.0까지 천천히 적정한 후, pH 9.0까지는 0.1 N NaOH를 이용하여 미세 적정함으로써 colloidal chitosan을 형성시켰다. 콜로이드 형태로 만들기 위해 사용된 염을 제거하기 위해 증류수로 수세와 여과를 수차례 반복하였다. 제조된 colloidal chitosan은 수분측정기(KETT Electric Lab., Japan)를 이용해서 수분 함량을 측정한 후에 사용하였다.

분리한 균주의 동정

분리한 균주를 동정하기 위하여 16S rDNA 분석과 형태학적, 생화학적 특성 등의 조사를 수행하였다. 분리균주의 16S rDNA를 분석하기 위해 Pavlova 등(17)의 방법을 이용하였다. Genomic DNA extraction kit (Qiagen)을 이용하여 분리균주로부터 genomic DNA를 추출한 다음, Table 1의 primer를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 50 pmole primer, 50 ng template DNA, 10× Taq DNA polymerase buffer 5 µl, 2.5 mM dNTP mixture 4 µl, Taq DNA polymerase (TaKaRa-Korea, Korea) 1 U가 포함된 PCR mixture를 95°C에서 5분간 변성시킨 후에 95°C에서 1분, 55~60°C에서 1분, 72°C에서 1분간 30 cycle을 반복함으로써 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 pSTBlue-1 (Novagen, USA)로 클로닝한 다음, BigDye™-terminator sequencing kit과 ABI PRISM377 sequencer (Perkin-Elmer, USA)로 염기서열을 분석하였다.

분리한 균주의 형태학적인 특성은 전자현미경(Scanning Electron Microscopy)으로 관찰하였으며, Sohn 등(19)의 방법에 준하였다. 또한, API 50CHB kit (bioMerieux Co, France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하여 간이 동정하였다.

Chitosanase 유전자의 클로닝

분리한 균주로부터 genomic DNA를 분리한 후, 기 보고된 chitosanase 효소들 사이에 존재하는 conserved region을 참고하여 primer를 제작(CSB-1 : 5'-CTT RTT TTC ACC ATG TTT TT-3', CSB-2 : 5'-ACR TGA AIC GGY CCG TTT A-3')하였으며, 상기의 방법에 준하여 PCR을 수행하였다. 얻어진 PCR 산물은 1% agarose gel (TAE buffer)를 사용하여 100V에서 40분 동안 전기영동을 수행하여 분리하였으며, QIA quick® gel extraction kit (QIAGEN)을 사용하여 agarose gel로부터 DNA 단편을 추출

하였다. 추출한 DNA 단편을 pGEM-T easy vector에 클로닝한 후, DNA 염기서열 분석을 진행하였다. Chitosanase 유전자의 full sequence를 얻기 위해서는 DNA walking speedup premix kit (Seegene, Korea)을 이용하였다. DNA walking kit을 이용하여 상기의 chitosanase 유전자의 부분염기서열의 5' 및 3' 방향의 유전자를 증폭한 다음 pGEM-T vector에 각각 클로닝하였다. 각 클론의 DNA 염기서열을 분석하여 최종적으로 chitosanase 유전자의 full sequence를 확보하였으며, 염기서열은 GenBank에 등록하였다(GenBank accession number DQ683023).

유전자 분석

염기서열 분석 및 분석된 염기서열을 기초로 코딩된 단백질의 아미노산 서열을 추론하였으며, GenBank database (National Center for Biotechnology Information, USA)의 BLAST algorithm을 이용하여 염기서열 및 아미노산 서열의 상동성을 조사하였다. 아미노산의 multiple sequence alignment는 Clustal W 프로그램을 사용하여 실시하였다.

Recombinant chitosanase의 발현 및 정제

클로닝한 chitosanase 유전자를 *E. coli*에서 과발현시키기 위하여 N-말단부분에 His-tag이 연결되어 있는 pET21b 발현벡터를 이용하였다. Forward (ME-1 : 5'-AAA GGA TCC GAT GAA GGC AAA AGT AGA TTC-3') 및 reverse (ME-2 : 5'-AAA ACT CGA GCT TGA TTA CGA AAT CAC-3') primer를 이용하여 PCR을 수행하였으며, PCR 단편 및 pET21b 벡터를 제한 효소(*Bam*HI / *Xho*I)로 절단한 후 발현벡터에 클로닝하였다. 다음으로 *E. coli* BLR (DE3)에 도입한 후, 형질전환된 균주를 선 발하였다. 형질전환된 균주를 ampicillin 50 µg/ml 가 함유된 Luria-Bertani (LB) 배지에 O.D.(600 nm) 0.5일 때까지 배양한 후, IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside)를 1 mM이 되도록 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 37°C에서 5시간 더 배양한 후에 세포를 수확하였다. 과발현된 재조합 단백질을 얻기 위하여, cell pellet을 lysis buffer (50 mM Na-Pi (pH 7.0), 300 mM NaCl, 1 mM DTT)로 현탁한 후 lysozyme (1 mg/ml)을 첨가하였다. Sonicator (Sonics & Materials, Inc)로 세포를 파쇄한 다음, 14,000rpm에서 30분 동안 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 상등액을 Ni²⁺-NTA affinity column (Qiagen)에 loading하고 50 mM imidazole buffer로 세척한 후 250 mM imidazole buffer로 용출하였으며, 10% SDS-PAGE를 통하여 재조합 단백질의 발현 및 정제를 확인하였다(11).

재조합 chitosanase의 활성 측정

상기 제조한 colloidal chitosan을 기질로 하여 재조합 chitosanase 효소의 chitosan 분해능을 측정하였다. 1% colloidal chitosan 용액 250 µl, 1 M potassium phosphate 완충용액(pH 6.5) 50 µl, 정제된 효소액 및 정제수로 구성된 최종 1 ml의 반응액을 37°C에서 배양하였다. 30분 동안 반응시킨 후, 100°C에서 10분간 가열함으로써 반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 반응액을 원심분리

Table 1. Oligonucleotide primers for amplification of 16S rDNA

Primer ¹⁾	Sequence (5'-3')	Target site ²⁾
F1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	27
F2	GTGCCAGCAGCCGCGG	530
F3	AAACTCAAAGGAATTGACGG	926
R1	TCTACGCATTCACCGCTAC	685
R2	GGGTTGCGCTCGTTG	1,100
R3	AAGGAGGTGATCCAGCC	1,525

¹⁾F1, F2 and F3: forward primers; R1, R2 and R3: reverse primers.

²⁾According to the numbering of the *Escherichia coli* 16S rDNA.

(13,000 rpm, 10분)하였으며, 상등액에 존재하는 환원당을 DNS (dinitrosalicylic acid)법(13)으로 정량하여 효소 활성을 측정하였다. Chitosanase 활성단위(unit)는 상기 서술한 조건에서 분당 1 μmole의 환원당(D-glucosamine)을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

재조합 chitosanase의 최적 온도 및 pH

효소 반응의 최적 온도를 조사하기 위해, 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)에서 1% colloidal chitosan 용액을 기질로 사용하여 20°C에서 80°C까지 10°C 구간별로 반응시킨 후, 상기 서술한 효소활성 측정법으로 효소 활성을 비교하였다. 효소의 최적 pH를 조사하기 위해서는, 정제된 효소액을 아래의 각 pH 별 완충용액에 넣고 반응시킨 후, 활성을 비교하였다. 사용한 완충용액으로서, pH 2.0-4.0 사이는 50 mM glycine-HCl buffer, pH 5.0-6.0 사이는 50 mM sodium acetate buffer, pH 7.0-8.0 사이는 50 mM potassium phosphate buffer, pH 9.0-10.0 사이는 50 mM Tris-HCl buffer, pH 11.0-12.0 사이는 50 mM glycine-NaOH buffer를 각각 사용하였다.

재조합 chitosanase의 온도 및 pH 안정성

효소의 온도 안정성을 검토하기 위해, 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 효소액을 첨가하여 20°C에서 80°C까지의 각 온도에서 30분간 처리한 후, 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서는, pH 2.0에서 pH 12.0까지의 각 완충액에 정제된 효소액을 첨가하여 4°C에서 24시간동안 보관한 후, 잔존 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Chitosan 분해균주의 분리 및 동정

전통 발효식품인 메주로부터 chitosan 분해능이 우수한 미생물인 MJ-1 균주를 분리하였다. 전자현미경(XL30-CP, Philips)으로 관찰한 결과 (Fig. 1), Gram 양성의 간균이었으며 포자를 형성하였다. 또한, 호기성이고 catalase test에서는 양성으로 나타나 *Bacillus* 속의 세균으로 추정할 수 있었다. 분리한 MJ-1 균주를 보다 정확하게 동정하기 위하여 API 50CHB kit (bioMerieux Co, France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사한 결과, 98.9%의 확률로 *Bacillus amyloliquefaciens*와 일치하였다 (Table 2). 또한, 16S rDNA 서열을 분석한 결과에서도 *Bacillus amyloliquefaciens*와 99% 일치하였으므로 (data not shown), 본 균주를 *B. amyloliquefaciens* MJ-1으로 명명하였다.

***B. amyloliquefaciens* MJ-1 균주로부터 chitosanase 유전자의 클로닝**

Chitosanase 유전자 염기서열의 상동성 비교를 통해 얻어진 conserved region primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 636 bp 크기의 키토산 분해효소의 부분 염기서열을 얻을 수 있었다 (data not shown). PCR에 의해 얻어진 부분 염기서열을 토대로,

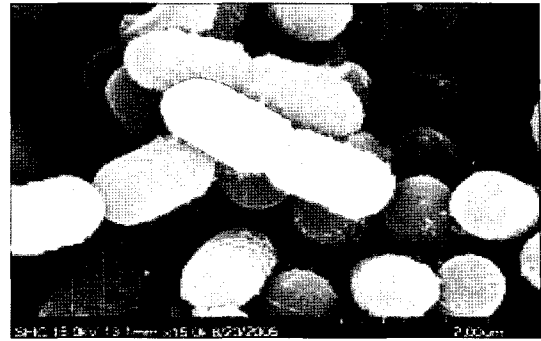


Fig. 1. Scanning electron microscopy (SEM) micrograph (×15,000) of *B. amyloliquefaciens* MJ-1.

DNA walking kit (Seegene, Korea)을 이용하여 chitosanase 유전자의 전체 염기서열을 클로닝하였다(Fig. 2). 클로닝한 chitosanase 유전자의 크기는 825 bp로서 274 개의 아미노산으로 구성되어

1	TCCGACTCCCAAAATGACACCTTCTACCTGAGCCTAGTACTGGATTG	50
51	AAAATAATTACAAAAAATATTTTITTAACAAGACAAAACGCTTATTG	100
101	TATACTAAACCAGTAGTTATATTTATGGAAAGGGGTAATAGAATGAAGC	150
	M K A	
151	AAAAGTAGATTTCATGGAAGAAGACGGCTGTTTCATTACTTATTTTCACCA	200
4	K V D S W K K T A V S L L I F T M	
201	TGTTTTTCACCCCTGATGATGAACAATACGGTTTTTCAGCGGGGACTGAAC	250
21	F F T L M M N N T V F A A G L N	
251	AAGGATCAGAAGCGTCGAGCGGAGCAGTAACCAAGTATCTTTGAAAACGG	300
37	K D Q K R R A E Q L T S I F E N G	
301	CATGACTGAAATCAATATGGATATGTTGGAACATTTGCGCTGATGGAAGAG	350
54	M T E I Q Y G Y V E H L P D G R G	
351	GTTATACGTGGCGTGGGGCGGCTTACAACCGCTACCGGGGATGCATG	400
71	Y T C G R A G F T T A T G D A L	
401	GAAGTAGTGAAGTGACACAAAGGCAGTACCGAATAACAACTGAAAAA	450
87	E V V E V Y T K A V P N N K L K K	
451	GTACCTGCCTGAATTCGCTCGCCTGGCAAAAAGAAAGCGATGATATAA	500
104	Y L P E L R R L A K E E S D D I S	
501	GCAATCTCAAGGATTGATTCTGCTCGCTCGCTTGGAAAAGATAAG	550
121	N L K G F D S A W R S L G K D K	
551	GACTTCCGGCTGCTCAAGACACTGTAAACGACCGCTGTTATATCAACC	600
137	D F R A A Q D T V N D R L Y Y Q P	
601	TGCCATGAAACAGTCAGATAATATCGGACTAAAACCGCACCTTGCAAAAG	650
154	A M K Q S D N I G L K T A L A K A	
651	CTGTGATGATACATAAATATCAACATGGCGGTGGTACGACCCAGAC	700
171	V M Y D T I I Q H G G G D D P D	
701	TCCTTGAATTCCTTGATCAACGCACAAAACAAAAGCAGGTGGTTACC	750
187	S L N S L I K R T N K K A G G S P	
751	TAAAAATGGAGTAGATGAAAAGAAATGGTAAATAAATTTCTGGATGTGC	800
204	K N G V D E K K W L N K F L D V R	
801	GCTATGACGACCTGATGAATCCAGCAGATCCGGACACCCCTGATGAGTGG	850
221	Y D D L M N P A D P D T R D E W	
851	AGAGAATCGTTGCCGGTGGATGTCTCGCTCTATCGCCAAGGCGAA	900
237	R E S V A R V D V L R S I A K A N	
901	CAACTACAATCTAAACGGACCGATTAATGTTTATTTCAGAAGATATGGTG	950
254	N Y N L N G P I N V Y S E E Y G D	
951	ATTCGTAATCAAGTAAGCAGTGATGAGTGTGTCGGAGGGGGTGATTAA	1000
271	F V I K *	
1001	CTCTCTCGCAATTAGCTAACTGATAGAGTAGAGAACCAGAAACATTTGGGT	1049

Fig. 2. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the chitosanase from *B. amyloliquefaciens* MJ-1. Coding region starts at position 143 and ends at position 967. The putative Shine-Dalgarno (SD) sequences for ribosome-binding site are underlined.

Table 2. Characteristics of the isolated strain, MJ-1

Characteristics	Result	Characteristics	Result
Morphological characterization		Manitol	+
Shape	Rod	Sorbitol	+
Gram stain	+ ¹⁾	α Methyl-D-mannoside	-
Mobility	+	α Methyl-D-glucoside	+
Spore formation	+	N-acetyl glucosamine	+
Physiological characterization		Amygdalin	+
Catalase	+	Arbutine	+
VP-reaction	+	Esculine	+
Ph 5.7 agar	+	Salicine	+
Utilization of propionate	-	Cellobiose	+
Utilization of citrate	+	Maltose	+
Egg-yolk lecithinase	-	Lactose	-
Decomposition of casein	+	Melibiose	-
Starch hydrolysis	+	Sucrose	+
Carbohydrate degradation ²⁾		Trehalose	+
Glycerol	+	Inuline	-
Erythritol	+	Melezitose	-
D-Arabinose	-	D-Raffinose	-
L-Arabinose	+	Starch	-
Ribose	+	Glycogen	-
D-Xylose	-	Xylitol	-
L-Xylose	-	β Gentibiose	+
Adonitol	-	D-Turannose	-
β Metyl-D-xyloside	-	D-Lyxose	-
Galactose	-	D-Tagatose	-
D-Glucose	+	D-Fucose	-
D-Fructose	+	L-Fucose	-
D-Mannose	+	D-Arabitol	-
L-Sorbose	-	L-Arabitol	-
Rhomnose	-	Gluconate	+
Dulcitol	-	2-Keo-gluconate	-
Inositol	-	5-Keto-gluconate	-

¹⁾+ : Positive result, - : Negative result

²⁾API 50CHB kit was used.

있었으며, 예상 분자량은 30.9 kDa이었다. 또한, 개시코돈의 9 bp 상단에는 ribosome-binding site로 추정되는 AAGG 서열이 존재하고 있었다.

B. amyloliquefaciens MJ-1 chitosanase 유전자 서열을 바탕으로 예측된 아미노산 서열의 BLASTP 분석 결과, 기 알려진 chitosanase 효소들과 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 3). 즉, *Bacillus subtilis* 유래의 chitosanase precursor (18)와는 87%, *Bacillus* sp. 유래의 thermostable chitosanase (26)와는 68%의 상동성을 나타내었고, *Streptomyces* sp. N174 유래의 chitosanase (2)와는 39%, *Bacillus ehimensis* EAG1 유래의 chitosanase (1)와는 25%의 상동성을 나타내었다. 특히, glycoside hydrolase family 46 chitosanase에서 공통적으로 나타나는 E-[DNQ]-x(8)-Y-x(7)-D-x[RD]-[GP]-x-[TS]-x(3)-[AIVFLY]-G-x(5)-D 서열(23)이 보존되어 있었고, 또한 catalytic activity에 필수적인 Glu-22와 Asp-40 (*Streptomyces* sp. strain N174 chitosanase의 아미노산 서열로

서) (2)이 보존되어 있는 점으로 보아, 본 연구에서 클로닝한 *B. amyloliquefaciens* MJ-1 유래의 chitosanase는 glucoside hydrolase family 46에 속하는 chitosanase로 추정되었다.

B. amyloliquefaciens MJ-1 chitosanase의 대량발현 및 정제

B. amyloliquefaciens MJ-1으로부터 클로닝한 chitosanase 유전자를 *E. coli* BLR (DE3)에 도입하고, 1 mM의 IPTG로 chitosanase 과잉발현이 유도되는 것을 10% SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 4, lane 3). 그러나, 발현된 재조합 chitosanase 단백질은 불용성 inclusion body (약 80%)와 수용성 (약 20%) 분획으로 각각 발현되었다. 수용성 재조합 chitosanase를 정제하기 위하여 형질전환된 세포를 파쇄하고, 상등액을 Ni²⁺-NTA column에 loading한 후 50 mM imidazole buffer로 세척하였으며, 250 mM imidazole buffer로 elution함으로써 재조합 chitosanase를 정제하였다. 정제된 효소액을 10% SDS-PAGE로 분석한 결과, 약 30 kDa의 정제

BAC_MJ1	-----MKA---KVDSWKKTAVSLLIFTMFFTLMMNNTVFAAGLNKDQ-----	39
BAC_SUB	-----MKISMQKADFVKKAAISLLVFTMFFTLMMSETVFAAGLNKDQ-----	42
STR_N174	MHSQHRRTARIALAVLTAIPASLATAGVGYASTQASTAVKAGAGLDDP-----	48
BAC_EHI	MHMSNAKPSKSPARKLLALLCCFTLLASLFGATALFQPSKAAAASPDENFSPETLQFLRD	60
	*	
BAC_MJ1	-----KRRAEQLTSIFENG--MTEIQYGYVEHLPGRGYTCGRAGFTTATG----D	84
BAC_SUB	-----KRRAEQLTSIFENG--TTEIQYGYVERLDGRGYTCGRAGFTTATG----D	87
STR_N174	-----HKKEIAMELVSSAENSSLDWKAQYKYIEDIGGRGYTGGIIGFCSGTG----D	97
BAC_EHI	RTGLDGEQWNNIMKLINKPQDDLNIKYYGYCEDINBERGYSIGIFGATTGGFRDTHPD	120
	* * * * *	
BAC_MJ1	ALEVVEVYTKAVPN-NK----LKKYLPFLRLAKEESDDISNLKGFDSAWRSLGKDKDFR	139
BAC_SUB	ALEVVEVYTKAVPN-NK----LKKYLPFLRLAKEESDDTISNLKGFASAWKSLANDKEFR	142
STR_N174	MLELVQHYTDLEPG-NI----LAKYLPALKKVNKSASHSGLGTP-FTKDWATAAKDVFQ	151
BAC_EHI	GPFLFKAYDAAKAGNPSVEGAL-KRLGINGKMKGSILEIKDSEKVFCCGKIKKLQNDPAWR	180
	* * * * *	
BAC_MJ1	AAQDVTNDRLYYQPAMKQSDNIGLKTALAKAVMYDTIIQHGGDDPDSLNSLIKRTNKKA	199
BAC_SUB	AAQDKVNDHLYYQPAMKRSDNAGLKTALARAVMYDTVIQHGDGDDPDSFYALIKRTNKKA	202
STR_N174	QAQNDERDRVYFDPVAVSQAKADGLR-ALGQFAYYDAIVMHGPGNDPTSFGGIRKTAMKKA	210
BAC_EHI	KAMWETFYNVYIRYSVEQARQRGFTSALTIGSFVDTALNQATGDSNTLQGLLARS----	236
	* * * * *	
BAC_MJ1	GGSPKNGVDEKKWLNKFLDVRYDDLMPADPDTRDEWRESVARVDVLRSLAKANNYNLNG	259
BAC_SUB	GGSPKDGIDEKKWLNKFLDVRYDDLMPANHDTRDEWRESVARVDVLRSLAKENNYNLNG	262
STR_N174	R-TPAQGGDETYYLNAFLDARKAAMLEAAHDDTSRVDT-----EQRVFLKAGNLDLNP	263
BAC_EHI	----GSSTNEKTFLLKFKHAKR-TLVVDTNEYNQPPNGKNRVKQWDTLLDMGMNKLKNVDA	291
	* * * * *	
BAC_MJ1	PINVYSEEYGD-FVIK-	274
BAC_SUB	PIHVRSEYGN-FVIK-	277
STR_N174	PLKWKT--YGDPPVINS	278
BAC_EHI	EIAQVTN-----WEMK-	302

Fig. 3. Amino acid sequence comparison of chitosanases from *B. amyloliquefaciens* MJ-1 (BAC_MJ-1), *B. subtilis* 168 (BAC_SUB), *Streptomyces* sp. N174 (STR_N174) and *B. ehimensis* EAG1 (BAC_EHI). Sequence alignment was done using the CLUSTAL W program. Identical residues in all sequences are indicated by asterisks. Gaps are indicated by bars. The amino acid residues that seem to be essential for the chitosanase activity are shown on a black background (2).

된 chitosanase가 분리됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4, lane 4). 정제된 단백질은 Bradford 법으로 정량하였으며, 농축한 후에 효소의 특성 분석에 사용하였다. Ni²⁺-NTA column에 loading하기 전의 상등액에서의 효소활성은 약 0.4 unit/mg이었으며, Ni²⁺-NTA column으로 부분 정제된 효소의 활성은 약 120 unit/mg으로 나타났다.

재조합 chitosanase의 온도 및 pH에 대한 특성

Ni²⁺-NTA column으로 정제된 재조합 chitosanase를 50 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)으로 4°C에서 24시간동안 투석한 후, 온도 및 pH에 대한 효소특성을 비교하였다. 재조합 chitosanase 효소의 활성에 미치는 반응 최적온도를 조사하기 위하여, 20°C에서 80°C까지 각 온도별로 효소활성을 측정된 결과, 효소 활성의 최적온도는 60°C로 나타났다(Fig. 5A). 이와 같은 결과는, *B. subtilis* 유래의 chitosanase(18), Jang 등(6)과 Kim 등(9) 이 보고한 *Bacillus* sp.의 chitosanase의 최적온도 및 Yoon 등(27)이 보고한 thermostable chitosanase의 최적온도와 비슷하였다. 본 효소는 80°C에서도 약 75%의 효소활성을 나타내었다.

한편, 효소의 온도 안정성을 조사하기 위하여, 20°C에서 80°C

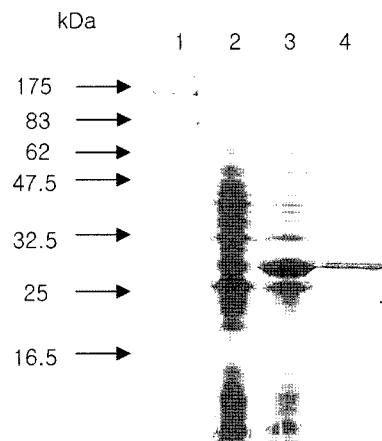


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of chitosanase protein from the recombinant *E. coli*. Lane 1, prestained protein marker; Lane 2, *E. coli* cell lysate before IPTG induction; Lane 3, *E. coli* cell lysate after IPTG induction; Lane 4, purified chitosanase using Ni²⁺-NTA column.

까지 각 온도 구간별로 정제된 효소액을 30분간 처리하고 급냉 각시킨 후, 37°C에서 효소의 잔존 활성을 측정하였다. Fig. 5의

(A)에 나타난 바와 같이, 50°C에서 30분까지는 효소활성이 90% 이상 유지되었으나 60°C 이상에서는 서서히 활성이 감소되었으며, 80°C에서 30분 방치하였을 경우에는 활성이 50% 정도까지 감소하였다. 상기의 결과에서 볼 때, Yoon 등(27)이 보고한 *Bacillus* sp. 유래의 고온성 chitosanase의 온도 안정성보다는 낮은 편이었으나, Rivas 등(18)이 보고한 *B. subtilis* 유래의 chitosanase 효소, Jang 등(6)이 보고한 *B. cereus* 유래의 chitosanase 효소보다는 온도 안정성이 상대적으로 높은 편이었다. 따라서, 본 연구를 통하여 확보한 *B. amyloliquefaciens* MJ-1 유래의 chitosanase는 비교적 내열성이 높은 효소로 추정할 수 있었다.

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, 정제된 효소액을 pH 2.0~12.0까지의 각 완충용액에 첨가하고 37°C에서 기질과 반응시킨 후, 효소 활성을 측정하였다. Fig. 5의 (B)에서 보는 바와 같이 pH 5.0에서 효소의 활성이 가장 우수한 것으로 나타났으며, pH 7.0 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과는, Kim 등(9)이 보고한 *Bacillus* sp. 유래의 chitosanase의 최적 pH와 유사하였다.

한편, pH에 따른 효소의 안정성을 조사하기 위하여, pH 2.0에서 pH 12.0까지 pH가 다른 여러 종류의 완충용액과 정제된 재

조합 효소액을 혼합하고 4°C에서 24시간 처리한 후, 효소의 잔존 활성을 측정하였다. Fig. 5의 (B)에서 보는 바와 같이, pH 5~7사이에서 80% 이상의 높은 활성을 유지하였다.

본 연구를 통하여 확보한 chitosanase는 전통발효식품인 매주에서 분리한 균주로부터 유래한 효소로서 내열성 및 내산성이 비교적 높은 특성을 나타내었다. 본 효소의 산업화를 위해서는, chitosan의 종류에 따른 효소의 기질 특이성, 본 효소에 의해 생산되는 chitosan oligosaccharide의 종류, 효소 활성에 미치는 이온 및 유기용매의 영향 등에 대한 연구가 지속되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Akiyama, K., T. Fujita, K. Kuroshima, T. Sakane, A. Yokota, and R. Takata. 1999. Purification and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus ehimensis* EAG1. *J. Biosci. Bioeng.* 87, 383-385.
2. Boucher, I., T. Fukamizo, Y. Honda, G.E. Willick, W.A. Neugebauer, and R. Brzezinski. 1995. Site-directed mutagenesis of evolutionary conserved carboxylic amino acids in the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 reveals two residues essential for catalysis. *J. Biol. Chem.* 270(52), 31077-31082.
3. Choi, Y.J., E.J. Kim, Z. Piao, Y.C. Yun, and Y.C. Shin. 2004. Purification and characterization of chitosanase from *Bacillus* sp. strain KCTC 0377BP and its application for the production of chitosan oligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8), 4522-4531.
4. 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.
5. Horowitz, S.T., S. Roseman, and H.T. Blumenthal. 1957. The preparation of glucosamine oligosaccharide I. separation. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 5064-5049.
6. Jang, H.-K., J.-H. Yi, J.-T. Kim, K.-E. Lee, and S.-G. Choi. 2003. Purification, characterization, and gene cloning of chitosanase from *Bacillus cereus* H-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31(3), 216-223.
7. The Japanese Society for chitin and chitosan. 1990. Application of chitin and chitosan. p. 71-98. Kibodang Publisher, Tokyo, Japan.
8. Jo, Y.-Y., K.-J. Jo, Y.-L. Jin, W.-J. Jung, J.-H. Kuk, K.-Y. Kim, T.-H. Kim, and R.-D. Park. 2003. Characterization of endochitosanases-producing *Bacillus cereus* P16. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 960-968.
9. Kim, P.-I., T.-H. Kang, K.-J. Chung, I.-S. Kim, and K.-C. Chung. 2004. Purification of a constitutive chitosanase produced by *Bacillus* sp. MET 1299 with cloning and expression of the gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 240, 31-39.
10. Kurakake, M., S. You, K. Nakagawa, M. Sugihara, and T. Komaki. 2000. Properties of chitosanase from *Bacillus cereus* S1. *Curr. Microbiol.* 40, 6-9.
11. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
12. Matsuda, Y., Y. Idia, T. Shinogi, K. Kakutani, T. Nonomura, and H. Toyoda. 2001. In vitro suppression of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* by extracellular chitosanase of *Sphingobacterium multivorum* and cloning of the chitosanase gene *csnSM1*. *J. Gen. Plant Pathol.* 67, 318-323.
13. Miller, L. 1987. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 425-431.

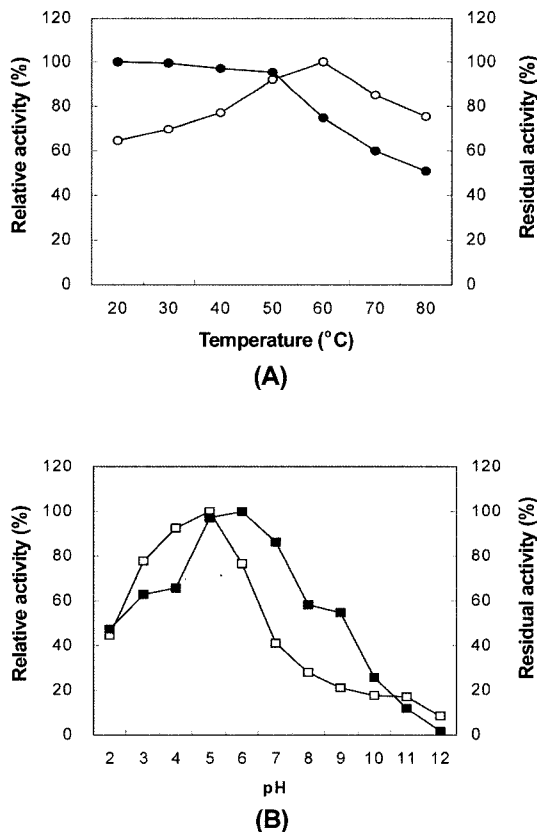


Fig. 5. Enzyme properties of the purified recombinant chitosanase. (A) temperature effect (○) and thermostability (●), (B) pH effect (□) and pH stability (■).

14. Pantaleone, D., M. Yalpani, and M. Scollar. 1992. Unusual susceptibility of chitosan to enzyme hydrolysis. *Carbohydr. Res.* 237, 325-332.
15. Park, R.-D., Y.-Y. Jo, H.-C. Lee, C.-S. Cho, and D.-H. Jo. 1998. Endochitinase produced by *Bacillus* sp. P21 as a potential source for the production of chitooligosaccharides. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26(4), 345-351.
16. Park, Y.-M., H.-L. Chang, T.-L. Hur, and S.-Y. Ghim. 2004. Molecular cloning of chitinase gene and quantitative production of chitosan oligomer. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32(1), 16-21.
17. Pavlova, S.I., A.O. Kilic, S.S. Kilic, J.-S. So, M.E. Nader-Macias, J.A. Simoes, and L. Tao. 2002. Genetic diversity of vaginal lactobacillus from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Microbiol.* 92, 451-459.
18. Rivas, L.A., V. Parro, M. Moreno-Paz, and R.P. Mellado. 2000. The *Bacillus subtilis* 168 *csn* gene encodes a chitinase with similar properties to a *Streptomyces* enzyme. *Microbiol.-SGM.* 146, 2929-2936.
19. Sohn, J. H., J.H. Lee, H.Yi, J. Chun, K.S. Bae, T.Y. Ahn, and S.J. Kim. 2004. *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 675-680.
20. Somashekar, D., and R. Joseph. 1996. Chitinase-properties and applications: a review. *Bioresource Technol.* 55, 35-45.
21. Sugano, N., K. Yoshida, M. Hashimoto, K. Enomoto, and S. Hirano. 1992. Hypercholesterolemic activity of partially hydrolyzed chitosan. *Advances in chitin and chitosan.* p472-478. In C. J. Brine. P. A. Standford and J. P. Zikakis(eds). Elsevier.
22. Tanabe, T., K. Morinaga, T. Fukamizo, and M. Mitsutomi. 2003. Novel chitinase from *Streptomyces griseus* HUT6037. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 354-364.
23. Tremblay, H., J. Blanchard, and R. Brzezinski. 2000. A common molecular signature unifies the chitinases belonging to families 46 and 80 of glycoside hydrolases. *Can. J. Microbiol.* 46(10), 952-955.
24. Yabuki, M., M. Hirano, A. Ando, T. Fujii, and Y. Amemiya. 1987. Isolation and characterization of a chitin degrading bacterium and formation of chitinase by the isolate. *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.* 39, 23-27.
25. Yi, J.-H., H.-K. Jang, S.-J. Lee, K.-E. Lee, and S.-E. Choi. 2004. Purification and properties of chitinase from chitinolytic β -Proteobacterium KNU3. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14(2), 337-343.
26. Yoon, H.-G., H.-Y. Kim, Y.-H. Lim, H.-K. Kim, D.-H. Shin, B.-S. Hong, and H.-Y. Cho. 2000. Thermostable chitinase from *Bacillus* sp. strain CK4: Cloning and expression of the gene and characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9), 3727-3734.
27. Yoon, H.-G., H.-Y. Kim, H.-K. Kim, B.-S. Hong, D.-H. Shin, and H.-Y. Cho. 2001. Thermostable chitinase from *Bacillus* sp. strain CK4: its purification, characterization, and reaction patterns. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(4), 802-809.
28. Zhu, X.-F., X.-Y. Wu, and Y. Dai. 2003. Fermentation condition and properties of chitinase from *Acinetobacter* sp. C-17. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 284-290.

(Received May 22, 2006/Accepted June 13, 2006)

ABSTRACT: Molecular Cloning and Characterization of Chitinase Gene from *Bacillus amyloliquefaciens* MJ-1

Chan-Soo Park¹, Hae-Geun Oh¹, Soon-Kwang Hong², Byung Chul Park³, Young Hyun^{1*}, and Dae-Kyung Kang* (Department of Animal Resource and Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea, ¹Bio-Resources Institute, EASY BIO System, Inc, Cheonan 330-812, Korea, ²Department of Biological Sciences, Myongji University, Yongin 449-728, Korea, ³NUTRABIO, Yoksam-dong, Seoul 135-080, Korea)

In order to develop chitinase for the production of chitosan oligosaccharides, a chitinase-producing bacterium was isolated from the traditional fermented soybean, Meju, and identified as *Bacillus amyloliquefaciens* MJ-1. The cloned chitinase gene, 825 bp in size, encoded a single peptide of 274 amino acids with an estimated molecular mass of 30.9 kDa. The deduced amino acid sequence showed significant homology with microbial chitinases. The recombinant chitinase was expressed in *Escherichia coli* upon induction with isopropyl-D-thiogalactopyranoside, and purified using Ni²⁺-NTA agarose column chromatography. The maximal activity of the recombinant chitinase is at pH 5.0 and 60°C. The recombinant chitinase is stable between pH 5.0 and pH 7.0 at 37°C for 30 min, and more than 75% of the activity still remain at 80°C for 30 min incubation.