

碩士學位論文

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



濟州大學校大學院

海洋生物工學科

吳哲洪

2003年 12月

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

指導教授 李 濟 熙

吳 哲 洪

이 論文을 理學碩士 論文으로 提出함



제주대학교 중앙도서관

JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2003年 12月

吳哲洪의 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 전 유 진 (인)

委 員 박 근 태 (인)

委 員 이 세 희 (인)

濟州大學校 大學院

2003年 12月

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

Chul-Hong Oh

(Supervised by Professor Jehee Lee)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF MASTER
OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MARINE BIOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2003. 12.

목 차

Abstract	i
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	
1. Chitosanase 분비 미생물 selection을 위한 배지조성 및 배양조건	3
2. Chitosanase의 활성 측정	4
3. Chitosanase 분비 미생물의 분리 및 동정	6
4. Chitosanase 분비 미생물의 최적 배양조건 확립	10
5. Chitosanase의 정제	11
6. Chitosanase의 특성 분석	12
7. Chitosanase의 아미노산 서열 분석	13
8. Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR)을 통한 chitosanase 유전자 서열 확인	14
9. <i>E. coli</i> BL21에서 발현을 위한 Chitosanase coding sequence cloning	16
10. pET vector를 이용한 <i>E. coli</i> BL21에서의 Chitosanase 발현	17

III. 결 과

1. Chitosanase 분비 미생물의 분리 및 동정	19
2. Chitosanase 분비 미생물의 배양 조건 확립	25
3. Chitosanase의 정제	35
4. 정제된 효소의 특성	36
5. Chitosanase 아미노산 서열 분석	41
6. Chitosanase 염기 서열 분석	41
7. Chitosanase coding sequence의 cloning	48
8. <i>E. coli</i> BL21을 이용한 chitosanase 발현	48

IV. 고 찰	50
---------------	----



V. 요 약	52
--------------	----

VI. 참 고 문 헌	54
-------------------	----

감사의 글	58
-------------	----

Abstract

Chitosans are high molecular weight polysaccharides consisting of 1,4- β -linked D-glucosamine residues and are hydrolyzed by chitosanase. In this study, we isolated two *Bacillus subtilis* strains with high activity chitosanase from intestine of *Sebastiscus marmoratus*. They were identified as *Bacillus subtilis* CH1 and *Bacillus subtilis* CH2 by morphological, biochemical and 16S rRNA gene analysis. Conditions were optimized for chitosanase production. The optimum carbon source for *Bacillus subtilis* CH1 was 2% starch and 4% fructose for *Bacillus subtilis* CH2. The optimum nitrogen source for *Bacillus subtilis* CH1 was 1.0% yeast extract and 1.4% yeast extract for *Bacillus subtilis* CH2. Chitosanase from both strains showed the highest activity at 60°C. Unlike other chitosanases, the expression of these chitosanases did not induce with chitosan. The chitosanases secreted into the medium were concentrated with ammonium sulfate precipitation and purified by gel permeation chromatography. Molecular weight of each purified chitosanase was 31 kDa. Primers generated based on the N-terminal amino acid sequence was used to amplify the chitosanase genes. The deduced amino acid sequences were the same in the mature proteins of the two strains but the nucleotide sequences differed by 1.65%. In the signal peptide region, there is a deletion of 18 bp in the chitosanase of *Bacillus subtilis* CH2. We cloned the pre-protein coding regions of chitosanase from both species into pET11a vector and expressed in *E. coli* BL21 cells. Induction with isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) revealed similar levels of chitosanase expression in both clones.

I. 서론

키토산은 D-glucosamine이 β -1,4 결합으로 연결된 고분자 다당류로 지구상에 셀룰로즈 다음으로 풍부한 천연 고분자 물질인 키틴을 탈아세틸화 시킴으로써 쉽게 얻을 수 있다(No & Meyers, 1995). 키토산은 체내에서 생리활성 기능이 뛰어난 것으로 알려져 있지만 중성이나 알카리의 물에서 녹지 않는 고분자물질이기 때문에 복용 시 체내로 흡수되지 못한다. 이로 인해 수용성인 키토산 올리고당의 제조가 필요하게 되었고 그 제조 방법으로는 산분해법(Horowitz *et al.*, 1957)과 효소분해법(Izume & Ohtakara, 1987)이 알려져 있다. 산분해법에 의한 키토산 올리고당의 제조방법은 간단하지만, 키토산의 분해 결과 단당 및 이당 등 초저분자를 다량으로 포함하는 키토산 올리고당이 제조되어지며, 이러한 초저분자 키토산 올리고당은 인체면역 강화(Suzuki *et al.*, 1982), 항암 및 항균작용(Jeon & Kim, 1997) 등이 미약하다는 문제가 있다. 그리고 산을 이용하여 키토산을 분해시킬 경우 인체에 유해한 부산물 물질이 생성될 뿐만 아니라 염산을 완전히 제거하지 않은 제품을 사용하면 이것이 당대사에 영향을 미치게 되고, 이로 인해 인슐린 작용에 이상이 생겨 당뇨병에 걸릴 수 있게 된다. 반면에, 효소 분해법을 이용한 키토산 올리고당의 제조방법은, 사용하는 효소에 따라 다양한 중합도를 갖는 키토산 올리고당을 만들 수 있는(Sakai *et al.*, 1991; Seino *et al.*, 1991) 장점이 있고 인체에 무해하다. 특히, 6 이상의 중합도를 가진 키토산 올리고당의 경우 인체 면역강화, 항암 및 항균작용 등 생리활성에 뛰어난 효과를 보이면서 식품첨가제(Park *et al.*, 2002), 감염억제(Tokoro *et al.*, 1989), 항균제(Wang, 1992), 항암제(Suzuki *et al.*, 1986; Suzuki *et al.*, 1992) 등에 사용되어지고 있다.

Chitosanase는 생물체로부터 분비되는 생체외 분비 효소로 알려져 있으며 박테리아, 곰팡이, 식물, 곤충, 방선균 등에 의해 생성된다(Somashekar & Kim, 1996). 현재까지 연구되어진 chitosanase들은 chitosan에 의해 유도적인 것이 대부분이며 *Streptomyces*

N-174 (Boucher *et al.*, 1992)의 경우 chitosanase는 chitosan을 단일 탄소원으로 배지 내에 첨가했을 때 유도되어졌고 D-glucosamine을 첨가했을 때에도 chitosanase의 분비가 이루어졌다고 연구되었다. *Bacillus circulans* (Davis & Eveleigh, 1984)와 *Amycolatopsis* CsO-2 (Okajima *et al.*, 1994)의 chitosanase 역시 chitosan에 의해 유도된다고 알려져 있다. 하지만 Luis *et al.* (2000)은 *Bacillus subtilis* 168의 chitosanase 발현이 chitosan 농도가 1mg/ml 이상에서 오히려 저해된다고 보고하였다.

미생물로부터 분리되는 대부분의 효소들은 그 양이 작을 뿐 아니라 정제과정에서 많은 시간이 소요되고 경제적 부담이 크게 나타난다. 그래서 최근에는 단백질을 coding 하는 유전자를 vector에 재조합하여 특정 미생물을 통해 그 단백질을 과발현 시키는 방법들이 보고되어지고 있다. 이러한 방법들이 개발되면서 chitosanase 역시 효율적이고 보다 많은 단백질을 획득하기 위해 특정 미생물을 과발현이 이루어지고 있다(Yoon *et al.*, 2000). 본 연구에서는 chitosanase를 생산하는 미생물을 쏨뱅이의 내장으로 부터 분리하고 그 chitosanase의 정제, 특성 분석 및 유전자 분석을 토대로 한 chitosanase 발현까지의 과정을 기록하였다.

II. 재료 및 방법

1. Chitosanase 분비 미생물 selection을 위한 배지조성 및 배양조건

Chitosanase 분비 미생물을 분리하기 위하여 Table 1의 chitosan 배지를 사용하였고 탄소원으로 사용된 chitosan은 용해시키지 않고 배지의 1%가 되도록 첨가하였으며 배지를 부을 때 chitosan이 가라앉기 때문에 배지를 균한 후 뒤집어 사용하였다. 균주의 배양은 30℃에서 밤새 배양하였다.

Table 1. Composition of the isolation medium. Three solutions (790 ml of solution I, 10 ml of solution II and 200 ml of solution III) were mixed and 10 g of chitosan was added prior to autoclave. This medium was poured in to plate and inverted after solidification.

Solution I	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5 g
K ₂ HPO ₄	2.1 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g
Distilled Water	790 mL
Solution II	
FeSO ₄	100 mg
ZnSO ₄	10 mg
MnCl ₂	10 mg
Distilled Water	100 mL
Solution III	
agar	12 g
Distilled Water	200 mL

2. Chitosanase의 활성 측정

Chitosanase 활성은 Rondle (1955)등의 방법을 토대로 하여 측정하였고 Fig. 1에 방법을 정리하였다. 이때 효소활성은 효소 1 ml가 1분간 생산하는 glucosamine 1 μ mole을 1 unit으로 정하였다. Fig. 1에서 acetylacetone reagent는 1.25 N Na_2CO_3 50 ml에 acetylacetone 1.5 ml를 가하여 만들었고, dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) reagent는 96% ethanol 30 ml에 DMAB 1.6 g을 녹인 후 30ml의 HCl을 혼합하여 만들었으며 위의 두 시약은 사용 직전에 만들어 사용하였다.



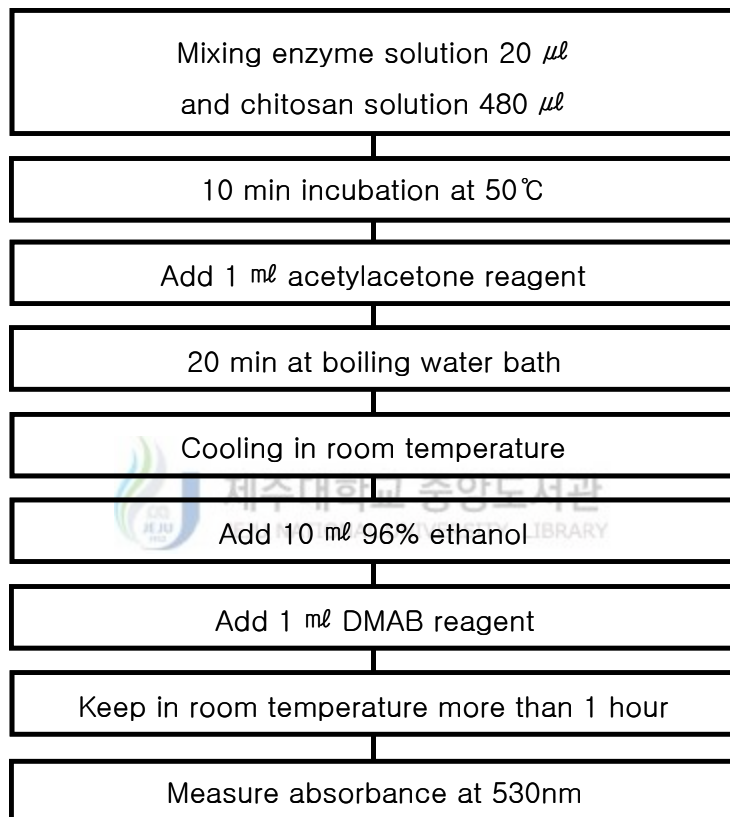


Fig. 1. Methodology of chitosanase activity assesment.

3. Chitosanase 분비 미생물의 분리 및 동정

Chitosanase 분비 미생물의 분리 및 배양

갑각류를 주식으로 하는 썸뱅이(*Sebastes marmoratus*)로부터 그 내장을 분리하여 미생물이 밖으로 노출되도록 한 후 20% glycerol solution으로 현탁시키고 이를 stock 으로 -70℃에 보관하였다. 그 중 일부를 LB (Luria Bertani) broth에 배양하여 Table 1 의 분리 배지에 도달한 후 30℃에서 하루동안 배양하였다. 배양된 각각의 colony들은 LB broth에 각각 접종하여 30℃에서 16시간동안 진탕배양 하였고 배양액을 조효소액으로 사용하여 각각 활성 측정을 하였다. 활성이 우수한 균주들은 40% glycerol solution 과 1:1 비율로 희석하여 stock을 제조하였다.

형태학적 특성



분리된 균주들의 형태학적인 특성을 확인하기 위해 LB agar plate에 도달하여 colony 형태를 확인하고, Scanning electron micrograph (SEM) 촬영을 통해 균주의 형태를 확인하였다. SEM 촬영을 위한 균주의 전처리는 LB agar plate에 배양된 균주를 가로×세로 0.5×0.5 cm가 되도록 잘라내고 2.5% glutaraldehyde 용액에 담근 후 실온에서 2시간 방치하였다. 이를 1X PBS 용액에서 5분씩 두 번 washing하고 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% EtOH로 각각 1시간씩 탈수시켰다. Isoamyl acetate와 100% EtOH이 0.5 : 1.5 비율로 만들어진 용액에 1시간 담근 후 isoamyl acetate와 100% EtOH이 1 : 1 비율로 만들어진 용액으로 다시 옮겨 1시간 담그고 isoamyl acetate와 100% EtOH이 1.5 : 1 비율로 만들어진 용액에 1시간 담가 마지막으로 isoamyl acetate 용액에 1시간 이상 놓아두었다. 이를 CO₂를 이용하여 건조시키고 금으로 입힌 후 SEM을 촬영하였다.

생화학적 특성

분리된 균주들을 Gerjardt *et al.* (1981)의 방법에 따라 gram staining, spore staining 을 하였고 Jean (1980)의 방법에 따라 oxidase, catalase, methyl red (MR), voges-proskauer (VP), indole, oxidation/fermentation (O/F), triple sugar iron agar (TSI), motility test를 하였다.

분리된 두 균주의 genomic DNA 분리

분리된 두 균주를 각각 LB broth 4 ml에 접종하여 30°C에서 12시간 배양하였다. 배양액을 microcentrifuge tube에 넣어 15000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pellet을 수집하고 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA의 농도는 Unicam UV/VIS spectrometer (Helios 3, Ltd, UK)를 이용하여 260 nm에서 optical density를 측정하였다.

16S rRNA 유전자 서열 분석을 위한 primer 제작 및 PCR 반응

GeneBank에 등록되어 있는 chitosanase를 분비하는 균주들의 16S rRNA 서열들을 비교 분석하여 두 개의 oligonucleotide primer Chi 16S-F (5'-CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA-3')와 Chi 16S-R (5'-TTGACGTCRTCCCCACCTTCCTC-3')를 Bioneer (Korea)에 주문 제작하였다.

16S rRNA 서열을 밝히기 위한 PCR 반응의 총 volume은 50 μ l로 하였으며 약 1 μ g의 genomic DNA를 template로 하여 100 pmole/ μ l 농도의 Chi 16S-F, Chi 16S-R primer를 각각 1 μ l씩 첨가하고 10 mM의 dNTP 1 μ l와 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 5 Unit의 *Taq* polymerase (Takara, J

apan)를 혼합하였다. PCR 반응은 PTC-150 Minicycler (MJ Research, USA)를 이용하였고, 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 5분, denaturation 94°C에서 30초, annealing 60°C에서 30초, extension 72°C에서 1분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 반응하였다. 반응 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

16S rRNA 유전자 서열 분석을 위한 cloning 및 sequencing

Taq polymerase에 의해 합성된 3'의 A를 제거하기 위해 3' → 5' exonuclease activity를 갖고 있는 *Pfu* polymerase (Stratagene, USA)을 1 μ l 첨가하여 72°C에서 10분간 반응 시켰다. 이를 AccuPrep Gel Purification kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였으며 DNA의 농도를 측정하기 위하여 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 이 PCR product는 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 사용하여 제한효소 *Hinc*II (Amersham Pharmacia, UK)로 잘린 pBluescript II SK(-) vector (Stratagene, USA)에 ligation 하였다. Ligation 반응은 pBluescript SK(-) vector 100 ng에 1.5 μ l의 T4 DNA ligase buffer (660 mM Tris-HCl pH 7.6, 66 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 1mM ATP), 2 μ l의 insert DNA, 0.5 μ l의 T4 DNA ligase를 넣고 전체 양이 15 μ l가 되도록 한 후 15°C에서 16시간 동안 ligation 하였다. Ligation 산물은 *E. coli* DH5 α 에 transformation 하였다. Transformation은 7.5 μ l의 ligation 산물을 *E. coli* DH5 α competent cell 75 μ l에 첨가하고 얼음에서 40분간 배양한 뒤 42°C에서 90초간 heat shock을 시키고 다시 얼음에 2분간 방치한 후 LB broth 750 μ l를 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 배양액 75 μ l를 ampicillin, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside (X-gal)가 포함된 LB plate에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 밤새 배양된 colony 중 white colony를 선택하여 ampicillin이 포함된 LB broth 4 ml에 접종한 후 37°C에서 밤새 배양하였다. 배양액을 1.5 ml microcentrifuge tube에 옮겨 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 pell

et을 수집하고 AccuPrep Plasmid Extraction Kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 분리된 DNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였고 Unicam UV/VIS Spectrometer를 이용하여 260 nm에서 optical density를 측정하였다. 염기서열 분석은 Microgen (Korea)에 의뢰하였고 분석된 염기서열은 NCBI의 database에 나와있는 sequence들과 비교 분석하여 동정에 이용하였다.



4. Chitosanase 분비 미생물의 최적 배양조건 확립

Minimal medium 제조 및 균주의 접종

탄소원, 질소원에 따른 chitosanase 생산량을 확인하기 위해 NaCl 0.25%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.07%, KCl 0.05% 되도록 하는 기본 배지를 제조하였다. 접종을 위한 균주는 LB plate에 streaking하여 단일 colony를 얻어내고 이를 LB broth에서 밤새 배양한 후 cell pellet만을 모아 기본 배지로 부유시켜 사용하였다.

탄소원의 영향

탄소원 배지는 0.3% yeast extract를 고정 질소원으로 하는 기본 배지에 탄소원을 starch, soluble chitosan, chitosan powder, chitin powder, mannitol, lactose, galactose, glycerol, fructose, maltose, glucose 및 sucrose를 각각 0.5%되도록 첨가하여 제조하였고 각각의 균주를 균일하게 분주하여 30℃에서 10시간 진탕 배양하여 탄소원의 영향을 조사하였다.

탄소원 농도에 따른 영향

최적 탄소원을 가지고 농도에 따른 영향을 살펴보기 위하여 탄소원을 제외한 기본배지에 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4%의 농도가 되도록 최적 탄소원을 각각 첨가하고 각각의 균주를 균일하게 분주하여 30℃에서 10시간 동안 진탕 배양하고 탄소원 농도에 따른 영향을 평가하였다.

질소원의 영향

질소원 배지는 chitosanase 생산에 가장 우수한 탄소원을 고정 탄소원으로 하여 0.5%가 되도록 기본배지에 첨가하고 질소원으로 yeast extract, pepton, trypton, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 각각 0.3% 되도록 첨가하여 제조하였고 각각의 균주를 균일하게 분주하여 30℃에서 10시간 진탕 배양하여 질소원의 영향을 조사하였다.

질소원 농도에 따른 영향

최적 질소원을 가지고 농도에 따른 영향을 살펴보기 위하여 질소원을 제외한 기본배지에 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 %의 농도가 되도록 최적 질소원을 각각 첨가하고 각각의 균주를 균일하게 분주하여 30℃에서 10시간 동안 진탕 배양하고 질소원 농도에 따른 영향을 평가하였다.



5. Chitosanase의 정제

조효소액의 준비

LB broth 1 ℓ에 chitosanase 분비 균주를 30℃에서 24시간 배양하여 4℃에서 4,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 상등액만을 따로 분리하여 이를 조효소액으로 사용하였다.

염석 및 투석

조효소액에 ammonium sulfate를 90% 포화되도록 천천히 녹인 후 4℃에서 15,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 침전된 단백질을 분리하였다. 침전된 단백질은 1X PBS로 용해시킨 후 4℃에서 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이를 1X PBS에 투석막을 사용하여 4℃에서 교반하면서 밤새도록 탈염하였다. 탈염 후 glycerol을 최종 농도가 10% 되도록 첨가하여 -70℃에 보관하였다.

Gel permeation chromatography

Sphadex-G100을 담체로 사용하여 fraction 별로 1 ml씩 받아 활성측정과 SDS-PAGE를 시행하였으며 각각을 비교하여 chitosanase 단백질을 선별해 내었다.



6. Chitosanase의 특성 분석

최적 반응 온도

1% soluble chitosan 995 μ l와 정제된 chitosanase 5 μ l를 희석하여 반응 온도를 각각 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80℃로 주었으며 10분간 반응시킨 후 반응액 500 μ l를 가지고 활성을 측정하였다.

열 안정성

정제된 chitosanase를 40, 50, 60, 70, 80℃에서 10분, 20분, 30분, 60분 동안 각각 농

아둔 후 1% chitosan solution 495 μ l와 각각의 온도에 처리된 chitosanase 5 μ l를 혼합하여 50°C에서 10분간 반응하고 각각의 남아있는 활성을 측정하였다.

7. Chitosanase의 아미노산 서열 분석

정제된 chitosanase를 12% acrylamide gel에 loading 한 후 50 mA에서 50분간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel을 분리하고 25 mM Tris, 190 mM glycine, 10% MeOH, 0.02% SDS를 혼합하여 만든 transfer buffer에 3분간 담가 놓았다. PVDF membrane도 MeOH에 10초간 적셨다가 transfer buffer에 5분간 담가 놓았다. 3M paper 위에 gel을 올려 놓고 그 위로 PVDF membrane과 3M paper를 차례로 올려 놓은 후 blotting 장치에 setting 하여 300 mA에서 3시간 동안 전류를 흘려 주었다. 전계가 끝난 후 PVDF membrane을 떼어내 깨끗한 증류수로 washing하고 50% MeOH에 coomassie blue R을 0.1% 되도록 녹인 staining solution에 5분간 담그었다가 MeOH 50%, acetic acid 10%가 되도록 만들어진 destaining solution에 5분간 담근 후 깨끗한 증류수로 washing 하여 실온에서 건조시켰다. 건조된 PVDF membrane에서 chitosanase band를 잘라내어 N-말단 아미노산 서열 분석에 이용하였다. N-말단 아미노산 서열 분석은 부산대학교 유전공학연구소에 의뢰하였다.

8. Long and Accurate Polymerase Chain Reaction (LA PCR)을 통한 chitosanase 유전자 서열 확인

제한효소 절단 반응

B. subtilis CH1로부터 분리한 genomic DNA 50 μl 에 증류수 2 μl , H buffer 6 μl 와 제한효소 *Pst*I 2 μl 를 첨가하여 37°C water bath에서 3시간동안 반응시켰다. 또한 *B. subtilis* CH2로부터 분리된 genomic DNA 50 μl 에 증류수 2 μl , H buffer 6 μl 와 제한효소 *Eco*RI 을 2 μl 첨가하여 37°C water bath에서 3시간동안 반응시켰다. 각각의 반응 산물은 EtOH 침전 과정을 거쳐 DNA만 정제하였으며 증류수 10 μl 에 resuspension 시켰다.

Cassette ligation 반응

*Pst*I 제한효소로 절단된 *B. subtilis* CH1의 genomic DNA에 *Pst*I cassette을 부착하기 위하여 절단된 genomic DNA 5 μl 에 *Pst*I cassette 2.5 μl , ligation solution I 15 μl 와 ligation solution II 7.5 μl 를 반응시켰고, *Eco*RI 제한효소로 절단된 *B. subtilis* CH2 genomic DNA에 *Eco*RI cassette을 부착하기 위하여 절단된 genomic DNA 5 μl 에 *Eco*RI cassette 2.5 μl , ligation solution I 15 μl 와 ligation solution II 7.5 μl 를 반응시켰다. 각각의 반응은 16°C에서 30분간 진행시켰으며 반응 산물은 EtOH 침전 과정을 거쳐 증류수 5 μl 에 부유시켰다.

LA PCR을 위한 primer의 제작

LA PCR을 수행하기 위하여 하나의 primer는 LA PCR™ Kit (Takara, Japan) 내에 있는 primer C1 (5'-GTACATATTTGTCGTTAGAACGCGTTAGAACGCGTAATACGACTCA-3

)과 primer C2 (5'-CGTTAGAACGCGTAATACGACTCACTATAGGGAGA-3')를 사용하였고 다른 하나의 primer는 N-말단 아미노산 서열 분석을 토대로 하여 multi primer ChiA F1 (5'-GCNYTNAAYAARGAYGARAARMGMGN-3')과 ChiA F2 (5'-GARAARMGNMGNCGNGARCARYTNACN-3')를 제작하였다.

1st PCR

각각의 cassette이 ligation 된 *B. subtilis* CH1과 *B. subtilis* CH2의 DNA 2 μl 를 증류수 32.5 μl 에 희석하여 DNA solution을 만들었고 이를 94°C에서 10분간 방치하였다. DNA solution에 10X LA buffer II(Mg²⁺ plus) 5 μl , dNTP mixture(2.5 mM) 8 μl , primer C1 1 μl , primer ChiA F1 1 μl 와 Takara LA *Taq* DNA polymerase 0.5 μl 를 첨가하였다. 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 1분, denaturation 94°C에서 30초, annealing 55°C에서 30초, extension 72°C에서 2분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 반응하였다. PCR 반응 후 PCR product는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

2nd PCR

1st PCR product를 5배로 희석하여 1 μl 만을 사용하였고 여기에 증류수 31.2 μl , 10X LA buffer II(Mg²⁺ plus) 5 μl , dNTP mixture(2.5 mM) 8 μl , primer C2 1 μl , primer ChiA F2와 Takara LA *Taq* DNA polymerase 0.5 μl 를 첨가하였다. 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 1분, denaturation 94°C에서 30초, annealing 55°C에서 30초, extension 72°C에서 2분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 반응하였다. PCR 반응 후 PCR product는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. PCR product는 위에서 언급한 방법으로 pBluescript II SK(-) vector에 cloning하여 Microgen에 염기서열 분석을 의뢰하였다.

Chitosanase 코딩 유전자 앞쪽 서열을 확인하기 위한 PCR, cloning 및 sequencing

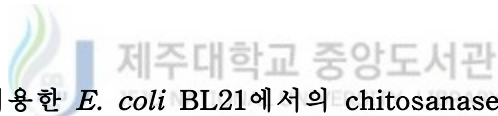
LA PCR을 통해 확인된 코딩 유전자의 서열을 이용하여 primer CHR1 (5'-CGCATGTA TAACCTCGCCCGTCATC-3'), CHR2 (5'-CATATCCATATTGGATCTCCGTTGTGCC-3')를 제작하였고 genomic DNA를 주형으로 PCR 반응을 하였다. 반응은 Ex *Taq* DNA polymerase (Takara, Japan)를 사용하였으며 PCR 반응에 총 사용된 양은 50 μ l로 하였으며 약 1 μ g의 genomic DNA를 template로 하여 100 pmole/ μ l 농도의 Chi 16S-F, Chi 16S-R primer를 각각 1 μ l씩 첨가하고 10 mM의 dNTP 1 μ l와 10X PCR buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 5 Unit의 Ex *Taq* polymerase를 혼합하였다. PCR 반응은 PTC-150 Minicycler를 이용하였고, 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 5분, denaturation 94°C에서 30초, annealing 60°C에서 30초, extension 72°C에서 1분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 10분간 반응하였다. 반응 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

3'말단의 A를 제거하기 위하여 *Pfu* polymerase를 1 μ l 첨가하여 72°C에서 10분간 반응시켰다. 이를 AccuPrep Gel Purification kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였으며 DNA의 농도를 측정하기 위하여 1% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 이 PCR product를 위에서 언급한 방법으로 cloning 하였다.

9. *E. coli* BL21에서 발현을 위한 Chitosanase coding sequence의 cloning

두 균주로부터 분리된 genomic DNA를 template로 하여 chitosanase coding 영역을 증폭하기 위한 PCR 반응을 하였다. 각각의 증폭에 사용된 primer는 CH coding F (5'-GAGACATATGAAAATCAGTATGCAAAAAGC-3')와 CH coding R (5'-GAGAGGATCCTTATTTGATTACAAAATTACCGTA-3')이며 *E. coli* BL21에서 발현을 위해

pET11a vector에 삽입이 용이하도록 primer CH coding F에는 *NdeI* site를 CH coding R에는 *BamHI* site를 각각 포함하도록 디자인하였다. PCR 반응은 Hot start PCR 방법으로 진행하였으며 PCR 반응에 총 사용된 양은 50 μl 로 약 1 μg 의 genomic DNA를 template로 하여 100 pmole/ μl 농도의 CH coding F, CH coding R primer를 각각 1 μl 씩 첨가하고 2.5 mM의 dNTP 4 μl 와 25 mM의 MgCl_2 3 μl , 10X Ex *Taq* Buffer 5 μl 그리고 3 unit의 Ex *Taq* DNA polymerase를 혼합하였다. PCR 반응은 PTC-150 M inicycler를 이용하였고, 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 5분, denaturation 94°C에서 1분, annealing 45°C에서 30초, extension 72°C에서 1분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 반응하였다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. PCR product는 위에서 언급한 방법으로 pBluescript II SK (-) vector에 subcloning하였다.



10. pET vector를 이용한 *E. coli* BL21에서의 chitosanase 발현

분리된 plasmid DNA와 발현용 vector인 pET11a (Novagen, USA)는 제한효소 *NdeI* (Takara, Japan)과 *BamHI* (Takara, Japan)으로 각각 절단하였다. 처음 *BamHI*을 사용하여 절단하였으며 DNA는 2 μg 에 K buffer 5 μl 와 10 unit의 *BamHI*을 혼합하여 30°C에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에 전기영동하여 잘린 것을 확인하고 EtOH 침전을 통해 정제 후 전체 양이 50 μl 되도록 H buffer 5 μl 와 10 unit의 *NdeI*을 혼합하여 37°C에서 2시간동안 반응을 시켰다. 절단된 DNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인한 후 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)을 가지고 정제하였다. 절단된 pET11a와 insert는 T4 DNA ligase를 사용하여 ligation 하였으며 ligation 반응 총량을 15 μl 로 하고 10X ligase buffer 1.5 μl , pET11a 2 μl , insert DNA 4 μl 씩을 넣어 15°C에서 16시간동안 ligation 반응을 진행하였다. Ligation 산물은 *E. coli* DH5 α 에 tr

ansformation 하였으며 transformation 과정은 *E. coli* DH5 α competent cell 70 μ l에 ligation 산물 7 μ l를 혼합하여 얼음에서 40분간 배양하고 42 $^{\circ}$ C에서 90초간 heat shock를 주어 다시 얼음에 2분간 배양하였다. 이에 LB broth 70 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후 ampicillin이 들어있는 LB plate에 도말하였고 colony를 따서 ampicillin이 들어 있는 LB broth에 배양하였다. Plasmid Extraction kit을 이용해 배양된 cell의 plasmid DNA를 분리하였고 이를 다시 발현용 cell인 *E. coli* BL21 (Novagen, USA) competent cell 안으로 transformation 하여 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양 후 colony를 따서 ampicillin이 들어있는 LB broth 4ml에 접종하였다. 그 후 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 진탕 배양하여 배양액의 일부를 ampicillin이 들어있는 LB broth 50 ml에 계대 배양하여 37 $^{\circ}$ C에서 진탕 배양하면서 이를 600 nm의 흡광도에서 optical density가 0.8이 되도록 배양 후 18 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하여 IPTG를 최종농도 1 mM이 되도록 첨가하였다. 이를 다시 18 $^{\circ}$ C에서 20시간동안 배양하여 단백질 발현을 유도하였고 배양된 cell은 50 ml conical tube에 옮겨 4 $^{\circ}$ C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 10 mM의 Tris-HCl (pH 8.0) 15 ml를 가지고 다시 부유시켜 4 $^{\circ}$ C에서 초음파 분쇄기를 이용해 cell을 파쇄하였다. 이를 다시 4 $^{\circ}$ C, 15,000 rpm에서 원심분리하여 상등액은 soluble 단백질을 확인하는데 이용하고 침전물은 1X SDS sample buffer (4X Tris · HCl/SDS, 20% glycerol, 4% SDS, 3.1% DTT, 0.001% bromophenol blue) 용액으로 재부유시켜 insoluble 단백질을 확인하는데 사용하였다. 발현된 단백질 양의 확인은 SDS-PAGE를 통해 시행하였다..

Ⅲ. 결과

1. Chitosanase 분비 미생물의 분리 및 동정

갑각류를 주식으로 하는 썩뱅이의 내장으로부터 chitosanase를 분비하는 2개의 활성이 뛰어난 균주를 분리하였으며 형태학적 생화학적 유전학적 방법에 의해 각각을 동정하였다. 분리된 두 균주는 colony 형태가 완전히 다르고 SEM 촬영 결과 균주의 크기들이 1.5-2.5 μm 로 보여졌다. Colony 특징과 SEM을 통해 촬영된 사진은 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다. 분리된 두 균주 모두 gram positive rod 형태로 포자를 형성하고 *B. subtilis*와 생화학 특징과 유전적 특징이 유사하였다. Fig. 4에 두 균주의 특징을 나타내었고 16S rRNA 서열 분석 결과는 *B. subtilis* 서열과 비교하여 Fig. 5에 나타내었다. 865 bp의 16S rRNA 서열 분석 결과 중 첫 번째 균주의 16S rRNA 유전자 서열은 *B. subtilis*의 16S rRNA 유전자 서열과 99.76% 일치하였고 두 번째 균주의 16S rRNA 유전자 서열은 99.88% 일치하였다. 이들 결과에서 볼 때 두 균주 모두 *B. subtilis*와 거의 일치 하지만 두 균주의 colony 형태가 완전히 다르고 운동성에서도 차이를 보였으며, 단백질 분비 패턴 또한 다른 것으로 확인되었다. 두 균주를 *B. subtilis*와 같은 종일 것으로 판단하여 *Bacillus subtilis* CH1과 *Bacillus subtilis* CH2로 명명하였다.

	Strain 1	Strain 2
Colony shape and size	Round	Irregular
Margin (edge)	Entire (smooth)	Undulate
Color	White, shiny	White, dull
Texture	Moist	Dry (or rough)

Fig. 2. Characteristics of colonies from strain 1 and strain 2.

A



B

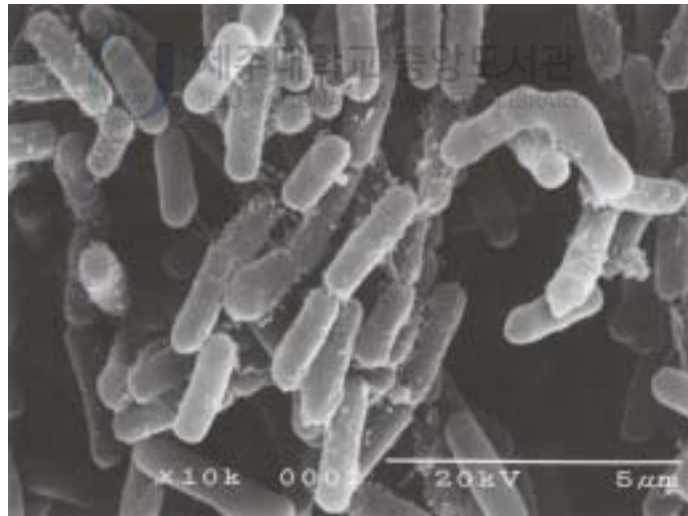


Fig. 3. Scanning electron micrographs (SEM) of strain 1 and strain 2.

a : SEM of strain 1, b : SEM of strain 2

	Strain 1	Strain 2	<i>B. subtilis</i>
Gram stain	+	+	+
Shape of cell	rod	rod	rod
Spore	+	+	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
MR	-	-	
VP	-	-	
Indole	-	-	-
O/F	O	O	O
TSI	K/A	K/A	
Motility	+	-	+

Fig. 4. Comparison of physiological and biochemical characteristics of strain 1 and 2 with *B. subtilis*.

B. subtilis
strain 1 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
strain 2 CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA

B. subtilis
strain 1 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
strain 2 GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC

B. subtilis
strain 1 AAGTGCCGTTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACT
strain 2 AAGTACCGTTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACT
**** *****

B. subtilis
strain 1 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA
strain 2 ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA

B. subtilis
strain 1 AAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGG
strain 2 AAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGG

B. subtilis
strain 1 TCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGT
strain 2 TCATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGT

B. subtilis
strain 1 GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTG
strain 2 GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTG

B. subtilis
strain 1 ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
strain 2 ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG

```

B. subtilis      TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
strain 1          TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
strain 2          TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
*****

B. subtilis      AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
strain 1          AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
strain 2          AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
*****

B. subtilis      CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCT
strain 1          CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCT
strain 2          CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCT
*****

B. subtilis      TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGG
strain 1          TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGG
strain 2          TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGG
*****

B. subtilis      TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA
strain 1          TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA
strain 2          TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA
*****

B. subtilis      CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
strain 1          CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
strain 2          CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
*****

B. subtilis      CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
strain 1          CGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAA
strain 2          CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
*****

```

Fig. 5. Multiple alignment of 16S rRNA sequences of strains 1 and 2 with *B. subtilis* 16S rRNA sequence.

2. Chitosanase 분비 미생물의 배양 조건 확립

탄소원에 따른 효과

B. subtilis CH1와 *B. subtilis* CH2의 탄소원 종류에 따른 chitosanase 활성을 알아보기 위하여 탄소원 starch, soluble chitosan, chitosan powder, chitin powder, mannitol, lactose, galactose, glycerol, fructose, maltose, glucose 및 sucrose를 각각 0.5% 되도록 탄소원이 없는 기본 배지에 첨가한 결과를 Fig. 6과 Fig. 7 나타냈으며, *B. subtilis* CH1에서는 starch, *B. subtilis* CH2에서는 fructose가 가장 좋은 활성을 나타내었다.

탄소원 농도에 따른 효과

탄소원에 따른 효과에서 가장 좋은 활성을 나타낸 *B. subtilis* CH1에서의 starch와 *B. subtilis* CH2의 fructose를 가지고 chitosanase 생산 최적 농도를 알아보기 위하여 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4% 농도로 실험한 결과를 Fig. 8, Fig. 9과 같이 나타내었다. *B. subtilis* CH1에서는 starch가 2%일 때 가장 좋은 활성을 나타냈고, *B. subtilis* CH2에서는 fructose가 4% 일 때 가장 좋은 활성을 나타내었다.

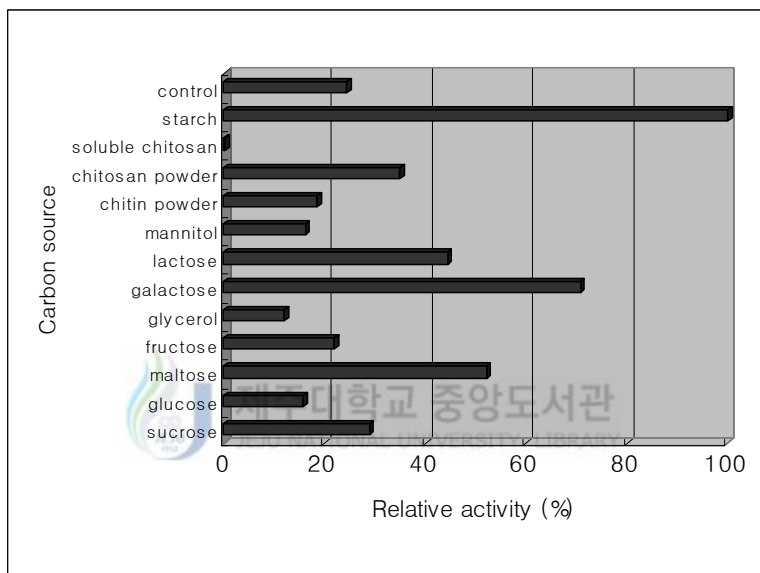


Fig. 6. Effect of carbon sources on the chitosanase production of *B. subtilis* CH1. Incubation at 30°C for 10 hours. The basal medium alone was used in the control.

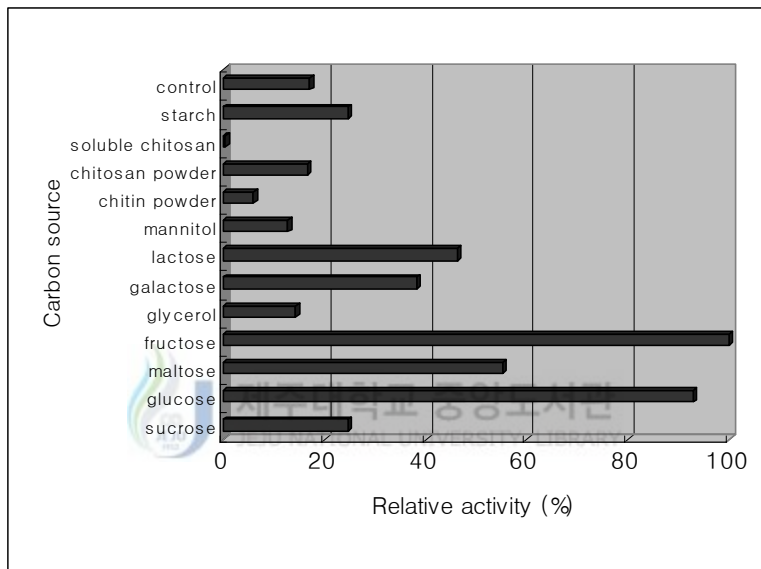


Fig. 7. Effect of carbon sources on the chitosanase production of *B. subtilis* CH2. Incubation at 30°C for 10 hours. The basal medium alone was used in the control.

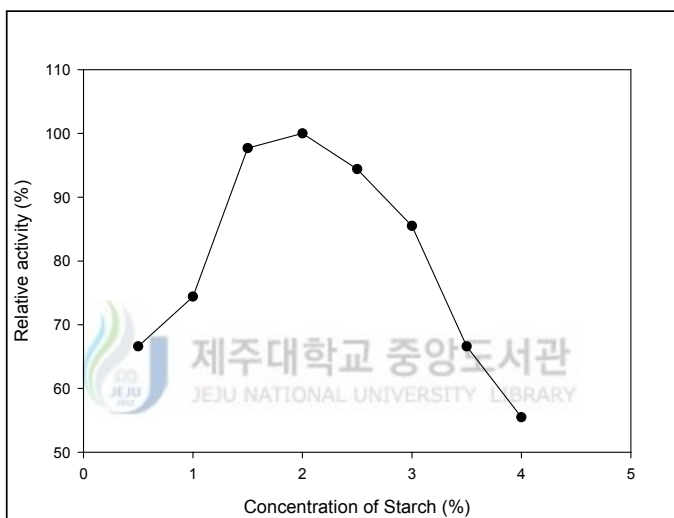


Fig. 8. Effect of starch concentration on the chitosanase production of *B. subtilis* CH1. Incubation at 30°C for 10 hours.

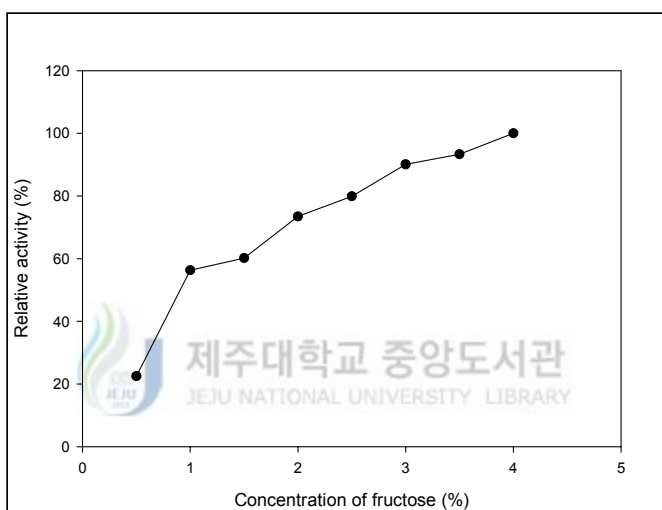


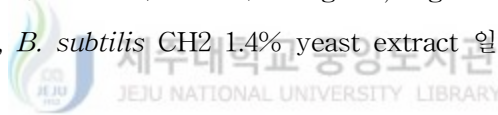
Fig. 9. Effect of fructose concentration on the chitosanase production of *B. subtilis* CH2. Incubation at 30°C for 10 hours.

질소원에 따른 효과

B. subtilis CH1와 *B. subtilis* CH2의 질소원 종류에 따른 chitosanase 활성을 알아보기 위하여 질소원 yeast extract, pepton, trypton, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄를 각각 0.3% 되도록 질소원이 없는 기본 배지에 첨가한 결과를 Fig. 10과 Fig. 11 나타냈으며, *B. subtilis* CH1, *B. subtilis* CH2 둘 다 yeast extract에서 가장 좋은 활성을 나타내었다.

질소원 농도에 따른 효과

질소원에 따른 효과에서 가장 좋은 활성을 나타낸 *B. subtilis* CH1과 *B. subtilis* CH2의 yeast extract를 가지고 chitosanase 생산 최적 농도를 알아보기 위하여 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4% 농도로 실험한 결과를 Fig. 12, Fig. 13과 같이 나타냈다. *B. subtilis* CH1에서는 1.0%, *B. subtilis* CH2 1.4% yeast extract 일 때 가장 좋은 활성을 나타내었다.



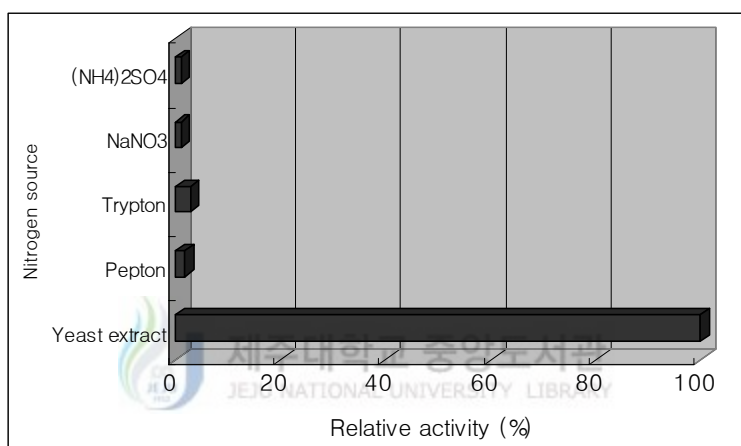


Fig. 10. Effect of nitrogen source on the chitosanase production of *B. subtilis* CH1. Incubation at 30°C for 10 hours.

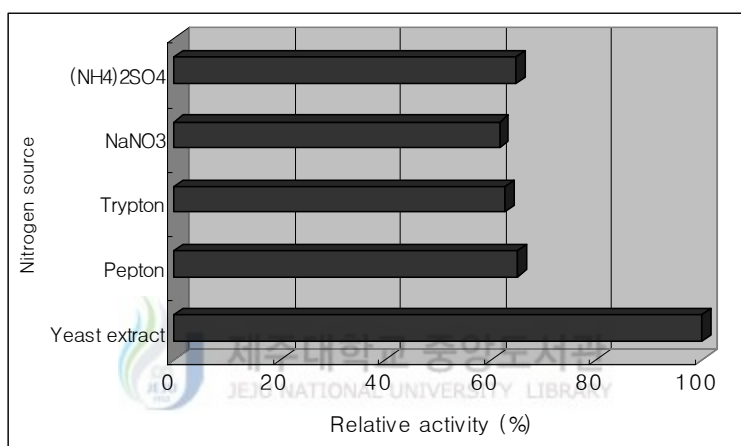


Fig. 11. Effect of nitrogen source on the chitosanase production of *B. subtilis* CH2. Incubation at 30°C for 10 hours.

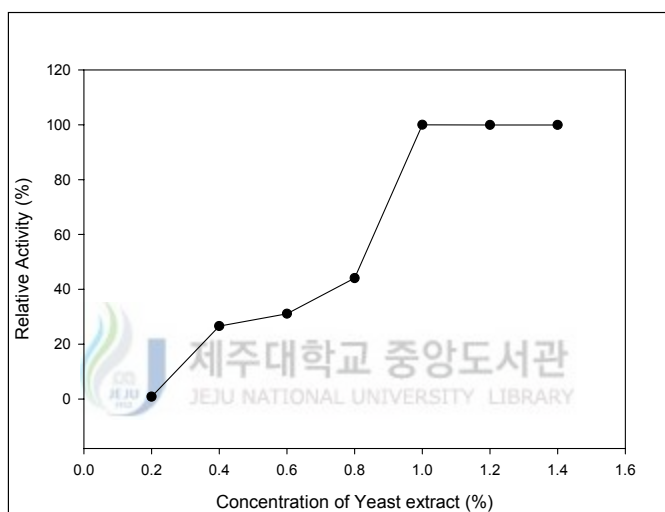


Fig. 12. Effect of yeast extract concentration on the chitosanase production of *B. subtilis* CH1. Incubation at 30°C for 10 hours.

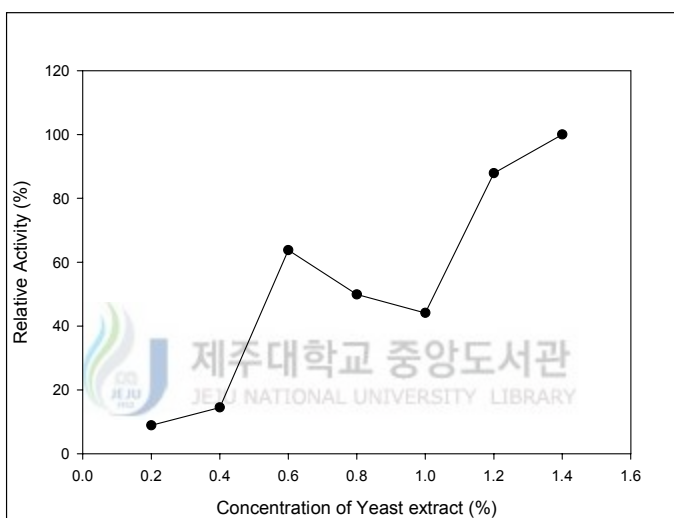


Fig. 13. Effect of yeast extract concentration on the chitosanase production of *B. subtilis* CH2. Incubation at 30°C for 10 hours.

3. Chitosanase의 정제

두 균주의 배양액으로부터 단백질을 농축하여 탈염시킨 후 gel permeation chromatography를 이용하여 fraction 별로 단백질을 분리하였고, 각각의 fraction 간의 SDS-PAGE와 활성측정을 통해 chitosanase를 확인하였다. 확인된 chitosanase 분자량은 둘 다 31 kDa으로 나타났다. Fig. 14에 각 균주로부터 정제된 chitosanase의 SDS-PAGE 결과를 나타내었다.

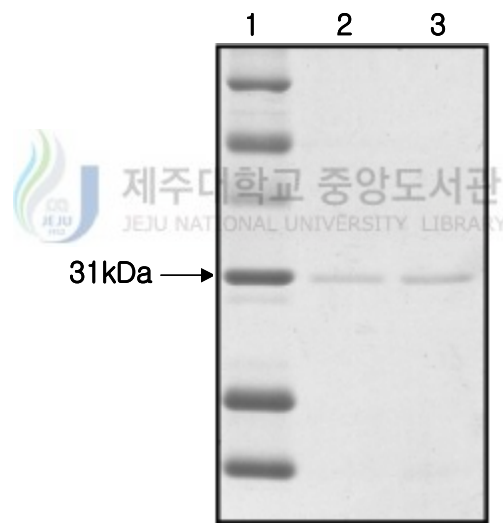
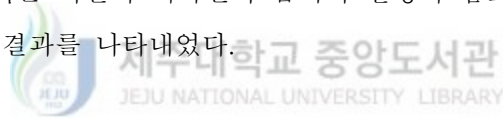


Fig. 14. Gel electrophoresis analysis of purified chitosanase from *B. subtilis* CH1 and CH2 by gel permeation chromatography. lane 1 : marker, lane 2 : chitosanase from *B. subtilis* CH1, lane 3 : chitosanase from *B. subtilis* CH2.

4. 정제된 효소의 특성

최적온도와 열 안정성

정제된 chitosanase의 최적 반응 온도를 확인하기 위해 1% soluble chitosan과 chitosanase를 희석하여 30℃에서 80℃까지 5℃씩 간격으로 10분 동안 반응 후 활성을 측정 한 결과 *B. subtilis* CH1과 *B. subtilis* CH2 chitosanase 모두 최적 반응 온도가 60℃였고 70℃까지 활성을 나타내었다. 최적 반응 온도에 대한 결과는 Fig. 15, Fig. 16에 나타내었다. 각각의 chitosanase에 대한 열 안정성을 알아보기 위해 효소를 온도별로 10분씩 놓아둔 후 그 활성을 측정한 결과 *B. subtilis* CH1과 *B. subtilis* CH2 chitosanase 둘 다 40℃에서는 계속적으로 안정하였고 50℃에서는 시간이 지남에 따라 조금씩 감소하였으며 60℃에서는 시간이 지나면서 급격히 활성이 감소하였다. Fig. 17, Fig. 18에 열 안정성에 대한 결과를 나타내었다.



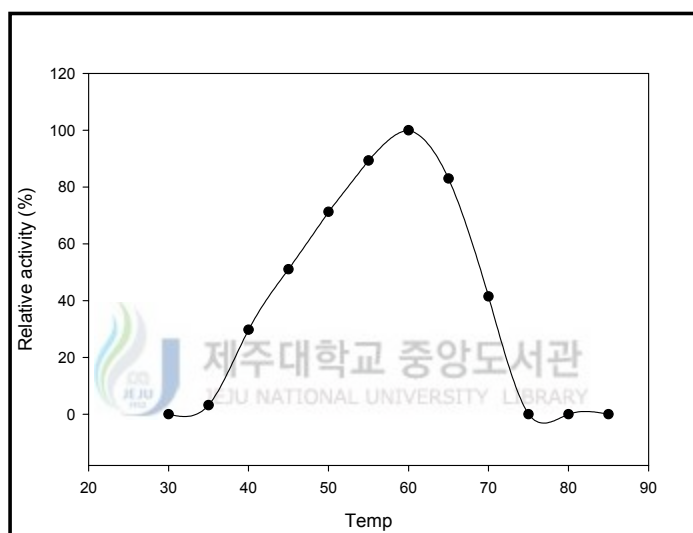


Fig. 15. Effect of temperature on the activity of chitosanase obtained from *B. subtilis* CH1.

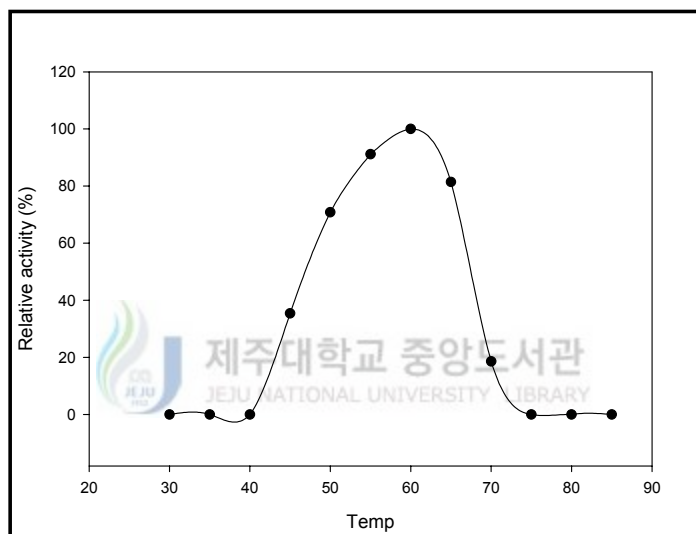


Fig. 16. Effect of temperature on the activity of chitosanase obtained from *B. subtilis* CH2.

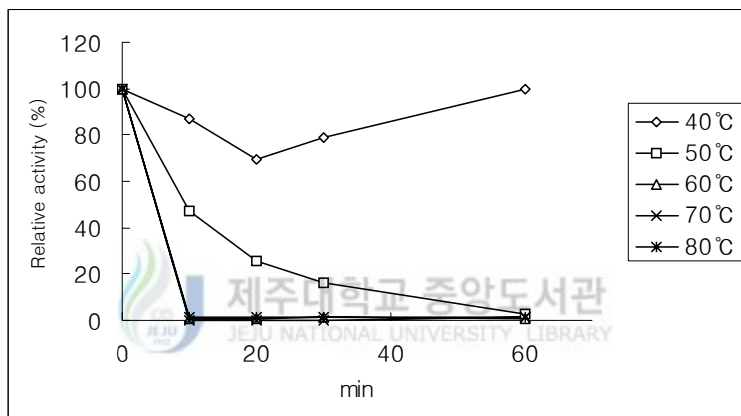


Fig. 17. Thermal stability of chitosanase obtained from *B. subtilis* CH1 at different incubation temperatures.

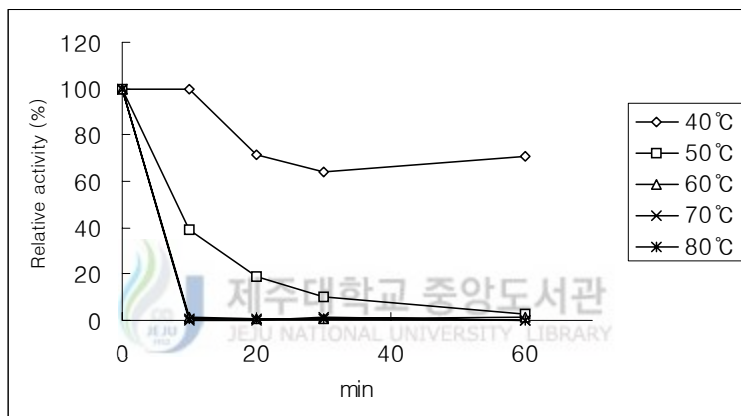


Fig. 18. Thermal stability of chitosanase obtained from *B. subtilis* CH2 at different incubation temperatures.

5. Chitosanase 아미노산 서열 분석

B. subtilis CH1과 *B. subtilis* CH2의 정제된 chitosanase를 가지고 PVDF blotting 후 15개의 N-terminal 아미노산 서열을 분석한 결과 둘 다 AGLNKDQKRRAEQLT로 나타났고 이 서열은 이들 chitosanase의 유전자 서열을 분석하는데 이용되어졌다.

6. Chitosanase 염기 서열 분석

LA PCR을 통해 확인된 *B. subtilis* CH1의 chitosanase coding 유전자 서열은 834 bp (277 amino acids), mature sequence는 729 bp (242 amino acids) 였고 Fig. 19에 나타내었다. *B. subtilis* CH2의 chitosanase coding 유전자 서열은 816 bp (272 amino acids), mature sequence는 729 bp (242 amino acids) 였고 Fig. 20에 나타내었다.

B. subtilis 표준 균주의 chitosanase 유전자 서열은 *B. subtilis* CH1의 chitosanase coding 유전자 서열과 두개의 염기만이 차이를 보였고 이를 아미노산 서열로 바꾸었을 때 완전히 일치하였다. *B. subtilis* CH2의 chitosanase 유전자 서열은 32개의 차이를 보였고 이를 아미노산 서열로 바꾸었을 때 *B. subtilis*의 아미노산 서열과 비교하여 signal sequence에서만 6개의 아미노산이 제거된 형태를 보였다. *B. subtilis* CH1과 *B. subtilis* CH2의 chitosanase 서열을 비교 분석한 결과 signal sequence에서는 20개의 염기 차이를 보였고, 6개의 아미노산 차이를 보였다. Mature sequence에서는 12개의 염기 차이를 보였으나 아미노산 서열은 완전히 일치하는 결과를 보였다. 이를 Fig. 21와 Fig. 22에 나타내었다.

ATGAAAATCAGTATGCAAAAAGCAGATTTTTGGAAAAAGCAGCGATCTCATTACTTGTT - 60
 M K I S M Q K A D F W K K A A I S L L V
TTCACCATGTTTTTACCCTGATGATGAGCGAAACGGTTTTTGCCGCAGGACTGAATAAA - 120
 F T M F F T L M M S E T V F A A G L N K
 GATCAAAAGCGCCGGCGGAACAGCTGACAAGTATCTTTGAAACGGCACACGGAGATC - 180
 D Q K R R A E Q L T S I F E N G T T E I
 CAATATGGATATGTAGAGCGATTGGATGACGGGCGAGGCTATACATGCGGACGGGACGGC - 240
 Q Y G Y V E R L D D G R G Y T C G R A G
 TTTACAACGGCTACCGGGGATGCATTGGAAGTAGTGAAGTATACGCAAAGGCAGTCCG - 300
 F T T A T G D A L E V V E V Y T K A V P
 AATAACAAACTGAAAAAGTATCTGCCTGAATTGCGCGTCTGGCCAAGGAAGAAAGCGAT - 360
 N N K L K K Y L P E L R R L A K E E S D
 GATACAAGCAATCTCAAGGGATTGCTTCTGCCTGGAAGTCGCTTGCAATGATAAGGAA - 420
 D T S N L K G F A S A W K S L A N D K E
 TTTGCGCGCGCTCAAGACAAAGTAATGACCATTTGTATTATCAGCCTGCCATGAAACGA - 480
 F R A A Q D K V N D H L Y Y Q P A M K R
 TCGGATAATGCCGGACTAAAAACAGCATTGGCAAGAGCTGTGATGTACGATACGGTTATT - 540
 S D N A G L K T A L A R A V M Y D T V I
 CAGCATGGCGATGGTGTATGACCCTGACTCTTTTTATGCCTTGATTAACGTACGAACAAA - 600
 Q H G D G D D P D S F Y A L I K R T N K
 AAAGCGGGCGGATCACCTAAAGACGGAATAGACGAGAAGAAGTGGTTGAATAAATTCTTG - 660
 K A G G S P K D G I D E K K W L N K F L
 GACGTACGCTATGACGATCTGATGAATCCGGCCAATCATGACACCCGTGACGAATGGAGA - 720
 D V R Y D D L M N P A N H D T R D E W R
 GAATCAGTTGCCCGTGTGGACGTGCTTCGCTCTATCGCCAAGGAGAACAACCTATAATCTA - 780
 E S V A R V D V L R S I A K E N N Y N L
 AACGGACCGATTGTTTCGTTCAAACGAGTACGGTAATTTTGTAAATCAAATAA - 834
 N G P I H V R S N E Y G N F V I K *

Fig. 19. Nucleotide sequence of *B. subtilis* CH1 chitosanase. The signal sequence is underlined, the active site residues are boxed and the asterisk shows the stop codon.

ATGAAAATCAGTATGCAAAAAGCAGCGATCTCATTACTTGTTTTCACTATGTTTTTACC - 60
 M K I S M Q K A A I S L L V F T M F F T
CTGATGATGAGTGAAACGGTTTTTGCGGCGGGACTGAATAAAGATCAAAAACGCCGGCG - 120
 L M M S E T V F A A G L N K D Q K R R A
 GAACAGCTGACAAGTATCTTTGAAACGGCACAACGGAGATCCAATATGGATATGTAGAG - 180
 E Q L T S I F E N G T T E I Q Y G Y V E
 CGATTGGATGACGGGGCAGGTTATACATGCGGACGGCAGGCTTTACAACGGCTACCGGG - 240
 R L D D G R G Y T C G R A G F T T A T G
 GATGCATTGGAAGTAGTGAAGTATACACAAAGGCAGTTCGAATAACAAACTGAAAAAG - 300
 D A L E V V E V Y T K A V P N N K L K K
 TATCTGCCTGAATTGCGCCGCTGCGCAAGGAAGAAAGCGATGATACAAGCAATCTCAAG - 360
 Y L P E L R R L A K E E S D D T S N L K
 GGATTGCGTTCTGCCTGGAAGTCGCTTGCAAATGATAAGGAATTTGCGCCGCTCAAGAC - 420
 G F A S A W K S L A N D K E F R A A Q D
 AAAGTAAATGACCATTTGTATTATCAGCCTGCTATGAAACGATCGGACAATGCCGGACTA - 480
 K V N D H L Y Y Q P A M K R S D N A G L
 AAAACAGCATTGGCTAGAGCTGTGATGTACGATACGGTTATTCAACATGGCGATGGTGAT - 540
 K T A L A R A V M Y D T V I Q H G D G D
 GACCCTGACTCTTTTTATGCCTTGATTAACGTACGAACAAAAAAGCGGGCGGATCACCT - 600
 D P D S F Y A L I K R T N K K A G G S P
 AAAGACGGAATAGACGAGAAGAAGTGGTTAAATAAATTCTTGGACGTACGCTATGACGAT - 660
 K D G I D E K K W L N K F L D V R Y D D
 CTGATGAATCCGGCCAATCATGACACCCGTGACGAATGGAGAGAATCAGTTGCCCGTGTG - 720
 L M N P A N H D T R D E W R E S V A R V
 GACGTGCTTCGATCTATCGCCAAGGAGAACAACACTACAATTTAAACGGACCGATTTCATGTT - 780
 D V L R S I A K E N N Y N L N G P I H V
 CGTTCAAACGAGTACGGTAATTTTGTAAATCAATAA - 816
 R S N E Y G N F V I K *

Fig. 20. Nucleotide sequence of *B. subtilis* CH2 chitosanase. The signal sequence is underlined, the active site residues are boxed and the asterisk shows the stop codon.

Bacillus subtilis CH1 ATGAAAATCAGTATGCAAAAAGCAGATTTTTGGAAAAAGCAGCGATCTCATTACTTGT
Bacillus subtilis CH2 ATGAAAATCAGTATGCAAAAAGCAG-----CGATCTCATTACTTGT

Bacillus subtilis CH1 TTCACCATGTTTTTACCCTGATGATGAGCGAAACGGTTTTTTCGGCAGGACTGAATAAA
Bacillus subtilis CH2 TTCACTATGTTTTTACCCTGATGATGAGTCAAACGGTTTTTTCGGCAGGACTGAATAAA

Bacillus subtilis CH1 GATCAAAAGCGCCGGGCGGAACAGCTGACAAGTATCTTTGAAAACGGCACAACGGAGATC
Bacillus subtilis CH2 GATCAAAAACCGCCGGGCGGAACAGCTGACAAGTATCTTTGAAAACGGCACAACGGAGATC

Bacillus subtilis CH1 CAATATGGATATGTAGAGCGATTGGATGACGGGCGAGGCTATACATGCGGACGGGCAGGC
Bacillus subtilis CH2 CAATATGGATATGTAGAGCGATTGGATGACGGGCGAGGTTATACATGCGGACGGGCAGGC

Bacillus subtilis CH1 TTTACAACGGCTACCGGGGATGCATTGGAAGTAGTGGAAGTATACGCAAAGGCAGTTCCG
Bacillus subtilis CH2 TTTACAACGGCTACCGGGGATGCATTGGAAGTAGTGGAAGTATACCAAAGGCAGTTCCG

Bacillus subtilis CH1 AATAACAACTGAAAAAGTATCTGCCTGAATTGCGCCGTCTGGCCAAGGAAGAAAGCGAT
Bacillus subtilis CH2 AATAACAACTGAAAAAGTATCTGCCTGAATTGCGCCGTCTGGCCAAGGAAGAAAGCGAT

Bacillus subtilis CH1 GATACAAGCAATCTCAAGGGATTGCTTCTGCCTGGAAGTCGCTTGCAAATGATAAGGAA

Bacillus subtilis CH2 GATACAAGCAATCTCAAGGGATTGCTTCTGCCTGGAAGTCGCTTGCAAATGATAAGGAA

Bacillus subtilis CH1 TTTGCGCGCGCTCAAGACAAAGTAAATGACCATTTGTATTATCAGCCTGCCATGAAACGA

Bacillus subtilis CH2 TTTGCGCGCGCTCAAGACAAAGTAAATGACCATTTGTATTATCAGCCTGCTATGAAACGA

***** *****

Bacillus subtilis CH1 TCGGATAATGCCGGACTAAAACAGCATTGGCAAGAGCTGTGATGTACGATACGGTTATT

Bacillus subtilis CH2 TCGGACAATGCCGGACTAAAACAGCATTGGCTAGAGCTGTGATGTACGATACGGTTATT

***** *****

Bacillus subtilis CH1 CAGCATGGCGATGGTGATGACCCTGACTCTTTTTATGCCTTGATTAACGTACGAACAAA

Bacillus subtilis CH2 CAACATGGCGATGGTGATGACCCTGACTCTTTTTATGCCTTGATTAACGTACGAACAAA

** *****

Bacillus subtilis CH1 AAAGCGGGCGGATCACCTAAAGACGGAATAGACGAGAAGAAGTGGTTGAATAAATCTTG

Bacillus subtilis CH2 AAAGCGGGCGGATCACCTAAAGACGGAATAGACGAGAAGAAGTGGTTAAATAAATCTTG

***** *****

Bacillus subtilis CH1 GACGTACGCTATGACGATCTGATGAATCCGGCCAATCATGACACCCGTGACGAATGGAGA

Bacillus subtilis CH2 GACGTACGCTATGACGATCTGATGAATCCGGCCAATCATGACACCCGTGACGAATGGAGA

Bacillus subtilis CH1 GAATCAGTTGCCCGTGTGGACGTGCTTCGCTCTATCGCCAAGGAGAACAACATAATCTA
Bacillus subtilis CH2 GAATCAGTTGCCCGTGTGGACGTGCTTCGATCTATCGCCAAGGAGAACAACATAATTTA

Bacillus subtilis CH1 AACGGACCGATTTCATGTTTCGTTCAAACGAGTACGGTAATTTTGTAAATCAAATAA
Bacillus subtilis CH2 AACGGACCGATTTCATGTTTCGTTCAAACGAGTACGGTAATTTTGTAAATCAAATAA

Fig. 21. Multiple alignment of chitosanase nucleotide sequence of *B. subtilis* CH1 and *B. subtilis* CH2.



Bacillus subtilis CH1 MKISMQKADFWKAAISLLVFTMFFTLMMSETVFAAGLNKDQKRRAEQLTSIFENGTTETI
Bacillus subtilis CH2 MKISMQ-----KAAISLLVFTMFFTLMMSETVFAAGLNKDQKRRAEQLTSIFENGTTETI

Bacillus subtilis CH1 QYGYVERLDDGRGYTCGRAGFTTATGDALEVVEVYTKAVPNKLLKKYLPRLRLAKEESD
Bacillus subtilis CH2 QYGYVERLDDGRGYTCGRAGFTTATGDALEVVEVYTKAVPNKLLKKYLPRLRLAKEESD

Bacillus subtilis CH1 DTSNLKGFASAWKSLANDKEFRAAQDKVNDHLYYQPAMKRSDNAGLKTALARAVMYDTV
Bacillus subtilis CH2 DTSNLKGFASAWKSLANDKEFRAAQDKVNDHLYYQPAMKRSDNAGLKTALARAVMYDTV

Bacillus subtilis CH1 QHGDGDDPDSFYALIKRTNKKAGGSPKDGIDKQKWLNFKFLDVRYDDLMPANHDTRDEWR
Bacillus subtilis CH2 QHGDGDDPDSFYALIKRTNKKAGGSPKDGIDKQKWLNFKFLDVRYDDLMPANHDTRDEWR

Bacillus subtilis CH1 ESVARVDLRSIAKENNYNLNGPIHVRSEYGNFVIK
Bacillus subtilis CH2 ESVARVDLRSIAKENNYNLNGPIHVRSEYGNFVIK

Fig. 22. Multiple alignment of chitosanase amino acid sequence of *B. subtilis* CH1 and *B. subtilis* CH2.

7. Chitosanase coding sequence의 cloning

B. subtilis CH1, CH2로부터 분리된 genomic DNA를 가지고 chitosanase coding 영역만을 증폭하여 pBlueScript SK(-) vector에 삽입 후 *E. coli* DH5 α 안으로 transformation 하였고 white/blue screening을 통해 chitosanase 유전자가 삽입된 cell을 선택하여 배양함으로써 chitosanase coding 유전자를 확보하였고 이를 *Nde*I, *Bam*HI으로 절단 후 pET11a vector에 재조합하여 cloning함으로써 *E. coli* BL21내에서 발현을 위한 유전자를 확보하였다.

8. *E. coli* BL21을 이용한 chitosanase 발현

pET11a vector에 재조합 된 chitosanase sequence는 발현을 위해 *E. coli* BL21 cell에 transformation 되어졌다. 100 μ g/ml ampicillin 농도에서 배양된 cell은 IPTG에 의해 18 $^{\circ}$ C에서 20시간동안 induction 되어 졌고 SDS-PAGE를 통해 발현 양이 확인되어 졌으며 insoluble한 단백질과 함께 Fig. 23에 나타내었다. Data에는 나타내지 않았지만 30 $^{\circ}$ C에서 induction 시켰을 때 단백질이 insoluble 한 형태를 나타내어 활성을 나타내지 않았다.

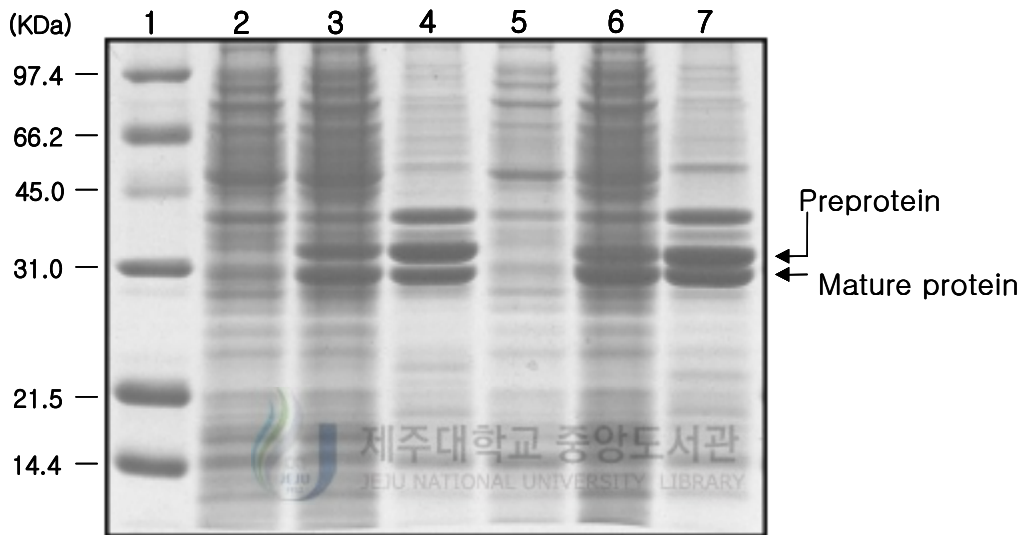


Fig. 23. SDS-PAGE analysis of chitosanase expression in *E. coli* BL21. Lane 1 : marker, lane 2-4 : cytoplasmic proteins of *B. subtilis* CH1, Lane 5-7 : cytoplasmic proteins of *B. subtilis* CH2, lane 2, 5 : before the induction, lane 3, 6 : soluble proteins, after induction, lane 4, 7 : insoluble proteins, after induction

IV. 고찰

썬빵이의 내장으로부터 세포외로 chitosanase를 분비하는 두 개의 strain을 찾았으며 gram positive 간균으로 chitosan에 대한 활성이 우수하였다. 두 균주의 16S rRNA 서열을 분석한 결과 하나의 균주는 *B. subtilis*와 99.76%, 다른 하나의 균주는 99.88% 유사성을 보였다. 이외에도 생화학 분석 결과 두 균주 모두 *B. subtilis*의 표준균주와 일치하는 결과를 보였다. 하지만 이 두 균주는 colony 형태, 운동성, 단백질 분비 (Data에는 나타내지 않았음) 면에서 차이를 보였으며 두 균주의 chitosanase 유전자 서열 또한 다소 차이를 보였다. 이들 결과를 토대로 두 균주를 *B. subtilis*의 새로운 균주들로 판단하여 *Bacillus subtilis* CH1과 *Bacillus subtilis* CH2로 명명하였다.

두 균주로부터 탄소원에 따른 chitosanase 생산성을 확인한 결과 *B. subtilis* CH1의 경우 starch에서 높은 성장률과 함께 가장 높은 활성을 나타내었고, *B. subtilis* CH2의 경우는 fructose에서 높은 성장률과 활성을 나타내었다. 그 외에도 *B. subtilis* CH1에서는 galactose, maltose, lactose, chitosan powder등에서 유도되어지는 것을 볼 수 있었고 *B. subtilis* CH2에서는 glucose, maltose, lactose, galactose 등에서 유도되어지는 것을 확인할 수 있었다. Data에서는 보여지지 않았지만 glucosamine의 경우 두 균주 모두에서 성장률과 활성이 아주 높았지만 실제 사용되어지기에는 경제적 어려움이 있는 바 대상에서 제외하였다. 이들 결과들을 종합해 볼 때 분리된 두 균주에서 탄소원에 따른 chitosanase 생산은 대부분의 chitosanase 생산균주들에서 chitosan에 의해 높게 유도되어지는 것과는 달리 *B. subtilis* CH1에서만 chitosan powder에 의해 낮은 비율로 유도되었고 오히려 다른 탄소원들에서 높게 유도되어지는 것을 볼 수 있었다. 이는 이 두 균주에서 chitosanase 생산이 다른 탄소원들에 의해 유도되어지는 것이 아닌가 생각되며 *Bacillus subtilis* strain들은 chitosan을 분해하기 위해 이를 생산하는 것이 아니고 다른 무언가를 분해하기 위해 생산하는 것이 아닌가 생각된다. Luis *et al.* (2000)의 논

문에서는 *Bacillus subtilis* 168의 chitosanase 경우 배지내에 1 mg/ml 이상의 chitosan 을 첨가 시켰을 때 chitosanase의 생산이 저해된다고 보고하고 있다. 질소원에 따른 chitosanase 생산성을 확인한 결과에서는 두 균주 모두 yeast extract에서 균주의 성장과 chitosan에 대한 활성이 높게 나타나 chitosanase 생산성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

B. subtilis CH1의 chitosanase mature sequence는 *B. subtilis* 168의 chitosanase sequence와 한 개의 염기 차이를 보였고 *B. subtilis* CH2의 chitosanase mature sequence는 *B. subtilis*의 것과 11개의 염기 차이를 보였다. 하지만 이를 아미노산 서열로 전환했을 때 두 균주의 chitosanase 아미노산 서열 둘 다 *B. subtilis*의 아미노산 서열과 완전히 일치하는 결과를 보였다. Signal sequence를 비교했을 때 첫 번째 균주의 chitosanase signal sequence는 *B. subtilis*가 갖는 신호서열과 완전히 일치하였지만 두 번째 균주의 chitosanase signal sequence는 *B. subtilis*의 신호서열에서 18개의 염기가 제거되고 2개의 염기가 치환된 형태를 보였다. 이들의 상관관계를 밝혔을 때 유전자와 아미노산과의 관계나 유전적 진화 관계를 밝히는데 기여할 수 있을 것이라 생각된다.

B. subtilis CH1과 *B. subtilis* CH2에서 정제된 chitosanase의 최적 활성온도는 60°C였고 70°C까지 활성이 나타났다. 열 안정성을 알아보기 위한 실험에서 40°C에서는 계속 안정적이었으나 50°C에서는 점차 감소를 보였으며 60°C 이후부터는 시간이 지남에 따라 급격하게 활성이 감소하였다. 이는 Luis *et al.* (2000)의 *Bacillus subtilis* 168의 chitosanase에 대한 연구와 일치하는 결과이다.

pET vector system (*E. coli* BL21)을 이용하여 단백질 과발현 실험이 이루어졌으며 induction 시 30°C에서는 대부분의 chitosanase가 insoluble 한 형태로 나타났고 18°C로 온도를 낮추었을 때 soluble한 chitosanase를 많이 얻어낼 수 있었다. Abdel *et al.* (2001)의 연구에서 chitinase의 발현 시 37, 30, 25°C에서 induction 시 발현된 단백질이 insoluble 하였고 18°C에서 induction 시에 soluble한 결과가 나타났다고 보고되어져 있다.

V. 요약

키토산은 D-glucosamine이 β -1,4 결합으로 연결된 고분자 다당류로 게, 새우등의 갑각류 껍질에서 주로 발견되고 있다. 키토산은 면역력 강화, 합암작용, 항균작용 및 항콜레스테롤 작용 등 생리활성 기능에 좋은 효과를 나타낸다고 보고되어짐으로써 키토산에 대한 부가가치 산업이 발달하고 있다. 키토산은 고분자로 먹어도 생체 내에 흡수되지 않아 저분자나 올리고당으로의 분해가 필요하다. 그래서 본 연구에서는 키토산을 분해할 수 있는 효소를 찾아 개발함으로써 산업적으로 이용 가능케 하고자 하였다.

본 연구에서는 쏘뱅이의 내장으로부터 chitosanase를 분리하는 두 개의 균주를 찾았으며 형태학적, 생화학적 및 유전학적 분석을 통해 동정을 시행하였다. 그 결과 두 균주 모두 *Bacillus subtilis*와 분류학적으로 유사하였고 16S rRNA 염기서열 또한 두 균주 모두 99% 이상 일치하였다. 하지만 두 균주는 colony 형태, 운동성, 단백질 분비 패턴, chitosanase 염기서열 등에서 차이를 보였고 *B. subtilis*의 서로 다른 strain으로 생각하여 *B. subtilis* CH1, *B. subtilis* CH2로 분류하였다.

Chitosanase의 순수 정제를 위해 먼저 이들 균주들을 LB broth에 배양하였으며 배양 상등액을 조효소액으로 사용하여 90% ammonium sulfate로 단백질을 침전시켰다. 이를 다시 탈염 시킨 후 gel permeation chromatography를 통해 fraction 별로 나누었으며, 각각의 fraction 별로 SDS-PAGE와 활성측정을 시행하여 chitosanase 단백질을 확인하였고 분자량은 둘 다 31 kDa으로 나타났다. 정제된 chitosanase들을 가지고 최적 반응 온도를 확인하였고 최적 반응 온도는 둘 다 60°C로 나타났다. 또한 정제된 chitosanase의 N-말단 아미노산 서열분석을 하였으며 이 결과를 토대로 LA PCR에 사용할 primer를 제작하였다. LA PCR을 통해 chitosanase의 유전자 서열 분석이 이루어졌고, 확인된 *B. subtilis* CH1의 chitosanase coding 염기서열은 834 bp로 나타났으며, *B. subtilis* CH2의 chitosanase coding 염기서열은 729 bp로 나타났다. 특이한 점은 두 균주의 chitosanase mature

염기서열이 12 bp의 차이를 보였는데 이를 아미노산 서열로 바꾸었을 때 전혀 차이를 보이지 않았다. 두 chitosanase의 신호서열도 염기서열에서는 20 bp의 차이를 보였지만 아미노산 서열로 바꾸었을 때 6개의 연속된 아미노산 서열만이 제거된 형태를 보였다.

분석된 유전자의 coding sequence를 발현 vector인 pET11a에 재조합하였고, 이를 *E. coli* BL21 내로 형질전환하여 isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 가지고 과발현을 유도하였다. 30℃에서 발현을 유도시켰을 때는 생산되는 chitosanase가 insoluble한 형태를 보여 활성을 나타내지 않았고 18℃에서 발현을 유도시켰을 때는 soluble한 chitosanase도 많이 얻어낼 수 있었다.



VI. 참고문헌

Abdel R. D., A. S. Charles, S. Lynn and M. V. Joseph (2001). *Leishmania donovani*: Expression and Characterization of *Escherichia coli*-Expressed Recombinant Chitinase LdCHT1. *Exp. Parasitol.*, 99, 220-225.

Boucher, I., A. Dupuy, P. Vidal, W. A. Neugebauer and R. Brzezinski (1992). Purification and characterisation of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 188-193.

Boucher, I., A. Dupuy, P. Vidal, W. A. Neugebauer and R. Brzezinski (1992). Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 188-193.

Davis, B. and D. E. Eveleigh (1984). Chitosanases: occurrence, production and immobilization. In *Chitin, Chitosan and Related Enzymes*, ed. J. P. Zikakis. Academic Press, FL, pp. 161-179.

Gerjardt. P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krueger and G. B. Phillips (1981). *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, DC. 26-28.

Horowitz, S.T., S. Roseman, and H.T. Blumenthal (1957). The preparation of glucosamine oligosaccharides I Separation. *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 5046-5049.

Izume, M. and A. Ohtakara (1987). Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1189-1191.

Jean F. M. (1980). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria second edition*. Williams & Wilkins

Jeon, Y. J, and S. K. Kim (1997). Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effects of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor, *J. chitin and chitosan*, 2, 60-78.

Luis A. R., P. victor, M. P. Mercedes and P. M. Rafael (2000). The *Bacillus subtilis* 168 csn gene encodes a chitosanase with similar properties to a *Streptomyces* enzyme. *Microbiology*, 146, 2929-2936.



No H. K. and Meyers S. P. (1995). Preparation and Characterization of chitin and chitosan-A Review. *J. aquat. food prod. technol.*, 4(2), 27-52.

Okajima, S., 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, 617-620.

Park, I., Y. Lee, M. Kim and S. Kim (2002). Effect of surface treatment with chito-oligosaccharide on shelf-life of baguette. *J. chitin and chitosan*, 7, 214-218.

Rondle, C. J. M. & W. T. J. Morgan (1995). The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochem. J.*, 61, 586-589.

Sakai, K., R. Katsumi, A. Isobe and F. Nanjo (1991). Purification and hydrolytic action of a chitosanase from *Nocardia orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1097, 65-72.

Seino, H., K. Tsukuda and Y. Shimasue (1991). Properties and action pattern of a chitosanase from *Bacillus* sp. PI-7S. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 2421-2423.

Somashekar, D. and R. Joseph (1996). Chitosanases-Properties and applications: A review. *Bioresour. Technol.*, 55, 35-45.

Suzuki, K., T. Mikami, Y. Okawa, A. Tokoro, S. Suzuki, and M. Suzuki (1986). Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose, *Carbohydr. Res.*, 151, 403-408.

Suzuki, S., M. Suzuki, T. Tokami, T. Matsumoto, T. Watanabe and M. Kobayashi (1992). Host defense mechanism of hexa-N-acetylchitohexaose, in chitin derivatives in life science, Tokura, S. and I. Azuma, ed., *Japanese Society for Chitin and Chitosan*, Japan.

Suzuki, S., Y. Okawa, K. Hashimoto, Y. Okura and M. Suzuki (1982). Immunoadjuvant effect of chitin and chitosan, 210-212, In Hirano, S. and Tokura, S. (ed), Chitin and chitosan, *The Japanese Society of Chitin and Chitosan*, Tottori University, Tottori.

Tokoro, A., M. Kobayayashi, 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.

Wang, G. H. (1992). Inhibition and inactivation of five species of food-borne pathogens by chitosan. *J. Food Prot.*, 55, 916-919.

Yoon, H. G., H. Y. Kim, Y. H. Lim, H. K. Kim, D. H. Shin, B. S. Hong and H. Y. Cho (2000). Thermostable chitosanase from *Bacillus* sp. Strain CK4: Cloning and expression of the gene characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3727-3734.



감사의 글

부족함이 많은 저를 때로는 아버지처럼 때로는 친형처럼 돌봐주신 이제희 선생님 정말 감사 드립니다. 그리고 2년 간의 학위과정을 마칠 때까지 많은 관심을 보여주시고 힘이 되어 주셨던 송춘복 선생님, 허문수 선생님, 여인규 선생님, 전유진 선생님 그리고 박근태 선생님께 감사 드립니다.

제가 이 길에 들어설 수 있는 계기를 마련해주시고 항상 따스하게 대해 주셨던 김재우 선생님, 유승민 선생님과 임원일 선생님 정말 고맙습니다. 언제나 좋은 충고를 해주시고 건강을 신경 써 주신 도형이 형, 경일이 형 저도 형들처럼 좋은 선배가 되도록 노력할게요. 그리고 옆에만 있어도 든든한 우리 동기들 수진이, 범석이, 용욱이 형 다들 고맙습니다. 지금은 여기 없지만 정신적 동반자라고 할 수 있는 윤석이 형, 진영이 형과 바쁜 와중에도 실험을 도와주고 신경 써 준 철영이 형 그리고 옆에서 힘이 되어 준 영건이, 문휴, 정환이, 창범이 형에게 감사를 드립니다.

부족한 저를 믿고 힘이 되어 준 우리 분자유전학 실험실 식구들 현실이, 영미, Prashani, Helani, 봉룡이, 경임이, 호진이, 형건이, 상봉이, 영주, 은영이, 정아, 강록이 정말 고맙고 잘해봅시다.

마지막으로 저를 돌봐주시고 바른길로 이끌어주신 부모님께 진심으로 감사를 드립니다.