

최 종
연구보고서

Chitinase와 chitin deacetylase를 이용한 항미생물성
키틴·키토올리고당의 생산 및 농업적 이용
(Agricultural application of antimicrobial chitin
derivatives produced by chitinase and chitin
deacetylase)

순천대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Chitinase와 chitin deacetylase를 이용한 항미생물성 키틴-키토 올리고당의 생산 및 농업적 이용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007 년 5 월 일

주관연구기관명 : 순천대학교
총괄연구책임자 : 김 훈
세부연구책임자 : 박 서 기
연 구 원 : T. selvaraj
연 구 원 : N.D.Phuong
연 구 원 : 권 은 주
연 구 원 : 정 유 진
연 구 원 : 김 유 정
연 구 원 : 주 정 문
연 구 원 : 신 관 섭
연 구 원 : 안 형 규
연 구 원 : 왕 지 훈
연 구 원 : 서 구 원
연 구 원 : 홍 여 진
연 구 원 : 김 성 겸
연 구 원 : 정 금 식
연 구 원 : 김 경 수
연 구 원 : 김 명 철
연 구 원 : 서 중 찬
연 구 원 : 조 경 진
연 구 원 : 진 행 나
연 구 원 : 김 수 현
연 구 원 : 장 명 호

요 약 문

I. 제 목

Chitinase와 chitin deacetylase를 이용한 항미생물성 키틴·키토올리고당의 생산 및 농업적 이용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

Chitinase는 키틴을 분해하여 인간에 유용한 천연물질을 만들거나 식물병 방제에 활용할 수 있는 효소로서 실제로 이용되기 위해서는 자연상태에서 분리된 효소보다 더 활성이 높고, 다양한 조건에서 작용할 수 있는 chitinase가 필요하다. 이러한 효소는 유전자의 변형에 의해서 얻어질 수 있다. cellulase나 xylanase의 경우에는 유전자 변형에 의해서 여러 특성을 지닌 효소를 개발하려는 연구가 많이 수행되었으나, chitinase에서는 아직 수행되지 않았기 때문에 이 연구는 활용 측면뿐만 아니라 기술적 측면에서도 아주 필요하다.

키틴의 아세틸기를 제거함으로써 키토산이 만들어지는데, 현재 이용되고 있는 키토산의 대부분은 알칼리 처리에 의해서 만들어지고 있고, 키토올리고당은 chitosanase를 이용한 키토산의 분해에 의해서 얻으려는 연구가 많이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 키틴-->키토산 -->키토올리고당 시스템이 아니라 키틴-->키틴올리고당-->키토올리고당 시스템을 이용하려고 한다. 즉 chitinase를 이용하여 키틴을 키틴올리고당으로 만들고, chitin deacetylase를 이용하여 키틴올리고당을 키토올리고당으로 만들려고 한다.

키틴올리고당 혹은 키토올리고당이 인간, 가축 및 식물의 다양한 병원균과 식품의 여러 부패균들을 억제하는 것으로 보고되었지만, 모든 올리고당이 모든 병원균을 억제하는 것이 아니라 올리고당의 길이, 대상 병원균의 종류에 따라 억제정도가 각각 다르다. 따라서, 대상 병원균을 가장 잘 억제할 수 있는 올리고당의 종류, 길이 및 농도 등을 정확히 파악할 필요가 있다.

키틴은 곤충의 외골격, 게나 작은 새우와 같은 갑각류의 주요한 구조적 성분으로서, 자연계에서 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연자원이다. 따라서, 키틴은 가격이 저렴한데 키틴유도체들은 ① 의약적 (수술봉합사, 인공피부, 화상치료, 피부 및 모발보호, 화장품 보습 및 유헬제), ② 농업적 (종자도포제 및 증수제, 동물사료), ③ 생물공학적 (신섬유, 효소와 세포의 고정화제, 젤의 조제), ④ 환경공학적 (중금속의 제거제, 유기오염물질의 침전제), ⑤ 기타 향암 및 제암효과, 상처치유제 등 여러 분야에서 이용될 수 있고, 상품화된 것도 많다.

이러한 키틴유도체는 생물 혹은 효소학적인 방법에 의해서 만들어져야 한다. 특히 인간의 질병치료제나 식품의 향미생물제로 이용될 올리고당은 생물 혹은 효소학적인 방법으로 만들어져야 할 것이며, 키틴유도체를 만들 수 있는 효소(chitinase, chitin deacetylase 등) 및 균주들은 상업화가 가능하다.

농작물도 이제는 농약을 사용하지 않고 재배할 시기에 와 있다. 국내외를 막론하고 농약의 사용을 다양한 방법으로 규제하고 있다. 특히 생과일을 직접 먹게 되는 오이나 토마토 등은 더욱 그렇다. 따라서 이들에 대한 친환경적 재배법이 시급 요구되고 있다.

본 연구진은 *Chromobacterium* sp. strain C-61로부터 보고되지 않은 새로운 chitinase 유전자를 클로닝하여 유전자의 promoter, signal peptide, ChBD, chitinase active site 등의 구조 및 기능을 분석하고 (1999-2000, 학진 유전공학연구), chitinase 유전자에 cellulose-binding domain (CBD)의 첨가, site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 활성의 증가, chitinase 유전자를 *Trichoderma harzianum*에 도입, 발현을 수행하였으며 (1999-2001, 농림기술개발과제), 세균 CBD를 β -glucosidase에 붙이거나, 세균 endoglucanase의 CBD를 곰팡이 CBD로 치환 (25)하는 등 cellulase와 xylanase 유전자를 변형하여 특성 및 활성이 변화된 효소를 얻을 수 있는 실험을 수행하였다 (2000-2004, 한국과학재단 목적기초연구).

또한 토양전염성을 억제할 수 있는 다양한 키틴분해미생물을 분리, 동정 보존하고있고, 육묘용 상토에 키틴과 키틴분해미생물을 처리, 육묘기간 중 처리 미생물이 생육토록하여 포장상태에서도 토양병을 방제할 수 있는 시스템을 확립하였다 (1999-2001, 농림기술과제).

본 연구에서는 첫째, 유전자변형에 의하여 다양한 특성을 지닌 chitinase

유전자를 선발하고자 한다. 둘째, chitinase, chitin deacetylase 및 항미생물성 키틴 유도체의 대량생산 시스템을 확립하고자 하였다. 셋째, 키틴분해미생물, 키틴 및 키틴유도체를 이용한 식물병 방제 시스템을 확립하고자 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발 및 chitin deacetylase 유전자의 클로닝

- 1) 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발
- 2) chitin deacetylase 유전자의 클로닝
- 3) *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자의 도입, 발현

나. Chitinase, 키틴 및 키토올리고당을 이용한 식물병 방제효과 증진 시스템 확립

- 1) chitin deacetylase 생산균주의 선발 및 효소 특성
- 2) 키틴올리고당, 키토올리고당 및 chitinase의 항균활성과 그들의 조제
- 3) 길항세균, chitinase의 대량 생산과 식물 병 방제 효과 증진 전략

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발 및 chitin deacetylase 유전자의 클로닝

- 1) DNA shuffling 및 domain shuffling

총 5,500개의 형질전환주를 얻었으며, 활성이 있는 변이체를 일차적으로 선발하여 35 positive clone 중 9개의 우수변이체 후보를 선발하였다. 고효성 chitinase 1개 (Chi2-389), 내열성 chitinase 1개 (Chi2-33)를 얻을 수 있었으며, 내알칼리성 chitinase는 야생형과 유사하였다. 변이체 Chi2-389는 야생형 chitinase 보다 16% 정도 비활성도가 높게 나타났으며, 변이체 Ch2-33은 최적 온도가 B8-25는 50℃로 야생형과 비슷하였으나 열안정성은 야생형 보다 18% 높게 나타났다. 변이체 Ch2-33과 Ch2-389의 경우 분자량의 변화가 없는 것으로 보아 변이 효소의 내부적인 절단이나 말단들의 변형은 없는 것으로 추정된다.

ChBD 대신 CBD와 XBD를 ChBD 부위의 염기서열과 치환한 domain 치환체를 얻었다. 대부분의 효소는 세포내에 존재하였고, ChBD가 결손된 Chi48은 활성이 매우 미약하였으며, CBD가 ChBD 보다 colloidal chitin에 대한 친화력을 더 높게 반영하는 것으로 나타났다. CBD와 ChBD가 연속으로 존재할 경우, 단독으로 존재할 경우 보다 기질에 대한 친화력을 증가시켰으며, XBD는 CBD 보다 그 효과가 약하다는 것을 알 수 있었다.

2) cDNA library의 구축 및 chitin deacetylase 클론 선발

*Rhizopus microsporus var. oligosporus*로부터 0.5 ~ 2.5 kb 범위의 mRNA를 얻었다. mRNA로부터 합성된 cDNA를 ZAP expression vector에 구축하여 약 870,000개의 primary library를 확보하였다. *Rhizopus oryzae*의 chitin deacetylase 유전자를 모델로 3 부분에서 30 bp 정도의 probe를 제작하여 hybridize를 수행하였으나 positive clone을 얻지 못하였다. Chitin deacetylase 항체에 교잡된 cDNA plaque들을 선발한 결과 총 25개의 positive plaque를 얻었다. 이 중 chitin deacetylase를 생산하는 2개의 plaque를 선발하였다. 이들 plaque를 *E. coli* XL0LR 내로 도입한 결과, chitin deacetylase 활성은 배양여액에서는 검출되지 않고, periplasm과 cytoplasm에서만 검출되었다.

활성이 높은 RCDA-1에 존재하는 cDNA는 1,308 bp의 ORF가 존재하였으며, 이는 435개 아미노산으로된 단백질을 코딩한다. 예상되는 단백질의 분자량은 48,000 Da이었으며, 활성염색에서 분석된 분자량 60 kDa와

비교할 때 glycoprotein으로 판단된다. 다른 곰팡이의 chitin deacetylase 단백질과 69% 이하의 유사성을 나타내었다. 이 효소 단백질의 중간 지역에 보존된 아미노산 서열을 나타냈다.

3) *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자 도입 및 발현

Chitin deacetylase의 *Bacillus* cloning에 pWB705 벡터를 사용하였다. 이 벡터를 EcoRI로 부분절단하여 SacB SP 안쪽에서 절단된 벡터에 chitin deacetylase cDNA가 연결되도록 하였다. *Bacillus subtilis*의 WB700과 WB800 competent cell 방법으로 형질전환을 수행하였다. 그 중 가장 활성이 높은 transformant *B. subtilis* WB700 (pRDA83)과 WB800 (pRDA83)의 상층액을 회수하여 효소활성을 조사한 결과, WB800 (pRDA83)에서 0.45 U/ml로 나타났으며, 이는 당초 공시균주 배양액에서 얻은 0.074 U/ml 보다 약 6배의 증가된 결과이다.

Bacillus subtilis WB800 (pRDA83)를 12시간 배양하여 상층액을 얻어 전기영동과 활성염색을 수행한 결과 형질전환주에서 공시균주의 상층 농축액과 동일한 60 kDa 근처에서 활성 띠를 보였다. 이 결과로부터 공시균의 chitin deacetylase 유전자가 형질전환주에서 발현되는 것으로 확인되었다.

나. Chitinase, 키틴 및 키토올리고당을 이용한 식물 병 방제효과 증진 시스템 확립

1) Chitin deacetylase 생산균주의 선발 및 효소 특성

60여 균주로부터 chitin deacetylase를 배양여액으로 분비하는 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (KCTC 6969)를 선발하였다. 이 균주는 25 C에서 가장 좋은 생장을 나타냈으며, 효소 생산능력은 YPG보다 PDB에서 더 우수하였다. PDB에 ml당 10^5 의 포자현탁액을 접종하였을 경우에는 5일 배양, 10^7 의 포자현탁액을 접종하였을 경우에는 배양 3일후에 최고의 활성을 나타냈

으며 chitin이나 chitosan에 의해서 유도되지 않았다. 또한 이 균주는 chitin agar plate에서의 생육이 아주 느렸고, chitinase도 생산하지 않았다. 이 균주는 60-kDa과 45-kDa의 두 chitin deacetylase를 생산하였는데, 효소활성은 60C, pH 7.0에서 가장 우수하였다.

2) 키틴올리고당, 키토올리고당 및 chitinase의 항균활성과 그들의 조제

키틴올리고당, 키토올리고당 및 chitinase의 항균활성은 식물병원균인 *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Alternaria panax*, *Colletotrichum gloeosporioides* 와 *Fusarium oxysporium*에 대하여 조사되었다. 이들에 대한 항균 활성은 키틴올리고당보다 키토올리고당에서 특이적으로 더 높았고, 키토올리고당 중에서 5~6당에서 특이적으로 높았다. 그 키틴올리고당(6당)은 50ppm의 EC(50)을 나타낸 *A. panax*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporium* 보다 5ppm의 EC(50)을 나타낸 *B. cinerea*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum* 에 대하여 더 높은 항균활성을 보여 주었다. 한편, *C. sphaerospermum*과 *C. tenuissimum*의 포자발아에 대한 Chitinase의 EC(50)은 20ppm이었는데, *B. cinerea*에 대해서는 200ppm, *F. oxysporium* 에 대해서는 2000ppm 이상이였다. 정제된 chitinase에 의한 결정성키틴의 분해는 1시간 이후부터 검출되기 시작하여 6시간 이후 5~6당이 가장 많았고, 24시간 이후에는 1~3당만 검출되었다. chitin deacetylase의 활성은 6당의 기질에서 가장 우수하였고 그 다음으로 5당, 4당 순이었는데, 2당과 3당에 대한 활성은 매우 낮았다. 한편, glycol chitin에 대한 활성도 5당에 비하여 1/2이상의 수준을 유지하였는데, colloidal chitin이나 crystal chitin에 대한 활성은 매우 낮았다. 따라서 키틴으로부터 키토올리고당을 만들기 위해서는 chitinase를 이용하여 키틴을 키틴올리고당으로 만들고, 키틴올리고당에 chitin deacetylase를 처리하여 키토올리고당으로 만드는 방법이 합리적일 것으로 생각되었다.

3) 길항세균, chitinase의 대량 생산과 식물 병 방제 효과 증진 전략

이전 실험들은 키틴분해세균을 키틴함유배지에서 배양하게 되면, 세균뿐만 아니라 chitinase, 키틴올리고머를 생산하고, 여기에 chitin deacetylase를 첨가하면 키토올리고머를 생산하여 식물병에 더 좋은 방제효과를 나타낼 것이라 결과를 제시하였다. 따라서 이 연구에서는 이들을 대량으로 생산할 수 있는 시스템을 확립하였고, 이들의 병 방제효과를 조사하였다. 오이 흰가루병에 대한 방제효과는 *Lysobacter enzymogenensis* 와 *Chromobacterium* sp. strain C-61 의 단독 배양액보다 혼합배양액, 세균액 보다는 배양액, 그리고 배양액에 chitin deacetylase를 첨가하였을 경우에 더 우수하였다. 비닐하우스 포장에서 흰가루병에 대한 본 배양액의 방제효과는 살포시기의 환경에 크게 영향을 받았는데, 배양원액과 10배 희석액 모두 90% 이상의 높은 방제효과를 보여 주었고, 시판중인 흰가루병 미생물제제들보다 더 우수하였다. 또한 본 배양액은 토마토 흰가루병과 잎곰팡이병, 오이 뿌리혹선충에 우수한 방제효과를 보여주었다. 본 배양액은 저렴한 비용에 의해서 조제하기가 간편하기 때문에 많은 활용이 있으리라 기대된다.

SUMMARY

I. Improvement for chitinase properties and cloning of chitin deacetylase

1. DNA shuffling and domain shuffling

A total of 5,500 transformants were obtained. By primary screening, 9 candidates out of 35 positive clones were screened for further study. One clone with high chitinase activity (Chi2-389) and one clone with thermostable chitinase activity (Chi2-33) were obtained. The alkali-resistant chitinase was similar to the wild type chitinase. Mutant Chi2-389 showed higher specific activity than the wild type chitinase by 16%. The optimum temperature of the mutant Chi2-33 was 50°C and was similar to that of the wild type. However, the thermostability of the Chi2-33 was higher than that of the wild type by 18%. The mutants Chi2-33 and Chi2-389 showed no change in the molecular weight of the enzyme, suggesting no internal cleavage or modification of terminal regions of the enzyme.

Domain-shuffled mutants were obtained by substituting ChBD with CBD and XBD. Most of the enzyme existed in the internal region of the cells. Chi40, a mutant lacking ChBD, showed only slight enzyme activity. This phenomenon seemed to be the result of the differences of CBD and ChBD in their affinity towards colloidal chitin. The enzyme with CBD and ChBD in series showed higher affinity towards the substrate than the enzymes with CBD or ChBD. XBD was less effective than CBD.

2. Construction of cDNA library and isolation of chitin deacetylase clone

The molecular weight of the mRNAs obtained from *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* were 0.5 ~ 2.5 kb. A primary cDNA library of 870,000 was constructed by introducing cDNA synthesized from the

mRNA into ZAP Expression vector. Based on the sequence of the chitin deacetylase gene of *Rhizopus oryzae*, three probes of ca. 30 bp were prepared. When hybridization was performed with the probes, no positive clones could be obtained. A total of 25 positive plaques which hybridized to the antibody were obtained using an immunoscreening kit. Of the 25 positive plaques, 2 chitin deacetylase-producing plaques were screened. The plaques with chitin deacetylase activity were introduced into *E. coli* XL0LR. Chitin deacetylase activity was detected in the periplasm and cytoplasm of the cells, but not in the culture supernatant of the culture broth.

The cDNA in RCDA-1 with high chitin deacetylase activity had an ORF of 1,308 bp encoding a protein consisted of 435 amino acids. The molecular weight of the protein was expected to be 48,000 Da. Considering the molecular weight, 60 kDa, of the protein determined by activity staining of the protein, the protein is thought to be a glycoprotein. The similarity of the protein to other fungal chitin deacetylases were less than 69%. The enzyme had a conserved amino acid sequence in the middle region of the protein.

3. Introduction of the chitin deacetylase gene into *Bacillus* sp. and its expression

Vector pWB705 was used for the introduction of the gene into *Bacillus* sp. The vector was partially digested with EcoRI and the chitin deacetylase cDNA was ligated with the vector that had been cut at the interior of SacB SP. The competent cells of *Bacillus subtilis* WB700 and WB800 was transformed with the ligated DNA. The culture supernatant of the transformant *B. subtilis* WB800 (pRDA83) showed an enzyme activities of 0.45 U/ml which is 6 times higher activity than that of the *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*.

B. subtilis WB800 (pRDA83) was grown for 12 h and the culture supernatant was electrophoresed. The activity staining of the gel revealed an active band of 60 kDa. The result indicated that the chitin deacetylase gene of *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* was expressed in the transformant.

II. System for improvement of control efficacy against plant diseases using chitinase, chitin- and chito-oligosaccharides

1. Selection of chitin deacetylase producing strain and its enzymatic characteristics

Rhizopus microsporus var. oligosporus (KCTC 6969) was selected as a chitin deacetylase producing strain from 60 strains. This strain showed best growth on 25 C, and enzyme producing ability was better in PDB than in YPG. The enzyme production reached at peak after 5 days incubation when solution of 10^5 spore/ml was inoculated, and after 3 days incubation when solution of 10^5 spore/ml was inoculated. The enzyme was not induced by chitin and chitosan. This strain grew slowly on the chitin agar plates and did not produce chitinase This strain produced two chitin deacetylases with molecular weight of 60-kDa and 45-kDa. The enzyme activity was best in 60 C and pH 7.0.

2. Antifungal activity of chito-and chitin-oligosaccharides and chitinase against plant pathogens and their preparation.

The antifungal activity of chito- and chitin-oligosaccharides and chitinase was investigated with plant pathogens; *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Alternaria panax*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporium*. The antifungal activity against the plant pathogens was specifically high in chito-oligosaccharides as compared with chitin-oligosaccharides. The activity was also specifically high in pentamer and hexamer of chito-oligosaccharides. The hexamer showed higher antifungal activity against *B. cinerea*, *C. sphaerospermum* and *C. tenuissimum* with EC(50)

values of 5ppm than *A. panax*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporium* with EC(50) values of 50ppm. The EC(50) values of chitinase were 20ppm for *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium tenuissimum*, 200ppm for *B. cinerea* and more than 2000ppm for *F. oxysporium*. Degradation of crystal chitin by purified chitinase started to be detected after 1 hour incubation, and most pentamer and hexamer were detected after 6 hours incubation. The chitin deacetylase showed best activity in the hexamer as a substrate, and followed by order of pentamer and tetramer. However, the activity was very low in trimer and dimer. The activity in the glycol chitin was a half level as compared with that in pentamer, but the activity was very low in colloidal chitin and crystal chitin. These results suggest that it is better to convert chitin into chitin-oligomers with chitinase, and then to convert the chitin-oligomers into chito-oligomers with chitin deacetylase.

3. Large-scale production of antagonistic bacteria and chitinase, and strategies for improvement of biocontrol of plant disease.

Previous experiments suggested that culture of chitinolytic bacteria in chitin media may lead to produce chitinase and chitin-oligomers as well as the bacteria, and also chito-oligomers by addition of chitin deacetylase. These culture solution may show better control efficacy against plant diseases. In this study, system for large-scale production of these culture solution was established and their control efficacy was investigated. In control of *Lysobacter enzymogenensis* and *Chromobacterium* sp. strain C-61 against powdery mildew of cucumber, the control efficacy was better in culture solution of two strains than in that of a single strain, in the culture solution than in suspension of bacteria cells alone. The control efficacy of the culture solution more increased by addition of chitin deacetylase. In the vinyl house

experiment, control efficacy of the culture solution against powdery mildew was largely affected by environment of spray timing. The undiluted and 1/10 diluted solution of the combined culture solution showed high control value more than 90%, which were superior to commercial biocides. This culture solution also showed good control efficacy against leaf mold and powdery mildew of tomato, and root-knot nematode of cucumber. It is expected that this culture solution may be used by many farmers because it can be simply prepared with low cost.

CONTENTS

SUMMARY -----	9
CONTENTS -----	14
Chapter I. Introduction -----	18
Section 1. Scope and objective of research -----	18
Section 2. Necessity of research -----	20
Chapter II. Present situation of related techniques -----	25
Chapter III. Results of research -----	30
Section 1. Improvement for chitinase properties and cloning of chitin deacetylase -----	30
1. Introduction -----	30
2. Materials and methods -----	31
3. Results and discussions -----	41
1) DNA shuffling and domain shuffling -----	41
2) Consturction of cDNA library and isolation of chitin deacetylase clone -----	55
3) Introduction of the chitin deacetylase gene into <i>Bacillus</i> sp. and its expression -----	63
4. Summary -----	65
Section 2. System for improvement of control efficacy against plant diseases using chitinase, chitin- and chito-oligosaccharides -----	67

1. Introduction	67
2. Materials and methods	69
3. Results and discussions	76
1) Selection of chitin deacetylase producing strain and its enzymatic characteristics	76
2) Antifungal activity of chito- and chitin-oligosaccharides and chitinase against plant pathogens and their preparation.	80
3) Large-scale production of antagonistic bacteria and chitinase, and strategies for improvement of biocontrol of plant disease.	90
4. Summary	105
Chapter IV. Attainment of research objective and contribution to related fields	108
Chapter V. Plan for application of research results	114
Chapter VI. Information received at abroad	115
Chapter VII. References	116

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	9
CONTENTS	14
제 1 장 연구개발과제의 개요	18
제 1 절 연구개발의 목적 및 범위	18
제 2 절 연구개발의 필요성	20
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	30
제 1 절. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발 및 chitin deacetylase 유전자의 클로닝	30
1. 서 론	30
2. 재료 및 방법	31
3. 결과 및 고찰	41
가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발	41
나. Chitin deacetylase 유전자의 클로닝	55
다. <i>Bacillus</i> sp.에 chitin deacetylase 유전자 도입 및 발현	63
4. 결과 요약	65

제 2 절. Chitinase, 키틴 및 키토올리고당을 이용한 식물 병 방제효과 증진 시스템 확립-----	67
1. 서 론 -----	67
2. 재료 및 방법 -----	69
3. 결과 및 고찰 -----	76
가. chitin deacetylase 생산 균주의 선발 및 효소 특성 -----	76
나. 키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성과 그들의 조제 -----	80
다. 길항세균, chitinase 및 키토올리고당의 대량 생산과 그들의 식물 병 방제 효과 증진 -----	90
4. 결과 요약 -----	105
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	108
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	114
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	115
제 7 장 참고문헌 -----	116

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

1. 연구개발의 목적

Chromobacterium sp. strain C-61로부터 클로닝된 chitinase 유전자를 변형하여 효소 특성이 개선된 우수 효소를 만들고, chitin deacetylase 생산균주 및 유전자를 선발하여 항미생물성 키틴유도체를 대량생산할 수 있는 체계를 확립하고, 이들을 식물병 방제에 이용할 수 있는 시스템을 구축하는데 목적이 있다.

2. 연구개발의 범위

가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발 및 chitin deacetylase 유전자의 클로닝

1) 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발

- DNA shuffling에 의한 고효성 chitinase 선발
- DNA shuffling에 의한 내열성 chitinase 선발
- DNA shuffling에 의한 내알칼리성 chitinase 선발
- Domain shuffling에 의한 특성이 변화된 chitinase 선발

2) chitin deacetylase 유전자의 클로닝

- cDNA library의 구축
- chitin deacetylase cDNA clone의 선발
- chitin deacetylase cDNA를 *E. coli*에 도입 및 발현
- chitin deacetylase cDNA의 염기서열 결정 및 분석

3) *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자의 도입 및 발현

- insert, vector DNA의 조제
- ligation 및 도입
- 형질전환주의 선발
- 형질전환주의 chitin deacetylase 분비 여부 조사
- chitin deacetylase의 생산 조건 확립
- chitin deacetylase의 특성

나. Chitinase, 키틴 및 키토올리고당을 이용한 식물 병 방제효과 증진 시스템 확립

1) Chitin deacetylase 생산균주 선발 및 항미생물성 키토올리고당 조제

- chitin deacetylase 생산균주의 분리 및 효소의 생산조건 확립
- 키틴으로부터 키토올리고당의 조제
- 키틴유도체에 따른 항미생물성

2) 효소, 키틴유도체의 생산 및 분리, 정제 기술 확립

- chitinase, chitin deacetylase의 생산 조건 확립
- chitinase, chitin deacetylase의 분리, 정제 시스템 확립
- 키틴올리고당으로부터 키토올리고당의 조제
- 키틴유도체의 생산 조건 확립

3) 키틴분해미생물과 키틴을 이용한 식물병 방제 체계 확립

- 키틴유도체를 이용한 비닐하우스의 주요 작물(오이, 토마토) 병 방제 체계 확립

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

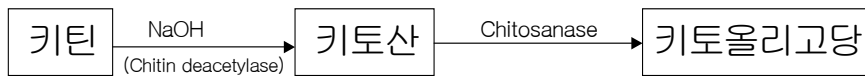
가) 유전자 변형에 의한 chitinase 활성 및 특성 변화

- Chitinase는 키틴을 분해하여 인간에 유용한 천연물질을 만들거나 식물 병 방제에 활용할 수 있는 효소로서 다양한 생물로부터 여러 chitinase 유전자가 보고되었다.
- 실제로 이용되기 위해서는 자연상태에서 분리된 효소보다 더 활성이 높고, 다양한 조건에서 작용할 수 있는 chitinase가 필요하다.
- 이러한 효소는 유전자의 변형에 의해서 얻어질 수 있다.
- 특히 유용 천연물질을 만드는데 이용할 수 있는 열에 안정된 chitinase, 해충 방제 시스템에 활용할 수 있는 알칼리에 안정된 chitinase를 만들 필요가 있다. 해충을 억제하기 위해서는 chitinase가 해충의 장내 세포를 분해해야 하는데, 해충의 장은 알칼리성(4, 5)이기 때문에 알칼리에 안정된 chitinase가 필요하다
- Cellulase나 xylanase의 경우에는 유전자 변형에 의해서 여러 특성을 지닌 효소를 개발하려는 연구가 많이 수행되었으나, chitinase에서는 아직 수행되지 않았기 때문에 이 연구는 활용 측면뿐만 아니라 기술적 측면에서도 아주 필요하다.

나) Chitin deacetylase 유전자의 클로닝 및 *Bacillus* sp.에 도입 및 발현

- 키틴의 아세틸기를 제거함으로써 키토산이 만들어지는데, 아세틸기는 알칼리(NaOH)나 chitin deacetylase를 처리하여 제거될 수 있다. 그러나, 현재 알려진 chitin deacetylase는 키틴올리고당의 아세틸기를 잘 제거하지만 결정성 키틴에 대한 아세틸기는 잘 제거시키지 못하는 것으

로 알려져 있다. 따라서, 현재 이용되고 있는 키토산의 대부분은 알칼리 처리에 의해서 만들어지고 있고, 키토올리고당은 chitosanase를 이용한 키토산의 분해에 의해서 얻으려는 연구가 많이 이루어지고 있다.



- 본 연구에서는 상기와 같은 키틴-->키토산 -->키토올리고당 시스템이 아니라 키틴-->키틴올리고당-->키토올리고당 시스템을 이용하려고 한다. 즉 chitinase를 이용하여 키틴을 키틴올리고당으로 만들고, chitin deacetylase를 이용하여 키틴올리고당을 키토올리고당으로 만들려고 한다.



- 이 연구를 위해서는 ① chitinase 생산 균주 혹은 정제된 chitinase, ② chitin deacetylase 생산균주 혹은 정제된 chitin deacetylase가 필요하다.
- *Chromobacterium* sp. strain C-61로부터 chitinase 유전자를 클로닝하여 *E. coli*에서 생산할 수 있는 시스템 (본 연구팀이 개발)이 이미 확립되었고, 앞으로는 chitin deacetylase 유전자를 클로닝하여 *Bacillus* sp.에서 생산할 수 있는 시스템이 필요하다.
- 소량의 올리고당을 만들 경우에는 정제된 효소로도 가능하겠지만, 대량의 올리고당을 만들 경우에는 그들 효소를 분비할 수 있는 균주를

이용하는 것이 좋을 것이다. 그러나 현재 알려진 chitin deacetylase는 곰팡이에서만 보고되었고, 곰팡이 유전자는 *E. coli*에서 발현까지는 가능하지만 발현산물을 분비할 수 있는 시스템까지는 갖추어져 있지 않다. 따라서 외래 유전자를 발현 및 분비할 수 있는 시스템까지 갖추어져 있는 *Bacillus sp.* 에 도입, 발현하는 것이 필요하다.

다) 효소의 생산 및 정제

- 효소를 이용하여 대량의 키틴유도체를 생산하기 위해서는 야생형 균주 및 유전자를 지닌 *E. coli*로부터 대량의 효소를 생산할 수 있는 시스템이 필요하다
- 효소에 의한 키틴유도체의 분해 패턴 및 그 기작을 구명하기 위해서는 대량의 정제된 효소가 필요하다.

라) 항미생물성 키틴유도체의 생산

- 키틴올리고당 혹은 키토올리고당이 인간, 가축 및 식물의 다양한 병원균과 식품의 여러 부패균들을 억제하는 것으로 보고되었지만, 모든 올리고당이 모든 병원균을 억제하는 것이 아니라 올리고당의 길이, 대상 병원균의 종류에 따라 억제정도가 각각 다르다. 따라서, 대상 병원균을 가장 잘 억제할 수 있는 올리고당의 종류, 길이 및 농도 등을 정확히 파악할 필요가 있다.
- 대상 병원균을 억제할 수 있는 올리고당을 생산해 낼 수 있는 시스템이 필요하다.
- 키틴 혹은 키토올리고당은 화학적인 방법과 효소학적인 방법에 의해서 얻어질 수 있는데, 화학적인 방법은 분자량이 낮은 2-3당으로 분해되는 단점이 있고, 식품의 안정성 문제도 대두된다. 이에 반하여 효소를 이용하였을 경우에는 화학적인 방법보다 더 큰 분자량을 가진 올리고당, 즉 항미생물 효과가 더 우수한 6-7당의 올리고당을 얻는데 더 유리한 것으

로 알려져 있다.

- 화학적으로 처리할 경우에는 분해된 산물 중에서 원하는 올리고당을 순수 분리, 정제할 수 있겠지만, 순수 분리된 올리고당을 농업에 이용할 수는 없을 것이다. 따라서, 효소를 분비하는 균주를 처리해서 대상 병원균을 가장 크게 억제할 수 있는 올리고당이 많이 함유된 조건을 찾는 것이 실제 이용 측면에서 필요하다.
- 생물 및 효소를 이용한 올리고당의 생산 시스템은 다른 분야에의 이용에도 아주 필요하다.

마) 키틴분해미생물 및 키틴유도체를 이용한 식물병 방제 효과 증진

- 식물병원진균의 세포벽을 분해하여 억제할 수 있는 키틴분해미생물은 다양한 종류가 보고되었고, 미생물농약으로 개발하려는 연구가 많이 수행되고 있지만 미생물농약보다 더 간편하고 우수한 방제효과를 낼 수 있는 시스템이 필요하다.
- 키토산을 이용하여 식물 병을 방제할 수 있다는 보고가 있지만, 더 다양한 억제 물질을 들을 조합하여 병 방제효과를 높이려는 노력이 필요하다.

2. 경제·산업적 측면

- 키틴은 곤충의 외골격, 게나 작은 새우와 같은 갑각류의 주요한 구조적 성분으로서, 자연계에서 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연자원이다. 따라서, 키틴은 가격이 저렴한데 키틴유도체들은 ① 의약적 (수술봉합사, 인공피부, 화상치료, 피부 및 모발보호, 화장품 보습 및 유향제), ② 농업적 (종자도포제 및 증수제, 동물사료), ③ 생물공학적 (신섬유, 효소와 세포의 고정화제, 젤의 조제), ④ 환경공학적 (중금속의 제거제, 유기오염물질의 침전제), ⑤ 기타 향압 및 제압효과, 상처치유제 등 여러 분

야에서 이용될 수 있고, 상품화된 것도 많다.

- 이러한 키틴유도체는 생물 혹은 효소학적인 방법에 의해서 만들어져야 한다. 특히 인간의 질병치료제나 식품의 향미생물제로 이용될 올리고당은 생물 혹은 효소학적인 방법으로 만들어져야 할 것이다.
- 키틴유도체를 만들 수 있는 효소(chitinase, chitin deacetylase 등) 및 균주들은 상업화가 가능하다.
- 생물 및 효소를 처리하여 얻어진 특정의 올리고당은 산업화가 가능하다.
- 현재 식물 병을 방제한다는 많은 친환경자제가 나오고 있지만 방제효과가 크지 않아서 농민들에게 외면당하고 있다. 보다 더 효과적인 친환경자제의 개발이 시급히 요구되고 있다.

3. 사회·문화적 측면

- 1960년대 이후 고도 성장기에 접어들면서 화학물질을 이용한 각종 산업이 인간에 기여한 공로는 인정되지만, 환경오염과 안정성 문제에 이제는 모든 분야에서 생물적 방법을 이용해야 할 시기에 와 있다.
- 이제는 작물의 병해충도 가능한 한 유기합성 농약을 사용하지 않고 방제할 수 있는 시스템이 필요하다.
- 저장 중에 발생하는 병원균도 인간에 해롭지 않은 물질로 억제할 수 있는 시스템이 확립되어야 한다.
- 현재 여러 키토산이 각종 식물병을 방제 혹은 작물 생육을 촉진하는 것으로 일반 농가에 많이 판매되고 있지만, 효과가 크지 않은 게 사실이다.
- 모든 키토산이 모든 병원균을 억제하는 것이 아니라 키토올리고당의 종류, 병원균의 종류에 따라 억제정도가 각각 다르기 때문에 각 작물의 생육 및 병 방제에 알맞은 키토산이 하루 빨리 개발, 판매되어야 한다.

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

1) 유전자 변형에 의한 chitinase 활성 및 특성 변화

가) 타 연구기관

- 외국에서 chitinase 유전자는 식물, 곤충, 곰팡이, 세균, 바이러스 등 다양한 생물로부터 클로닝 되었다 (3, 6, 8, 17, 30, 32, 33, 51, 53, 57, 64, 67).
- 국내에서도 chitinase 유전자는 *Serratia marcescens* (14), 벼 (39) 등으로부터 클로닝 되었다.
- Chitinase 유전자의 경우, promoter, signal peptide, chitin-binding domain (ChBD), catalytic domain 등의 구조 및 기능 등을 분석하고 (16, 19, 56, 63, 65, 66, 69), 이들 유전자를 식물에 도입, 발현시켜 병해충저항성 식물을 만드는 연구가 많이 수행되고 있다 (12, 28).

나) 본 연구팀

- *Chromobacterium* sp. strain C-61로부터 보고되지 않은 새로운 chitinase 유전자를 클로닝하여 유전자의 promoter, signal peptide, ChBD, chitinase active site 등의 구조 및 기능을 분석하였다 (1999-2000, 학진 유전공학연구).
- chitinase 유전자에 cellulose-binding domain (CBD)의 첨가, site-directed mutagenesis에 의한 chitinase 활성의 증가, chitinase 유전자를 *Trichoderma harzianum*에 도입, 발현을 수행하였다 (1999-2001, 농림기술개발과제).
- 세균 CBD를 β -glucosidase에 붙이거나, 세균 endoglucanase의 CBD를 곰팡이 CBD로 치환 (25)하는 등 cellulase와 xylanase 유전자를 변형하여 특성 및 활성이 변화된 효소를 얻을 수 있는 실험을 수행하였다 (2000-2004, 한국과학재단 목적기초연구).

다) 현기술상태의 취약부분

- DNA shuffling 방법 (11, 15, 49, 55)을 N-carbamylase와 D-hydantoinase의 fusion 효소 (24) 등에 적용하여 열안정성 증진, 효소활성 증진 (46), 기질선택성 증가, 단백질 특성 증진, 선발방법 증진 (29) 등의 변화를 얻었으나, chitinase 유전자에서 수행한 연구 결과는 국내외에 아직 없다 (표 1).
- Domain shuffling (18, 23, 25)에서 정제를 용이하기 위한 방법으로 chitinase에 CBD를 부가한 사례는 있으나, ChBD의 결손이나 xylan-binding domain (XBD)로의 치환 등의 domain shuffling 연구 결과는 국내외에 아직 없다.

표1. DNA shuffling을 이용한 사례

특성 변화	연구 내용
열안정성 증진	subtilisin E p53의 핵심도메인이 변형 catechol 2,3-dioxygenase
효소활성 증진	cephalosporinase family gene aspartate aminotransferase atrazine chlorohydrolase 세균 cellulose-binding domain (CBD) 치환 단백질분해효소 N-carbamylase와 D-hydantoinase의 fusion 효소
기질선택성 증가	biphenyl dioxygenase coagulation factor X의 N-말단과 trypsin의 N-말단 결합
단백질 특성증진	녹색형광단백질의 신호를 기존 생산물보다 45배 이상 향상 DNA-binding domain의 기능 향상
선발방법 개발	phage display 선별법의 개발 cellulase 변이체로 대장균 cell surface display 방법 개발

2) chitin deacetylase 유전자의 클로닝 및 *Bacillus* sp.에 도입 및 발현

가) 타 연구기관

- chitin deacetylases는 *Mucor rouxii* (20, 62), *Absidia coerulea* (13), *Aspergillus nidulans* (2), *Colletotrichum lindemuthianum* (58, 60) 및 *Saccharomyces cerevisiae* (34) 로부터 분리, 정제되었고, *M. rouxii* (21), *C. lindemuthianum* (59) 및 *Saccharomyces cerevisiae* (9, 36) 로부터 유전자가 클로닝되었다.
- chitin deacetylase는 미생물에 따라 두 가지 역할을 하는 것으로 알려졌다. 즉 *Saccharomyces cerevisiae*는 세포벽을 생합성하기 위하여 분비하고 (10), 식물병원균인 *Colletotrichum lindemuthianum*은 자신의 키틴을 탈아세틸시켜 식물의 방어반응을 감소시키기 위하여 분비하는 것으로 제시되었다 (35).
- 국내에서는 아직 보고되지 않았다.

나) 현기술상태의 취약부분

- 몇 가지 곰팡이에서 유전자가 클로닝되었지만 세균에서의 생산시스템은 아직 확립되어 있지 않다.

3) 항미생물성 키틴유도체의 생산

가) 타 연구기관

- 키틴올리고당 혹은 키토올리고당은 항암 및 다양한 병원균의 항미생물제로 국내외에서 많이 보고되었다 (37, 38, 47, 48).
- 화학적 및 효소학적인 방법에 의한 키틴 및 키토올리고당의 분해 패턴은 국내외에서 보고되었다 (1, 7, 22, 70).
- 키토산을 이용한 토마토의 생육 촉진 및 식중독균 등의 억제능력은 전남대학교 연구진에 의해서 수행되었다.

나) 현기술상태의 취약부분

- 생물 혹은 효소를 이용하여 특정의 병원균을 가장 잘 억제할 수 있는 올리고당을 생산할 수 있는 시스템의 확립 기술은 아주 미흡하다.

4) 키틴분해미생물 및 키틴유도체를 이용한 식물병 방제

가) 타 연구기관

- 키틴분해미생물은 식물병원진균 세포벽의 주요 구성성분인 키틴을 분해하여 식물병을 억제하는 것으로 다양한 종류의 균주가 국내외에서 보고되었다 (4, 5, 40-42, 54).
- 키틴분해미생물을 이용한 토양전염성병 방제는 미국 Cornell대학교, 미국 Advanced Genetic Sciences사, Monsanto사 및 이스라엘에서 많이 연구되었고, 국내에서는 경상대학교에서 수행되어지고 있다.
- 길항미생물을 종자에 침지 후 파종하였을 경우 병방제효과가 있었다는 보고가 있다.
- 키토산을 이용하여 복숭아, 배 및 참다래, 오이 및 고추, 딸기, 토마토 등의 저장을 증진시킬 수 있는 것으로 보고되었다 (50).

나) 본 연구팀

- 토양전염성을 억제할 수 있는 다양한 키틴분해미생물을 분리, 동정 보존하고 있다.
- 육묘용 상토에 키틴과 키틴분해미생물을 처리, 육묘기간 중 처리 미생물이 생육토록하여 포장상태에서도 토양병을 방제할 수 있는 시스템을 확립하였다 (1999-2001, 농림기술과제).
- 본 연구의 방법은 미생물농약보다 훨씬 더 간편하고 효과적인 방법이다.
- 토양병 방제용 상토로 개발 및 산업화 할 예정이다.

다) 현기술상태의 취약부분

- 대부분의 연구기관에서는 길항미생물을 미생물농약으로 개발하려는 연구에 중점을 두고 있다.

- 미생물농약은 제제화하고 살포하는데 많은 노력과 비용이 소요된다.
- 미생물농약은 운반, 보존, 살포 등이 불편하다.
- 키토산을 이용한 식물병 방제에서 산분해 키토산을 이용하였고, 관련 병원균에 대한 억제 정도는 전혀 조사되지 않았다.

라) 앞으로 전망

- chitinase의 경우에도 유전자를 변형하여 효소 활성은 물론 여러 특성을 지닌 효소를 만들려고 노력할 것이고, 이들을 이용한 식물 병해충 방제 연구가 다방면에서 이루어 질 것이다.
- 키틴으로부터 인간에 유용한 천연물질을 만드는 데 화학물질을 전혀 사용하지 않고 효소 (chitinase, chitosanase, chitin deacetylase 등) 및 미생물을 이용하려는 연구가 많이 이루어 질 것이다.
- 식물병 방제도 유기합성농약 대신 물리, 생물적인 방법에 의해서 이루어질 수 있을 것이다.

마) 기술도입의 타당성

이번 연구에서 하고자 하는 내용은 국내에서도 충분히 해결할 수 있는 기술이고, 지금까지 국내외에서 보고된 내용들보다 더 합리적이고 효과적인 방법이기 때문에 기술 도입을 할 필요가 없을 것 같다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발 및 chitin deacetylase 유전자의 클로닝

1. 서론

Chitinase는 키틴을 분해하여 인간에 유용한 천연물질을 만들거나 식물병 방제에 활용할 수 있는 효소로서 실제로 이용되기 위해서는 자연상태에서 분리된 효소보다 더 활성이 높고, 다양한 조건에서 작용할 수 있는 chitinase가 필요하다. 이러한 효소는 유전자의 변형에 의해서 얻어질 수 있다. cellulase나 xylanase의 경우에는 유전자 변형에 의해서 여러 특성을 지닌 효소를 개발하려는 연구가 많이 수행되었으나, chitinase에서는 아직 수행되지 않았기 때문에 이 연구는 활용 측면뿐만 아니라 기술적 측면에서도 아주 필요하다.

키틴은 곤충의 외골격, 게나 작은 새우와 같은 갑각류의 주요한 구조적 성분으로서, 자연계에서 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연자원이다. 따라서, 키틴은 가격이 저렴한데 키틴유도체들은 ① 의약적 (수술봉합사, 인공피부, 화상 치료, 피부 및 모발보호, 화장품 보습 및 유화제), ② 농업적 (종자도포제 및 증수제, 동물사료), ③ 생물공학적 (신섬유, 효소와 세포의 고정화제, 젤의 조제), ④ 환경공학적 (중금속의 제거제, 유기오염물질의 침전제), ⑤ 기타 항암 및 제암효과, 상처치유제 등 여러 분야에서 이용될 수 있고, 상품화된 것도 많다.

이러한 키틴유도체는 생물 혹은 효소화적인 방법에 의해서 만들어져야 한다. 특히 인간의 질병치료제나 식품의 향미생물제로 이용될 올리고당은 생물 혹은 효소화적인 방법으로 만들어져야 할 것이며, 키틴유도체를 만들 수 있는 효소(chitinase, chitin deacetylase 등) 및 균주들은 상업화가 가능하다.

본 세부과제에서는 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발, chitin deacetylase 유전자의 클로닝, *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자의 도입 및 발현 등을 목적으로 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발

1) DNA shuffling

Chitinase 유전자를 error-prone PCR 로 일차 돌연변이를 유발시킨 후 우수변이체들을 찾아냈고, 이들로부터 DNA를 회수하여 2차적으로 DNase I (or 제한효소)로 자른 후 PCR에 의하여 재조합한 다음 recombinant library 를 얻었다. 이로부터 우수변이체를 선발하였다.

가) DNA shuffling

Shuffling 반응의 대상 유전자를 적당한 프라이머를 사용하여 error-prone PCR을 수행하여 얻었다. Taq DNA polymerase를 사용하여 합성 primer들을 혼합하여 25 cycle을 수행하였다. 약 5 µg의 DNA를 DNase I 으로 잘라 50-200 bp 조각들을 전기영동으로 회수한 후 프라이머 없이 60 cycle의 PCR로 DNA 들을 재조합 (reassembly)하였다. 조합된 생성물을 50 배 정도 희석하여 프라이머를 사용하여 원하는 크기의 PCR 산물을 얻었다. 이 때 사용하는 프라이머는 처음 사용된 프라이머의 안쪽 부분의 DNA에 결합하도록 설계되었다. 전기영동으로 산물을 확인한 후 정제하여 양 끝을 적당한 제한효소로 잘랐다. 이를 pUC19에 결합시켰다. 이의 형질전환 효율을 높이기 위하여 electroporation 방법으로 *E. coli* DH5a에 형질전환하였다.

나) 우수변이체 선발

형질전환주들을 50 µg/ml ampicillin이 들어있는 LB 평판배지에 도말한 후, 37°C 에서 24 시간 배양한 후, 수 백개의 후보 형질전환주들을 위 평판배지에 균일하게 옮겨 대조군에 비하여 chitinase 활성을 강하게 보이는 변형주들을 골라냈다. 이 때 10 ml의 top agar에 0.5% colloidal chitin을 넣어 37°C에서 6 시간 배양한 후 확인하였다. 일단 일차로 선발된 콜로니들을 대상으로 PCR을 수행하여 2차 shuffling (second round)을 수행하여 최고의 활성

을 지니는 우수변이체를 찾았다.

2) Domain shuffling

Chitinase 유전자에 대한 체계적 연구는 Watanabe group에 의해 이루어져 왔다. 이들은 *Bacillus circulans*에서 A, C, D 세 종류의 chitinase를 SDS-PAGE로 확인하고, 그 중 chitinase A가 key enzyme이며 C-말단에 chitin-binding domain (ChBD)이 존재하고 있음을 밝혔다. 특히 ChiD의 N-말단의 1/3과 ChiA의 C-말단 1/3이 높은 상동성을 보이고 있었다. 두 효소의 기질에 대한 친화력의 비교를 통해 ChiA의 C-말단과 ChiD의 N-말단이 ChBD인 것을 알게 되었다. 이와 같이 binding domain의 위치는 chitinase에 따라 다른 것으로 나타나고 있다. 한편 ChBD는 cellulose나 xylanase의 binding domain과 염기서열에서 유사한 것으로 보고되고 있다. cellulose-binding domain (CBD)을 하나 더 붙여 double CBD로 만들었을 때 affinity가 증가됨이 보고되고 있다.

본 연구팀은 최근 *Chromobacterium* sp. strain C-61로부터 지금까지 보고되지 않았던 새로운 chitinase 유전자를 분리하여 염기서열을 결정하였다. 이 유전자는 1611 bp의 염기쌍, 26개의 아미노산으로 된 signal sequence를 제외한 510개의 아미노산으로 구성되었고, 예상되는 분자량이 54.6 kDa, pI 값은 8.77이었다. N-말단에 ChBD, C-말단에 catalytic domain (3개의 chitinase active site) 등이 존재하는 것으로 분석되었다 (미발표). 본 연구에서는 chitinase 유전자에서 N-말단 부위가 결실된 deletion mutant를 만들어 wild type 효소와 비교함으로써 이 부위의 기능을 파악하고자 하였다. 또한, 본 연구팀은 수년 전부터 endo- β -1,4-glucanase, xylanase, cellulase 및 β -glucosidase 등 cellulose 분해효소 system에 대한 일련의 연구를 성공적으로 수행해오고 있다 (25, 26, 27, 46, 52). 특히 cellulose-binding domain (CBD)에 대한 연구를 통해 곰팡이의 exoglucanase에 있는 binding domain을 세균으로 옮겨 높은 binding affinity를 갖는 hybrid endonuclease를 보고한 바 있고 (25), 최근에는 *Clostridium thermocellum*의 xylanase (XynX)의 유전자 구조와 기능 분석을 통하여 열안정성 domain이 xylan binding domain (XBD)의 기능을 하는 것을 보고하였다 (52). 앞서 언급한 것처럼 chitin과

cellulose-binding domain이 여러 면에서 유사한 점에 비추어 chitinase의 이 부위를 CBD와 XBD를 부가시키고 치환시켜 binding affinity의 변화, 그리고 저분자량과 고분량의 기질특이성의 변화 등을 살펴보았다.

가) ChBD를 CBD 또는 XBD로의 치환

CBDs와 XBDs는 효소와 기질사이의 상호작용을 증가시켜 불용성 기질의 가수분해를 돕는다. CBD와 XBD는 상동성이 있고 일부 효소에서 binding domain이 chitin과 cellulose를 구별하지 못하는 점을 토대로, *Trichoderma viride* exoglucanase의 CBD와 XynX의 XBD를 ChBD 부위의 염기서열과 치환하였다. 이를 위해 overlapping PCR을 통해 hybrid gene을 만들었다. 즉, 적절한 primer를 design하여 3 rounds의 PCR을 수행하여 chitinase의 N-말단에 위치시켰다.

나) 클로닝 및 정제

삽입 DNA는 pET에 구축하였다. 벡터는 삽입될 DNA내의 제한효소부위가 없는 효소로 절단하였다. 삽입 DNA는 구조이동이 일어나지 않으면서 벡터의 절단 부위에 ligation될 수 있는 제한효소부위가 형성되도록 primer를 합성, PCR하였다. PCR산물을 제한효소로 절단하여 전기영동 후 원하는 DNA를 추출, pET system manual에 따라 ligation하고 competent *E. coli*에 형질전환하였다. kanamycin 배지에서 성장한 클론들은 chitinase 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 colony PCR을 한 후 선발하였다. 선발된 클론으로부터 플라스미드를 분리하여 expression *E. coli*에 형질전환하였다.

다) 변이체 효소들의 정제

상기에서 얻어진 클론들로부터 pET system manual에 의하여 단백질을 분리, 정제하여 단백질농도 및 chitin 분해능력, chitin 분해효소의 활성, pH 및 온도에 대한 효소의 활성 및 안정성, 효소의 분자량 및 pI값, chitin 분해산물, 다당물질의 결합능력 등을 조사하였다. 특히 모균주에서 생산된 chitinase와 *E. coli*에서 생산된 chitinase의 특성, *E. coli*의 세포내, periplasm, 세포밖에 있는 chitinase의 농도, 활성 및 특성, 모균주에서 생산

된 chitinase와 변이 혹은 결실된 chitinase 유전자들이 생산한 chitinase의 활성 및 특성, 각 clone이 생산한 단백질의 다당물질에 대한 결합능력 등을 비교, 분석하였다.

3) Chitinase의 분리, 정제 및 활성 측정

가) Chitinase 유전자를 지닌 *E. coli*에서의 chitinase 생산

배지위에서의 키틴 분해능력은 colloidal chitin을 함유한 1/2 LB배지 위에 접종 후 37°C, 5일간 배양하여 형성된 halo zone의 크기를 야생형 균주의 그것과 비교하였다. Chitinase 생산 능력은 LB, TB 혹은 1/2 LB+키틴 배지에서 배양 후, 매일 원심분리에 의해서 얻어진 상등액에 대한 chitinase 활성으로 측정하였다.

나) Chitinase 활성 측정

(1) 4-MU-(GlcNAc)₂에 대한 chitinase 활성 : Microplate에 0.1 M Na₂HPO₄- NaH₂PO₄ (pH 7.0), 효소 및 기질 넣고, 37°C에서 10분, 30분 보존 후, 360 nm의 excitation과 440nm의 emission (Bio-teck FLX-8000) 에서 방출된 4-methylumbelliferone (4-Mu)의 양을 조사하였다. 기질로부터 효소 1 μl 당 1 μmole의 4-Mu를 방출하는데 필요한 효소의 양을 1 unit으로 하였다. 단백질 농도는 protein assay kit (Bio-Rad)를 이용해서 측정하였다.

(2) Colloidal chitin, crystal chitin에 대한 chitinase 활성 : 각각의 eppendorf tube에 0.1 M Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.0), 효소 및 colloidal chitin 혹은 crystal chitin을 넣어 37°C에서 1시간, 2시간 보존 후 100°C 에서 3분 boiling 하고, 10,000 rpm에서 5분 원심분리 하였다. 상등액 200 μl 를 eppendorf tube에 넣고 color reagent (0.05% potassium ferricyanide in 0.05 M sodium carbonate) 260 μl를 첨가하여 13분 boiling하였다. 이 용액 200 μl를 microplate에 넣고 420 nm에서 측정하였다. 이때 사용된 standard로 0, 0.157, 0.313, 0.625, 그리고 1.25 mM의 NAG를 이용하였다.

다) Chitinase의 분리, 정제 및 특성

(1) Chitinase의 분리, 정제 : 재조합 *E. coli*를 1/2 LB + 키틴 배지에서 4일 배양한 여액을 ammonium sulfate으로 침전, 투석시킨 후, Rotoform cell을 이용하여 정제하였다. 즉, 단백질 (2 mg/ml) 19 ml에 ampholyte (40%, pH 3-10) 을 1 ml 첨가한 액을 cell에 넣고, 3000 V, 200 mA, 12 W (이 경우, 300-500 V, 24-40 mA 이면 좋다.) 조건에서 5시간 정도 전기영동 후, 각 fraction에 있는 단백질의 양 및 chitinase 활성을 측정하고, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의해서 chitinase 밴드만 나타낸 fraction의 sample을 모아서 투석하였다.

(2) 온도에 대한 활성 및 안정성 : 4-MU(GlcNAc)₂, 정제된 효소, 0.1 M Na₂HPO₄⁻ NaH₂PO₄ (pH7.0)의 반응물을 eppendorf tube에 넣고 20~80°C에서 10분 보존 후 활성을 측정하였다. 안정성은 상기의 반응물을 20~80°C에 2시간 보존 후 활성을 측정하였다.

(3) pH에 대한 활성 및 안정성 : 2~11의 pH 범위 내에서 4-MU(GlcNAc)₂, colloidal chitin, crystal chitin에 대한 활성을 측정하였다. 안정성은 정제된 효소를 각 pH에서 2시간 동안 둔 후 4-MU(GlcNAc)₂에 대한 활성을 조사하였다. pH 2.0~3.0은 glycine-HCl buffer, pH 3.0~6.0은 citric acid-Na₂HPO₄, pH 6.0~8.0은 Na₂HPO₄⁻ NaH₂PO₄, pH 8.0~10.0은 Clark-Lubs, pH 11.0은 Na₂HPO₄-NaOH buffer가 이용되었으며, 각 buffer의 농도는 50 mM이었다.

라) SDS-PAGE 후의 chitinase 활성 검출 : Discontinuous SDS-PAGE는 Laemmli의 방법에 의해서 8% polyacrylamide gel에서 실시되었다. 효소액은 30% (W/V) sucrose, 250 mM Tris-HCl (pH 6.8)에 5.0% (W/V) SDS, 0.02% (W/V) bromophenol blue와 동량으로 혼합되었고, 효소의

실활을 방지하기 위하여 2-mercaptoethanol은 첨가되지 않고 boiling도 하지 않았다. 전기영동 후, Haran 등의 방법에 의해서 gel에 casein-EDTA를 첨가하여 효소에 결합되어 있는 SDS를 제거하고, 그 gel 위에 4-methyl-umbelliferyl- β -D-N,N'-diacetylchitobioside를 함유한 1% agarose 용액을 붓고, UV lamp하에서 형광색소를 나타내는 밴드를 조사하였다. Silver nitrate 염색에 의해서 나타난 단백질 밴드들의 분자량은 Silver Stain SDS-PAGE standards, low range (Bio-Rad)을 이용하여 추정하였고. 형광색소를 나타낸 밴드의 분자량 및 크기는 silver nitrate 염색에 의한 밴드와 비교, 분석하였다.

나. Chitin deacetylase 유전자의 클로닝

1) Chitin deacetylase의 cDNA library의 구축

가) RNA 조제

Rhizopus microsporus var. *oligosporus*를 chitin deacetylase의 생장 배지에서 배양한 후, messenger RNA isolation kit (Stratagene, USA)을 이용하여 total 및 polyadenylated RNA를 분리하였다. Oligotex-dT30 (Super) mRNA purification kit (Takara, Japan)을 이용하여 polyA⁺ RNA를 조제하였다.

나) cDNA의 합성

ZAP ExpressTM cDNA Gigapack Cloning Kits (Stratagene, USA)을 이용하여 mRNA로부터 cDNA를 합성하고 ZAP express vector에 ligation하여 Gigapack III Gold Packaging Extract로 packaging 후, XL1-blue MRF cell과 함께 배지에 도말, 적정하여 증식시켰다.

Reverse transcriptase는 MMLV reverse transcriptase와 BRL Superscript II의 혼합물을 사용하였다. Directional cloning을 위하여 5' 말단과 3' 말단에 *EcoRI*과 *XhoI* adaptor를 삽입하였다.

다) Expression vector 구축

cDNA를 일차적으로 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단된 ZAP Expression vector (Stratagene)에 ligation하여 Gigapack III gold packaging kit (Stratagene)을 이용하여 packaging하였다. 여기에 500 μ l의 SM buffer를 첨가하고, 25 μ l의 chloroform을 첨가하여 상층을 회수한 후, 최종 농도 7%가 되도록 DMSO를 첨가하여 primary library로 하였다.

2) Chitin deacetylase cDNA clone의 선발

가) 항체의 조제

Rhizopus microsporus var. *oligosporus*의 배양액 500 ml을 원심분리하여 상층액을 ultrafiltration하여 20 배 농축한 후, 10 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 (pH 7.0)에 12 시간 투석하였다. 이 시료를 사용하여 polyacrylamide gel 전기영동을 수행한 후 chitin deacetylase 활성밴드를 오려 antibody를 만들었다.

나) Hybridization

cDNA library의 plaque (50,000 pfu/plate) 위에 IPTG를 함유한 nitrocellulose membrane 올려놓고 chitin deacetylase가 발현하도록 한 다음, *picoBlue*TM immunoscreening kit (Stratagene, USA) 을 이용하여 chitin deacetylase 항체에 hybridize된 plaque들을 선발하였다.

다) Chitin deacetylase의 발현 확인

항체 교잡에 의해서 선발된 plaque들을 순수 분리한 후, *E. coli*와 액체 배양하였다. 이 배양여액을 기질에 첨가하여 효소 생산 여부를 확인하였다.

3) Chitin deacetylase cDNA를 *E. coli*에 도입 및 발현

가) *E. coli*에 도입

ZAP expression vector는 *in vivo* 상태에서 lambda vector를

phagmid로 전환하여 *E. coli* 내에서 삽입 DNA가 복제할 수 있도록 고안되었다. 제공된 protocol (Stratagene, USA)에 의하여, chitin deacetylase를 생산한 plaque들을 *E. coli* XL0LR 내로 도입되어 phagmid (PBK-CMV vector)로 유지되게 하였다.

나) *E. coli*에서의 발현

재조합 *E. coli*의 배양여액, periplasm 및 cytoplasm으로부터 조효소액을 추출 (pET expression vector의 protocol, Invitrogen)하여 활성을 측정하였다.

다) Chitin deacetylase의 특성

Native 및 denaturing SDS-PAGE에 의하여 재조합 *E. coli*가 생산한 chitin deacetylase의 종류와 분자량을 분석하였다.

4) Chitin deacetylase cDNA의 염기서열 결정 및 분석

가) 염기서열 결정

재조합 *E. coli*로부터 phagmid를 분리, 정제하여 분석 의뢰하였다.

나) 염기서열 및 아미노산 서열 분석

염기서열의 homology search는 NCBI의 BLAST program, chitin deacetylase의 이론적 분자량 및 pI 값은 ExPASy Proteomics tools의 Compute pI/Mw program, Signal peptide는 SignalP program, 제한효소 절단 site는 Web Cutter program에 의해서 분석하였다.

다. chitin deacetylase cDNA를 *Bacillus* sp.에 도입, 발현

1) *Bacillus subtilis* competent cell 제작

발현용 숙주 *Bacillus subtilis* WB700과 WB800 단백질분해효소 돌연변이주를 TBAB 고체배지에 그어 밤새 30°C에서 배양하였다. 다음 날 아

침, 이 균주를 2 ml 의 SP1 배지에 접종하여 37°C에서 3시간 45분 배양한 후, 이 배양액 0.5 ml을 미리 데워진 4.5 ml의 SP2 배지에 옮겨 37°C에서 1시간 30분 배양하였다. 이 배양액에 0.1 M EGTA 용액 50 μ l를 첨가한 후 37°C에서 10분을 배양하여 competent cell을 만들었다.

2) chitin deacetylase cDNA recombinant 벡터 제조

발현벡터로는 pWB705를 사용하였다. EcoRI으로 부분절단하여 SacB SP 안쪽에서 절단된 벡터에 chitin deacetylase cDNA가 연결되도록 하였다. Insert인 chitin deacetylase cDNA는 활성 클론에서 얻은 플라스미드를 사용하였다. 벡터와 insert를 end-filling 하여 ligation 후 위에서 만든 *Bacillus subtilis* WB700과 WB800 competent cell에 형질전환시켰다.

3) chitin deacetylase cDNA 형질전환 및 형질전환주 확인

Bacillus subtilis WB700 과 WB800 competent cell을 가진 배양액 0.5 ml에 chitin deacetylase cDNA를 갖는 플라스미드 DNA를 넣어 90분간을 더 키웠다. 적당한 항생제가 들어있는 TBAB 배지에 0.25 ml의 형질전환주 용액을 도말하여 37°C에서 배양하였다.

4) Chitin deacetylase의 활성 측정

가) 효소 활성 측정

Glycol chitin (1 mg/ml) 50 μ l, 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0), 배양액 50 μ l를 eppendorf tube에 넣고 37°C에서 항온하였다. 이 반응액 30 μ l 와 50 mM STB 95 μ l를 새로운 eppendorf tube에 넣고, 5%(w/v) KHSO_4 125 μ l와 5%(w/v) NaNO_2 125 μ l를 첨가하여 15분간 정치하였다. 그 후 12.5%(w/v) $\text{N}_2\text{H}_6\text{SO}_3$ 125 μ l를 첨가하여 5분간 정치하고, 0.5%(w/v) 3-methyl-2-benzothiazoline hydrazone(MBTH) 125 μ l를 첨가하여 3분간 boiling하였다. 수돗물에서 식힌 다음 0.5%(w/v) FeCl_3 125 μ l를 첨가하여 650 nm에서 측정하였다.

나) 효소활성 측정용 glycol chitin의 조제

NaHCO₃ 400 mg (0.4 g)을 Falcon tube (15 ml)에 넣고, 멸균수 4.5 ml를 넣은 후 잘 흔들어서 용해하였다. 용해된 4.5 ml를 100 ml 비이커에 넣고 stirring bar로 저으면서 glycol chitosan 20 mg (0.02 g)을 넣고 용해 후 얼음 속에 10분 방치하였다. Acetic acid anhydride 200 ul를 넣고 저온실에서 하룻밤 교반 (stirring bar로 저음)하고, 다음날 acetic acid anhydride 200 ul를 넣고 저온실에서 하룻밤 교반 후 20 mM KH₂PO₄+ NaOH buffer pH 7.0에서 투석하였다.

다) SDS-PAGE 후의 chitin deacetylase 활성 검출

0.01%(w/v) glycol chitin과 0.1% SDS를 포함한 gel에서 전기영동 후, 그 gel을 1% Triton X-100이 함유된 pH 5.0의 100 mM sodium acetate buffer에 넣고 37°C에서 3시간 동안 진탕 배양 후, 어둠 상태에서 0.01% calcoflour white M2R(Sigma, F 6259)로 5분 동안 염색하였다. 염색된 gel을 증류수로 1시간 이상 탈색시킨 후 lytic zone을 UV-transilluminator 상에서 관찰하였다.

* SDS-PAGE용 glycol chitin의 조제

- Glycol chitosan 1.0 g에 10% acetic acid 20 ml를 첨가하여 약사발에서 분쇄
- Viscous solution은 22°C에서 overnight 정치
- Methanol 90 ml을 서서히 첨가 --> 용액을 Whatman No. 4 filter paper로 여과
- Filtrate는 비이커에 옮겨서 15.0 ml를 magnetic stirring하면서 첨가
- Resulting gel은 실온에서 30분 동안 정치 --> 조그마한 조각으로 절단 --> 조각 밖으로 누출되어 나온 액은 제거
- 조각을 Waring blender에 넣고 methanol 90 ml을 첨가 후 4분 동안 최고 speed로 homogenate
- Suspension을 4°C, 15000 rpm, 20분 동안 원심
- Gelatinuous pellet은 methanol 90 ml을 첨가 후 4분 동안 최고

- speed로 homogenate
- Suspension을 4°C, 15000 rpm, 20분 동안 원심
 - Pellet에 0.02% sodium azide를 포함한 멸균수 90 ml를 넣고 4분 동안 최고 speed로 homogenate
 - 1% glycol chitin의 stock solution 제조

3. 결과 및 고찰

가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발

1) DNA shuffling

Chromobacterium sp. strain C-61으로부터 클로닝된 chitinase 유전자를 분리하여 양 끝에 *Apa* I site로 처리하여 subcloning하였고, 이를 재조합 플라스미드 pBKCHIA로 명명하였다. 이를 사용하여 chitinase 유전자 (그림 1)를 증폭하였다.

표 1. *Chromobacterium* sp. strain C-61 chitinase 유전자의 error-prone PCR과 DNA shuffling에 사용된 primer

Primer	Sequence
forward primer (28-mer)	ATGAGAATTCAAGCTGGAGCTCGCGCGC
reverse primer (28-mer)	TGATAAGCTTACTACATTGTGGAGGAAA

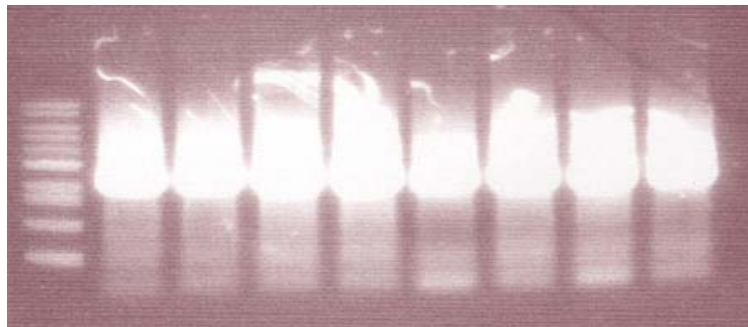


그림 2. PCR에 의하여 증폭된 DNA

위 PCR 산물을 DNase I에 의해 무작위적으로 자른 후 표준 PCR을 수행하고 1.9 kb 산물을 gel로부터 회수하였다 (그림 3). *EcoRI-HindIII*로 처리된 DNA를 pUC19 결합시켰고, 이 ligation 혼합물들을 일반적인 형질 전환과 전기천공법에 의해 *E. coli* DH5a에 도입시켰다 (그림 4). 총 5,500개의 형질 전환주를 얻었으며, 이를 대상으로 37°C에서 halo assay로 활성이 있는 변이체를 일차적으로 선별하여 35 positive clone을 확인하였다 (그림 5).

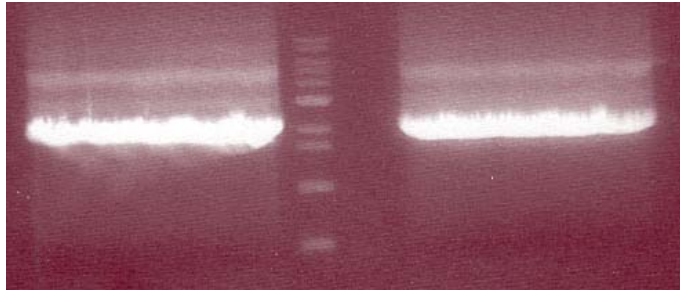


그림 3. Gel로부터 회수된 1.9 kb DNA 조각

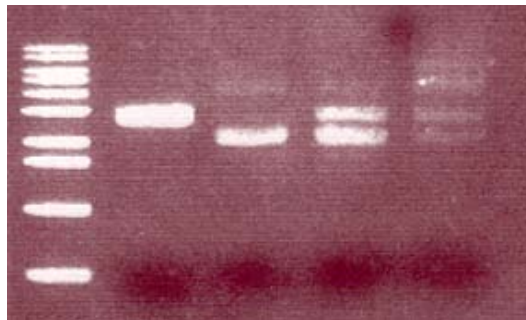


그림 4. Ligation 반응 후 시료 분석



그림 5. 변이체 라이브러리로부터 chitinase 활성 확인

이들을 대상으로 환의 크기 및 계대배양을 통한 안정성을 기준으로 9개의 우수변이체 후보를 선발하였다 (표 2). 이들을 대상으로 고활성, 내열성, 내알칼리성 우수변이 chitinase를 조사한 결과, 고활성 chitinase 1개 (Chi2-389), 내열성 chitinase 1개 (Chi2-33)를 얻을 수 있었으며, 내알칼리성 chitinase는 야생형과 유사하였다 (표 2).

표 2. 변이된 chitinase의 활성, 열안정성 및 pH 양상

	Activity	Heat treatment	Alkaline pH
pBKCHIA	+++++	+++++	+++++
Ch1-5	+++	+++	++++
Ch1-12	++++	+++	+++++
Ch1-345	++++	+++++	+++++
Ch2-33	+++++	+++++	+++++
Ch2-115	+++	++++	+++++
Ch2-236	++++	+++++	+++++
Ch2-389	+++++	++++	+++++
Ch2-1130	++++	++	++++
Ch2-2135	++++	+++++	++++

* Heat treatment, 50°C, 1 h.

변이체 Chi2-389는 야생형 chitinase 보다 16% 정도 비활성도가 높게 나타났으며, 증가되었으며, 그 외의 것들은 야생형 보다 낮게 나타났다 (표 3). 변이체 Ch2-33은 최적 온도가 B8-25는 50°C로 야생형과 비슷하였으나 기질을 넣지 않은 상태에서 열안정성은 야생형 보다 18% 높게 나타났다 (표 3). 변이체 효소들의 최적 pH와 알칼리내성은 별 차이가 없어 내알칼리성 우수변이체는 확보할 수 없었다.

표 3. 야생형과 변이체효소의 비활성도 비교

Enzymes	Specific activity (U/mg protein)	Residual activity after 30 min preincubation at 50℃ (%)
pBKCHIA	23.9	100.0
Ch2-33	22.4	117.9
Ch2-389	27.8	91.8

변이체 효소들의 분자량은 야생형 효소와 유사하게 나타났으며, 전반적으로 고체배지 상에서의 halo 크기와 비례하였다 (그림 6). 변이체 Ch2-33과 Ch2-389의 경우 분자량의 변화가 없는 것으로 보아 변이 효소의 내부적인 절단이나 말단들의 변형은 없는 것으로 추정된다.

1 2 3 4 5

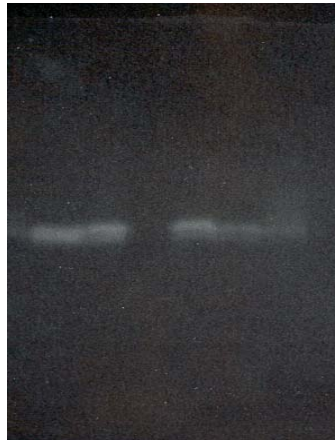


그림 6. 야생형과 변이체효소의 SDS-PAGE (A)와 활성염색 (B). Lane 1; pBKCHIA, lane 2; Ch2-33, lane 3; Ch2-389, lane 4; Ch2-1130; Ch2-2135.

2) Domain Shuffling

ChBD와 CBD가 여러 면에서 유사하며, CBD와 XBD는 상동성이 있고 일부 효소에서 binding domain이 chitin과 cellulose를 구별하지 못하는 점을 토대로, exoglucanase의 CBD와 XynX의 XBD를 ChBD 부위의 염기서열과 치환하였다. 이를 위해 overlapping PCR을 통해 hybrid gene을 만들었다. 즉, 말단에 중첩되는 primer를 design하여 3회의 PCR을 수행하여 이들 domain을 chitinase의 N-말단에 위치시킨 transformant를 얻었다 (그림 7).

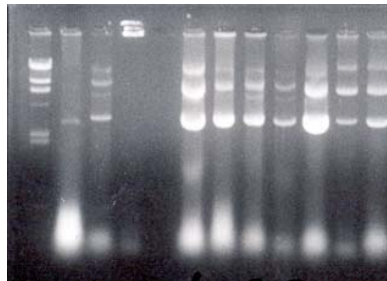


그림. 7. 총 3회 PCR을 수행하여 얻은 transformant로부터 얻은 플라스미드

즉, pET-36 벡터의 CBD뒤에 Chi54의 CaTD를 구축하여, ChBD를 CBD로 대체 하고, plasmid를 pCBD, 단백질을 Chi54-I로 명명하였다. CBD와 ChBD의 연속 domain은 pET-36 벡터의 CBD뒤에 Chi54의 ChBD와 CaTD를 구축하여 Chi54-II로 명명하였고, CBD대신 XBD를 치환하여 Chi54-III와 Chi54-IV로 명명하였다 (그림 8).

Plasmid

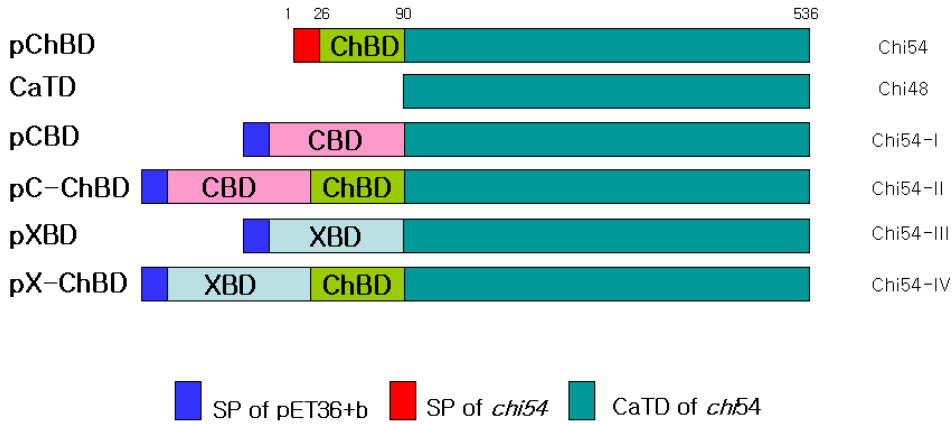


그림 8. 야생형 (Chi54), ChBD-결손형 (Chi48), 및 재조합단백질 (Chi54-I, Chi54-II, Chi54-III, and Chi54-IV)의 도메인 구조. pCBD와 pC-ChBD는 각각 pET36+b의 CBD와 pCaTD 또는 pChBD와 ligation하여 얻었다. The number refer to the position of amino acids. Abbreviations: SP, signal peptide; ChBD, chitin-binding domain; CBD, cellulose-binding domain; CaTD, catalytic domain.

이들 domain이 변형된 효소들을 지닌 transformant를 키워 활성을 비교 분석한 결과, 대부분의 효소는 세포내에 존재하였다. 비활성도를 분석한 결과 Chi48은 활성이 매우 미약하였으며, Chi54-I이 야생형의 Chi54 보다 약 2배 높게 나타났다 (표 4). 이는 ChBD가 효소 반응에 필수적이라는 것을 의미하며, CBD가 ChBD 보다 colloidal chitin에 대한 친화력을 더 높게 반영한다는 것을 의미한다. 또한, Chi54-II가 야생형의 Chi54 보다 약 3배가 높은 것으로 나타났다 (표 4). 이는 CBD와 ChBD가 연속으로 존재할 경우, 단독으로 존재할 경우 보다 기질에 대한 친화력을 증가시킨다는 것을 의미한다. ChBD가 XBD로 치환된 경우 Chi54-III는 야생형 Chi54 보다 낮게 나타났으며, 연속된 경우는 야생형 보다는 높게 나타났으나 CBD가 연속된 경우 보다는 낮게 나타났다 (표 4). 이로부터 CBD와 XBD는 효소와 기질사이의 상호작용을 증가시켜 불용성 기질의 가수분해를 도울 수 있으며, XBD는 CBD 보다 그 효과가

약하다는 것을 알 수 있었다.

표 4. Chi54, Chi54-I와 Chi54-II의 효소 활성

	Protein concentration (mg/ml)	Enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)
Chi54	12.4	0.19	0.015
Chi48	11.3	0.04	0.004
Chi54-I	10.6	0.37	0.035
Chi54-II	8.8	0.37	0.042
Chi54-III	10.9	0.12	0.011
Chi54-IV	11.5	0.26	0.023

3) chitinase의 분리, 정제 및 특성

가) chitinase 유전자를 지닌 *E. coli*에서의 chitinase 생산 조건

Chromobacterium sp. strain C-61로부터 클로닝된 chitinase 유전자를 지닌 *E. coli*와 야생형 균주의 키틴 분해 능력은 그림 9에서 보는 바와 같이 37 C에서는 *E. coli*의 키틴 분해 능력이 훨씬 더 우수하고, 30 C에서는 비슷한 수준이었다. 그리고 두 균주가 생산한 chitinase는 비슷한 크기의 분자량을 나타냈다.

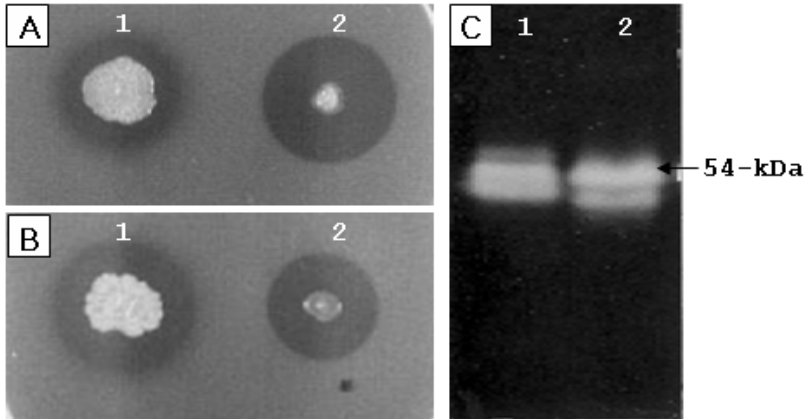


그림 9. *Chromobacterium* sp. strain C-61(1)와 그것의 유전자를 지닌 *E. coli*(2)의 키틴분해능력 (A, B), 그리고 그들이 생산한 chitinase의 SDS-PAGE 분석(C). colloidal chitin을 함유한 LB 배지에 접종 후, A는 37°C, B는 30°C에서 5일 동안 배양

재조합 *E. coli* 의 성장 및 chitinase 생산 능력에 우수한 배지 및 배양 조건을 선정하기 위하여 다양한 조건에서 실험해 본 결과, 재조합 *E. coli* 는 LB 보다 TB배지에서 더 높은 밀도를 나타냈고, 특히, TB에서는 10일까지 밀도가 계속 증가하였으나, LB에서는 8일 이후 감소하였다 (그림 10A), 배양여액의 chitinase 활성도 LB 보다는 TB배지에서 훨씬 더 우수하였고, TB의 경우에는 배양 6일, LB에서는 배양 5일 후 최고 활성을 나타냈다. 배양액에 IPTG를 첨가하였을 경우 두 배지 모두에서 chitinase 활성이 증가하였으나, 그 효과가 생각보다 크지는 않았다(그림 10B).

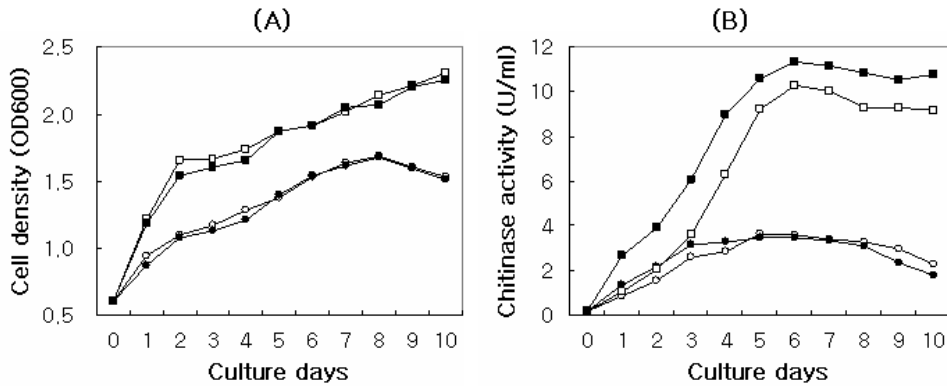


그림 10. LB와 TB배지에서 chitinase 유전자를 지닌 *E. coli* 의 성장곡선(A)과 chitinase 활성(B). 37°C 에서 배양, Symbols: ○, - IPTG in LB; ●, + IPTG in LB; □, - IPTG in TB; ■, + IPTG in TB.

또한 재조합 *E. coli* 는 TB보다 1/2LB+chitin배지의 배양액에서 더 높은 chitinase 활성을 보여주었지만, 단백질 농도는 TB배지에서 훨씬 더 높았다 (그림 11). 따라서 효소의 대량 생산을 위해서는 1/2LB+chitin배지에서 배양하는 것이 더 좋을 것으로 판단되었다.

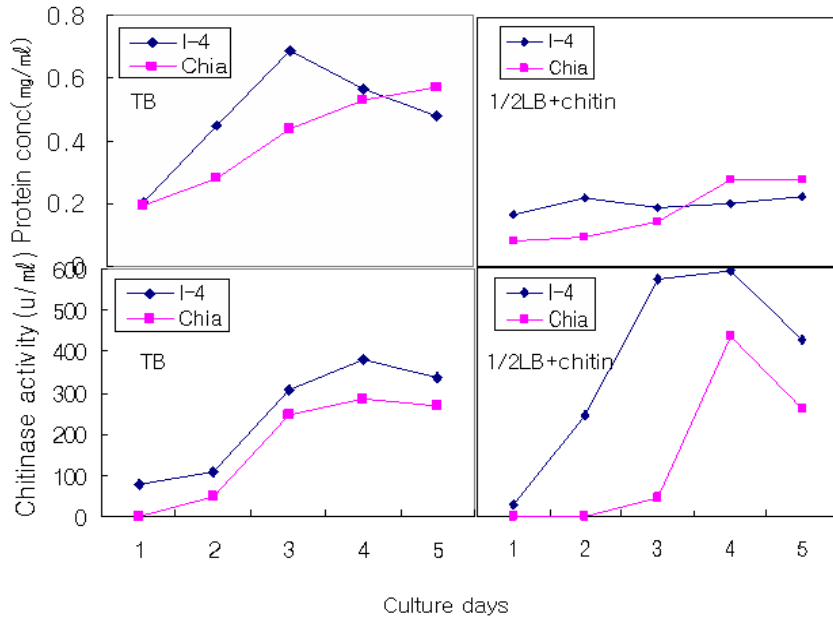


그림 11. TB와 LB+ chitin 배지에서 chitinase 유전자를 지닌 *E. coli* 의 단백질 농도와 chitinase 활성의 비교

나) 재조합 *E. coli*로부터 chitinase의 분리, 정제

이전 실험에서 *Chromobacterium* sp. strain C-61으로부터 부터의 chitinase는 약 8.7의 높은 pI를 갖고 있다는 것을 알았다. 따라서 이 실험에서는 pI 값에 따라 단백질을 분리하는 Rotofor cell을 이용하여 효소를 정제하였다. *Chromobacterium* sp. strain C-61의 배양여액으로부터 얻어진 조효소액은 이 방법에 의해서 완전 정제가 되지 않았다. 또한 재조합 *E. coli*를 TB 배지에서 배양한 여액을 이용하였을 경우에도 완전 정제는 어려웠다. 그러나 재조합 *E. coli*를 1/2 LB + 키틴 배지에서 4일 배양한 여액을 이용하였을 경우에는 그림 12에서 보는 바와 같이 완전 정제됨을 알 수 있었다. 그림 8A에서 산성 fraction (6번 lane)에는 여러 단백질이 존재함을 보여주고, 중성 fraction (11~14)에는 상당히 정제되었지만 chitinase이외의 단백질이 있음을 보여 준다. 그러나 알칼리 fraction, 특히 18~20 fraction에는 오직 chitinase만 존재함을 알 수 있다. 따라서 18-20 fraction의 단백질만 모아서 투석 후, SDS-PAGE에서 분석한 결과 (그림 12B), chitinase만 깨끗이 정제되었음을

알 수 있었다.

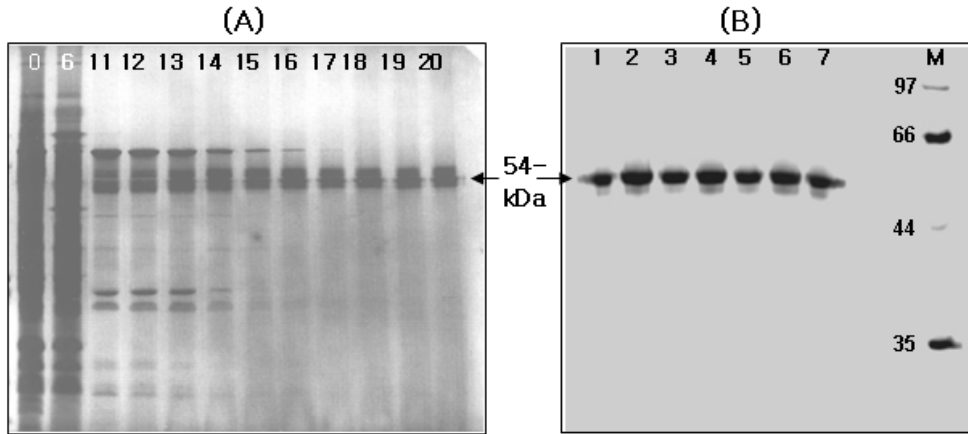


그림 12. chitinase 유전자를 지닌 *E. coli* 의 배양여액으로부터 chitinase 의 one-step purification. (A) Rotofor cell 의 각 분획에 있는 단백질, 0; LB+chitin 배지의 배양여액, 6~20; 각 분획, (B) 정제된 단백질

다) 정제된 chitinase의 특성

기질인 4-MU(GlcNAc)₂에 대한 chitinase 활성은 50C에서 가장 높았다. 또한 정제된 효소를 각 온도에서 2시간 동안 둔 후, chitinase 활성을 조사하였을 경우, 40 C까지는 안정하였으나, 그 이후 급격히 저하되었다(그림 13)

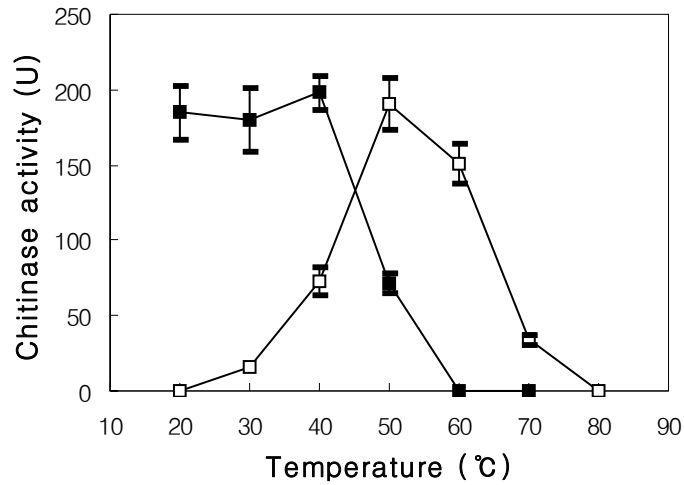


그림 13. 온도에 따른 정제된 chitinase의 활성 (□)과 안정성 (■)

한편, 4-MU(GlcNAc)₂와 colloidal chitin에 대한 활성은 pH 7.0에서 가장 우수하였으나, crystal chitin에 대한 활성은 pH 10.0에서 가장 우수하였다. 정제된 효소를 각 pH에서 2시간 동안 보존 후, pH 7.0에서 4-MU(GlcNAc)₂에 대한 활성을 조사한 결과, pH 10에서 가장 높은 활성을 나타냈다(그림 14). 따라서 이 chitinase는 기질에 따라서 최적 pH가 다르고, 안정성은 pH 10에서 가장 높음을 알 수 있었다.

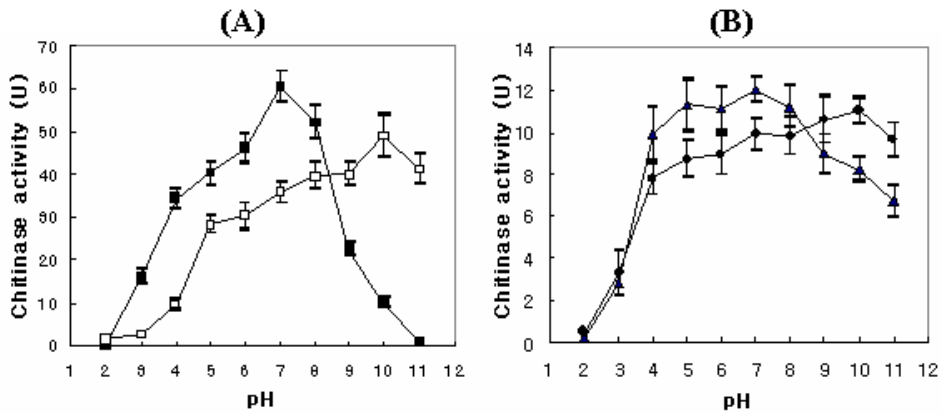


그림 14. pH에 따른 정제된 chitinase의 활성과 안정성. 4-MU-(GlcNAc)₂ (■), colloidal chitin (▲), crystal chitin (●)에 대한 활성과 안정성(□)

나. Chitin deacetylase 유전자의 클로닝

가) cDNA library의 구축

(1) RNA 분리

*Rhizopus microsporus var. oligosporus*로부터 분리된 total RNA를 대상으로 polyA⁺ RNA를 분리한 결과 0.3 ug/ul의 mRNA를 얻었다 (그림 15). mRNA의 크기는 0.5 ~ 2.5 kb 범위에 속하였다.

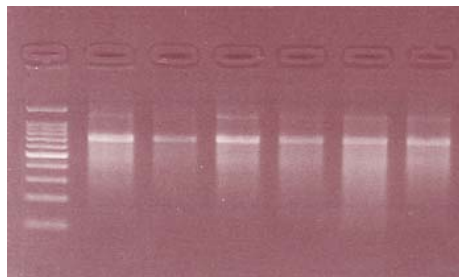


그림 15. *Rhizopus microsporus var. oligosporus*로부터 분리된 mRNA

(2) cDNA library의 구축

mRNA로부터 합성된 cDNA를 ZAP Expression vector에 구축하여 primary library로 하였다. 이 primary library 1 ul를 *E. coli* XL1-Blue MRF'에 transfection하여 IPTG와 X-Gal을 포함하고 있는 LB plate 위에 형성되는 plaque 수와 발색여부를 조사한 결과 500 ul에 8.7×10^5 pfu, blue colony 비율이 약 8.3%로서 870,000개 이상의 clone을 얻었고, 그 중 약 92%가 insert DNA를 포함하고 있을 것으로 예측되었다. 이들 중 무작위로 선택하여 M13 reverse와 M13 forward primer로 PCR한 결과 plaque 모두 0.5 - 2.5 kb 정도의 insert DNA를 포함하고 있는 것으로 확인되었다 (그림 16).

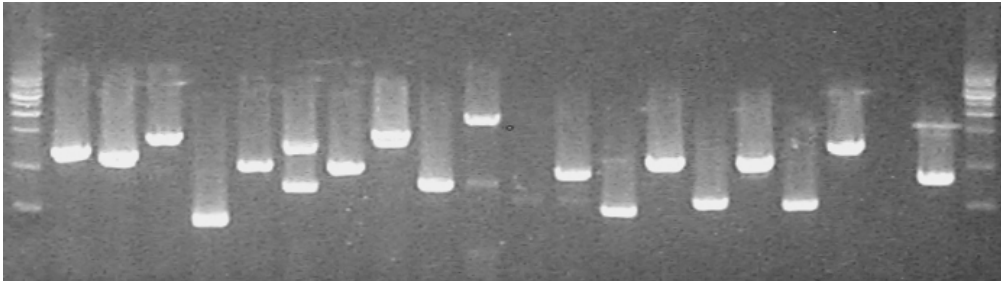


그림 16. cDNA library의 insert DNA 분석

이 primary library를 15 cm LB plate 당 5×10^4 plaque가 되도록 도말하여, 37°C에서 밤새 배양한 다음, plate당 10 ml의 SM buffer를 처리하여 회수하고 원심분리 및 chloroform처리에 의해서 phage solution을 얻어서 DMSO 최종농도 7%를 첨가하여 -70°C에 보존하였다.

나) Chitin deacetylase cDNA clone의 선발

(1) Probe 제작 및 hybridization

Rhizopus 속에서 클로닝된 chitin deacetylase 유전자가 2개 정도로 극히 제한적이므로 이 중 보고된 *Rhizopus oryzae*의 chitin deacetylase 유전자를 모델로 3 부분 (밑줄 이탤릭체)에서 30 bp 정도의 probe를 제작하

었다 (그림 17).

```
1 actttcttta cccttgaca ciccttcttt atagacaagA TGtacattaa aacttctgcc
61 attgcaattg cccttttaca agtagcttgc ttcgctgaag ctgctaagaa gacttcaaag
121 agcagcaagt ctccaagct tgacaaacct caagattact ggaggaactt caaatctttg
181 gttgatoccta acaatatcac tattgctgat atccccaaa ctacatctac caaccccagc
241 gatgaatgta aatggtacga accccctagc aactttgtct acaacaccaa agaatggccc
301 aacctttggg aaattgccac ttccaatggt atgacaaaga cctctgaatt ccaagccctt
361 aacaagtcca ttgactggac caaggccccc aagattcctg tccgtaaggc tggctctgat
421 ggtggctctg acatgaccag ttactctgac agtgaccctg actgttggtg gtcttcttcc
481 acttgtacca agcccaagca caaggataac aatgaagaca ttacgcttg tctgaacct
541 gaaacctggg gtcttactta cgatgatgga cctaactgtt ctacaaatgc tttctatgac
601 taccttgagc aaaacaaaa caaggccagt atgttctaca ttggttctaa cgttgttaac
661 tggccctatg gtgctcaacg tgggtcaag gctggtcacc atatcgctga tcacacttgg
721 tctaccaat tgatgactac tcttactaac gatgaagttt tggctgaact ttattacact
781 caaaaggcca tcaagatggt tactgggtgc actcccctc actggcgtcc cgctttcggg
841 gatgttgatg acogtgcg ttggattgcc actcaactt acttgactac tgttctctgg
901 aacctcgata ctgatgactg ggctgctggt tctagcaaga ctcttgatga agttaaggct
961 acctagata gctatgtga aatgggttcc aacgtactt ttgctactag cggccaaatt
1021 gtcttgactc acgaaattga caacaccacc atgtctcttg ctatggaata cttgcccaag
1081 atcaaggctg cctacaagaa ogttgttgat gttgccacct gtatgaacat cacttacccc
1141 taccaagaac acaatgtcag tttogctcct ttggtagcg cogccgacga atccactgct
1201 actttactg atgccactgc ttcttctgct agtgcttctg ctgctggcac ttcagatgaa
1261 cctgggacca ctgttatccc cttgctgcc aataaggctc aaatgcctc tgccggtatt
1321 caagttaacc ctaacagctt agtattcget gctttcgttg ctgctgctta cttctttTAA
1381 attttgcgat aaacattttt aatttacata aatcatttta ttccaaaca aaaaaaaaaa
1441 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa
```

그림 17. *Rhizopus oryzae*의 chitin deacetylase 유전자의 구조

(2) 증폭된 cDNA library의 titer

LB plate (지름 15 cm) 당 5×10^4 plaque 정도 되도록 도달하기 위하여 library의 titer를 조사한 결과 증폭된 cDNA library는 1 ml당 2.3×10^8 pfu이었다.

(3) Probe를 이용한 plaque의 선발 : 15 cm NZY plate 당 5×10^4 plaque가 되도록 도말하여 plaque를 형성한 후, nitrocellulose membrane에 replica를 사용하여 hybridize된 plaque들을 선발하였으나 실패하였다.

(4) Chitin deacetylase 분리

Rhizopus microsporus var. *oligosporus*가 생산한 chitin deacetylase의 특성을 알기위하여 PDB에서 5일 동안 배양하여 얻어진 배양여액을 SDS-PAGE한 결과, 약 60 kDa과 45 kDa의 두 밴드에서 검출되었다. 이들 중 60 kDa의 효소는 단백질 농도가 낮았을 경우에도 검출되었으나(그림 18. I, II, III 밴드), 45 kDa의 효소는 농도가 낮았을 경우 검출되지 않았다(그림 18. II 밴드). 이들 두 chitin deacetylase가 각각의 유전자에 의해서 생산되는지, 60 kDa의 효소가 분해되어 45 kDa의 효소가 생성된 것인지를 알 수 없지만 60 kDa이 주효소임을 알 수 있었다.

이들 chitin deacetylase는 이 균주가 생산하는 여러 단백질 중 매우 약한 밴드에서 검출되었다 (그림 18, 왼쪽). 따라서 이들 chitin deacetylase를 특이적으로 더 많이 생산하게 하는 배양 체계를 확립하는 것이 필요하다. 이전 실험에서 이들 효소는 chitin이나 chitosan에 의해서 유도되지 않았지만 탄소원의 양을 줄이면서 이들 유도체를 첨가하는 실험이 요구된다.

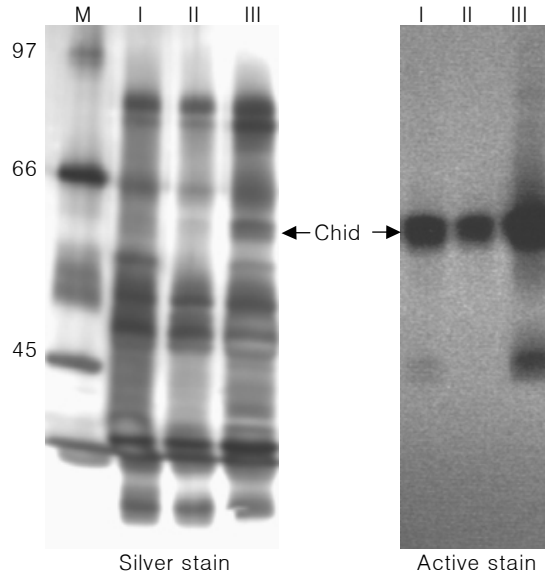


그림 18. *Rhizopus microsporus var. oligosporus*가 생산한 chitin deacetylase의 SDS-PAGE 분석

(5) Chitin deacetylase 항체의 조제

Rhizopus microsporus var. oligosporus 배양 농축액을 SDS-PAGE 후 활성 염색하여 chitin deacetylase 활성을 보이는 밴드 중 60 kDa 밴드를 오려 미세하게 분쇄 한 후 쥐에 3회 주사하여 항혈청을 얻었다.

(6) Chitin deacetylase 항체에 교잡된 cDNA plaque의 선발

(가) 1, 2차 항체의 역가를 평가하기 위한 예비 실험 : nitrocellulose membrane에 결합된 단백질 chitin deacetylase의 검출에 우수한 1차 항체의 농도, 1차 항체의 반응에 우수한 2차 항체의 농도를 결정하기 위하여 dot blot test를 한 결과, 1차 항체는 250배, 2차 항체는 5000배 희석한 것이 우수하였다.

(나) 항체에 hybridize된 plaque의 선발 : NZY plate 당 5×10^4 plaque가 되도록 도말하여 plaque를 형성한 후, IPTG를 처리한 nitrocellulose membrane을 올려놓고 37°C에서 3.5시간 배양하여 chitin deacetylase가 발현하도록 한 다음, *picoBlue*TM immunoscreening kit (Stratagene, USA) 을 이용하여 항체에 hybridize된 plaque들을 선발하였다. 2차로 hybridize하여 총 25개의 positive plaque를 얻었으며 (그림 19), 이들의 insert DNA는 불균일하였다 (그림 20).

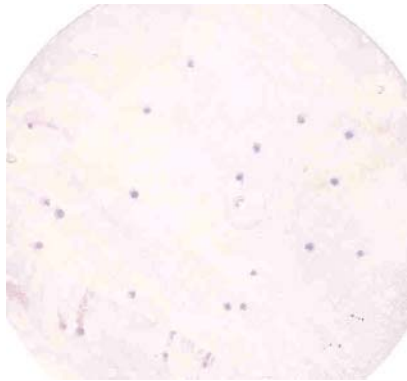


그림 19. Chitin deacetylase 항체에 hybridize된 plaque의 선발

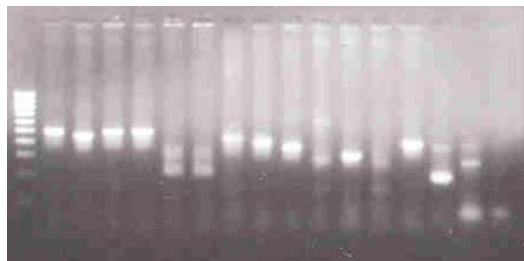


그림 20. Positive clone의 DNA 분석

(7) Chitin deacetylase를 생산하는 cDNA plaque의 선발 : 항체에 hybridization 된 25개의 plaque 중에서 chitin deacetylase를 생산하는 2개의 plaque RCDA-1번과 2번을 선발하였다.

다) Chitin deacetylase cDNA의 분석

(1) Chitin deacetylase cDNA의 *E. coli*로 도입

이들 plaque를 *E. coli* XL0LR 내로 도입 후, 재조합 *E. coli*의 배양 여액, periplasm 및 cytoplasm에 있는 chitin deacetylase 활성을 측정 한 결과 배양여액에서는 검출되지 않고, periplasm과 cytoplasm에서만 검출되었다. 2개의 클론 중 약 2배의 chitin deacetylase 활성을 보이는 RCDA-1을 후속 실험 대상으로 하였다.

(2) Chitin deacetylase cDNA의 염기서열

RCDA-1에 존재하는 cDNA를 대상으로 염기서열을 분석한 결과 1,308 bp의 ORF가 존재하였으며, 이는 435개 아미노산으로된 단백질을 코딩하는 것으로 분석되었다 (그림 21). 예상되는 단백질의 분자량은 48,000 Da이었으며, 상기에 분석된 분자량 60 kDa와 비교할 때 glycoprotein으로 판단된다. 이 효소단백질은 다른 곰팡이의 chitin deacetylase 단백질과 69% 이하의 유사성을 나타내었다. 이 효소 단백질의 중간 지역에 conserve하게 조사되는 지역은 다른 chitin deacetylase 단백질과 매우 유사한 아미노산 서열을 나타냈다.

```

atg tat aat tat act gct tca atg gcg acg gca ctg tta cag gta tct agc gtc cct gta 60
M Y N Y T A S M A T A L L Q V S S V P V
gtt gct gag tat cct aca gat agc tgc atg tcg tca aac cta gac aga cct aaa tat gac 120
V A E Y P T D S C M S S N L D R P K Y D
tac cta aac ttc agc tca ttg gtt gat cct atc aat atc act att gtt gat atc ccc caa 180
Y L N F C S L V D P I N I T I V D I P Q
act aca tct acc agc ccc agt gtt gaa tgt aac tgc ttc gaa ccc ttt ggc tat aac atc 240
T T S T S P S V E C N C F E P F G Y N F
aga gaa tgg ccc aat cgt tgg gct gtt gcc act tcc aat ggt atg aca aga agg tgg gaa 300
R E W P N R W A V A T S N G M T R R W E
ttc caa gcc ctt agc cag tcc att gac tgg acc aag gcc ccc agg gtt cct gtc cgt aag 360
F Q A L S Q S I D W T K A P R V P V R K
agt ggc act gct ggt ggt ctt gac atg acc aat tac gtt gac agt gac cct gac tgt tgg 420
S G T A G G L D M T N Y V D S D P D C W
tgg tct tct ccg act tgt atc agg ccc aag cgt gac gag atc aat gga gac ttt tac gct 480
W S S P T C I R P K R D E I N G D F Y A
tgt cct gaa cct cac gcc tgg ggt ctt act tac gat gat gaa cct aac tgt tct cac aat 540
C P E P R A W G L T Y D D G P N C S H N
gct ttc tat gac tac ctt gac caa aac aaa atc aag gcc agt atg ttc tac att ggt tct 600
A F Y D Y L E Q N K I K A S M F Y I G S
aac gtt gtt aac tgg ccc tat ggt gct caa cgt ggt gtc aag gtt ggt cac cat atc gct 660
N V V N W P Y G A Q R G V K V G H H I A
glt cac act tgg tct cac caa ttg atg agt act ctt act aac gca gaa gtt ttg gct gaa 720
V H T W S H Q L H S T L T N A E V L A E
ctt tat tgg act caa aag gcc atc aag att gtt act ggt gtc act ccc cgt ctt tgg cgt 780
L Y W T Q K A I K I V T G V T P R L W R
ccc gct ttc ggt gat gtt gat gac cgt gtc cgt tgg att gcc act caa ctt tcc ttg act 840
P A F G D V D D R V R W I A T Q L S L T
act gtt ctc tgg aac ctc gat act gat gac tgg gct gct ggt tcc gcc gag act cga gaa 900
T V L W N L D T D D W A A G S G E T R E
gat gtt agc gtt gcc tac gac agt cat gct gaa atg ggt tcc aac ggt act ttt gct att 960
D V S V A Y D S H A E M G S N G T F A I
gcc gcc cca att gtc ttg att cac gaa att gcc aac tcc acc ata tcg cga gct atg gat 1020
A G P I V L I H E I A N S T I S R A M D
tcc ttg ccc aag agc aag act gcc tac acg tac gtt aat gat gtt gcc acc tgt atg aac 1080
S L P K S K T A Y T Y V N D V A T C M N
atc act tcc ccc tac caa gaa tcc att gcc agt ttc gtt ttt tat gct tcc gcg cta gcg 1140
I T S P Y Q E S I A S F V F Y A S A L A
atg cta gct cga tcg atc gct agc ttt gag gct act ttc act gat gcc act gct tct tct 1200
M L A R S I A S F E A T F T D A T A S S
gct agt gct tct gct gct ggc act tca gat gaa cct ggg acc gcc ctt gcc aat aag gct 1260
A S A S A A G T S D E P G T A L A N K A
cag ctc gat aca tcg cct ctg ccg gta ttg tta acc cta aca gcg taa
Q L D T S P L P V L L T L T A *

```

그림 21. *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*의 chitin deacetylase cDNA 염기서열

다. *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자 도입 및 발현

1) 벡터 구축

Chitin deacetylase의 *Bacillus* cloning에 pWB705 벡터 (그림 22)를 사용하였다. 이 벡터를 EcoRI으로 부분절단하여 SacB SP 안쪽에서 절단된 벡터에 chitin deacetylase cDNA가 연결되도록 하였다. Insert인 chitin deacetylase cDNA는 활성 클론 RCDA-1에서 얻은 플라즈미드를 사용하였다. 먼저 *Bacillus subtilis*의 WB700과 WB800의 형질전환주를 competent cell을 만들어 vector만을 사용하여 plasmid의 *Bacillus subtilis* 형질전환 조건을 수립하였다. *Bacillus subtilis* competent cell은 SPI 배지에 밤새 키운 균을 접종하여 37°C에서 약 4시간 키워 OD600이 약 0.6되게 한 후, 이 배양액 0.5 ml을 4.5 ml의 SPII 배지에 넣어 37°C에서 90분간 키운 다음 EGTA 용액 0.05 ml을 넣고 5분간을 더 키웠다. DNA 시료를 0.5 ml의 competent cell과 섞어 90분간 배양하였다. 이 때, WB700 (pRDA83)과 WB800 (pRDA83)은 kanamycin이 들어있는 평판배지에 도말하였고, 37°C에서 15시간 키웠다. 자라난 transformant 각각 8마리씩을 무작위로 선발하여 이들을 액체 배양하여 효소 활성을 정량하였고, 그 중 가장 활성이 높은 transformant를 선택하여 이후 실험에 사용하였다. *B. subtilis* WB700 (pRDA83)과 WB800 (pRDA83)의 상층액을 회수하여 효소활성을 조사한 결과, WB800 (pRDA83)에서 0.45 U/ml로 나타났으며, 이는 당초 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*의 배양액에서 얻은 0.074 U/ml 보다 약 6배의 증가된 결과이다.

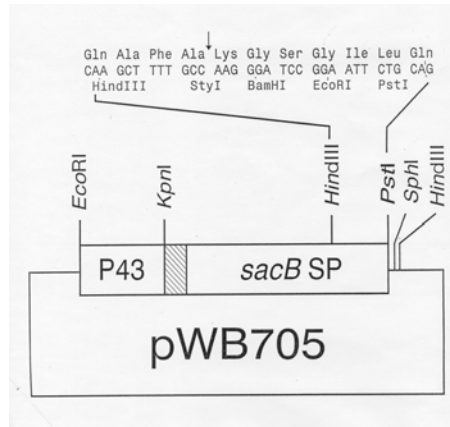


그림 22. Expression vector pWB705 for *Bacillus subtilis* transformation

2) *Bacillus subtilis* 형질전환주에서 생산된 chitin deacetylase의 특성

Bacillus subtilis WB800 (pRDA83)를 12시간 배양하여 상층액을 얻어 앞에서 기술한 chitin deacetylase 정제하는 방법과 동일한 방법으로 정제하여 전기영동과 활성염색을 수행하였다. 그 결과 형질전환주에서 공시균주의 상층농축액과 동일한 60 kDa 근처에서 활성 띠를 보였다 (그림 23). 이 결과로부터 공시균의 주 chitin deacetylase 유전자가 형질전환주에서 발현되는 것으로 확인되었다.

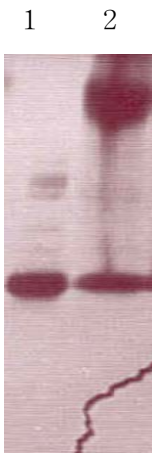


그림 23. *Bacillus subtilis* 형질전환주에서 생산된 chitin deacetylase의 활성염색. 1, wild type; 2, *Bacillus subtilis* WB800 (pRDA83)

4. 결과 요약

가. DNA shuffling

총 5,500개의 형질전환주를 얻었으며, 활성이 있는 변이체를 일차적으로 선발하여 35 positive clone 중 9개의 우수변이체 후보를 선발하였다. 고효성 chitinase 1개 (Chi2-389), 내열성 chitinase 1개 (Chi2-33)를 얻을 수 있었으며, 내알칼리성 chitinase는 야생형과 유사하였다. 변이체 Chi2-389는 야생형 chitinase 보다 16% 정도 비활성도가 높게 나타났으며, 변이체 Ch2-33은 최적 온도가 B8-25는 50℃로 야생형과 비슷하였으나 열안정성은 야생형 보다 18% 높게 나타났다. 변이체 Ch2-33과 Ch2-389의 경우 분자량의 변화가 없는 것으로 보아 변이 효소의 내부적인 절단이나 말단들의 변형은 없는 것으로 추정된다.

ChBD 대신 CBD와 XBD를 ChBD 부위의 염기서열과 치환한 domain 치환체를 얻었다. 대부분의 효소는 세포내에 존재하였고, ChBD가 결손된 Chi48은 활성이 매우 미약하였으며, CBD가 ChBD 보다 colloidal chitin에 대한 친화력을 더 높게 반영하는 것으로 나타났다. CBD와 ChBD가 연속으로 존재할 경우, 단독으로 존재할 경우 보다 기질에 대한 친화력을 증가시켰으며, XBD는 CBD 보다 그 효과가 약하다는 것을 알 수 있었다.

나. cDNA library의 구축 및 chitin deacetylase 클론 선발

*Rhizopus microsporus var. oligosporus*로부터 0.5 ~ 2.5 kb 범위의 mRNA를 얻었다. mRNA로부터 합성된 cDNA를 ZAP expression vector에 구축하여 약 870,000개의 primary library를 확보하였다. *Rhizopus oryzae*의 chitin deacetylase 유전자를 모델로 3 부분에서 30 bp 정도의 probe를 제작하여 hybridize를 수행하였으나 positive clone을 얻지 못하였다. Chitin deacetylase 항체에 교잡된 cDNA plaque들을 선발한 결과 총 25개의 positive plaque를 얻었다. 이 중 chitin deacetylase를 생산하는 2개의 plaque를 선발하였다. 이들 plaque를 *E. coli* XL0LR 내로 도입한 결과, chitin deacetylase 활성은 배양여액에

는 검출되지 않고, periplasm과 cytoplasm에서만 검출되었다.

활성이 높은 RCDA-1에 존재하는 cDNA는 1,308 bp의 ORF가 존재하였으며, 이는 435개 아미노산으로된 단백질을 코딩한다. 예상되는 단백질의 분자량은 48,000 Da이었으며, 활성염색에서 분석된 분자량 60 kDa와 비교할 때 glycoprotein으로 판단된다. 다른 곰팡이의 chitin deacetylase 단백질과 69% 이하의 유사성을 나타내었다. 이 효소 단백질의 중간 지역에 보존된 아미노산 서열을 나타냈다.

다. *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자 도입 및 발현

Chitin deacetylase의 *Bacillus* cloning에 pWB705 벡터를 사용하였다. 이 벡터를 EcoRI으로 부분절단하여 SacB SP 안쪽에서 절단된 벡터에 chitin deacetylase cDNA가 연결되도록 하였다. *Bacillus subtilis*의 WB700과 WB800 competent cell 방법으로 형질전환을 수행하였다. 그 중 가장 활성이 높은 transformant *B. subtilis* WB700 (pRDA83)과 WB800 (pRDA83)의 상층액을 회수하여 효소활성을 조사한 결과, WB800 (pRDA83)에서 0.45 U/ml로 나타났으며, 이는 당초 공시균주 배양액에서 얻은 0.074 U/ml 보다 약 6배의 증가된 결과이다.

Bacillus subtilis WB800 (pRDA83)를 12시간 배양하여 상층액을 얻어 전기영동과 활성염색을 수행한 결과 형질전환주에서 공시균주의 상층 농축액과 동일한 60 kDa 근처에서 활성 띠를 보였다. 이 결과로부터 공시균의 chitin deacetylase 유전자가 형질전환주에서 발현되는 것으로 확인되었다.

제 2 절 Chitinase, 키틴 및 키토올리고당을 이용한 식물 병 방제효과 증진 시스템 확립

1. 서론

1960년대 이후 고도 성장기에 접어들면서 화학물질을 이용한 각종 산업이 인간에 기여한 공로는 인정되지만, 환경오염과 안정성 문제 때문에 이제는 모든 분야에서 생물적 방법을 이용해야 할 시기에 와 있다. 작물의 병해충도 이제는 유기합성 농약을 사용하지 않고 방제해야 할 시기에 와 있고, 이를 대체하기 위하여 현재 무수한 친환경자제들이 나오고 있다. 그러나 대부분의 친환경자제들은 방제효과가 낮아 농민들에게 외면당하고 있는 실정이다. 따라서 병 방제효과가 더 우수한 친환경자제를 개발하는 것이 무엇보다 더 중요한 시점이다.

식물 병을 억제하는 것으로 알려진 키틴분해미생물은 국내,외에서 많이 보고되었다(40-42, 54). 이들 균주들이 생산하는 Chitinase는 식물병원진균 세포벽의 주요 구성성분인 키틴을 분해하여 병을 억제하는 것으로 알려져 있다(30, 43, 51). 아울러 Chitinase는 곤충의 장내 세포를 분해하여 농작물에 피해를 주는 해충도 억제하는 것으로 보고되었다(4, 5).

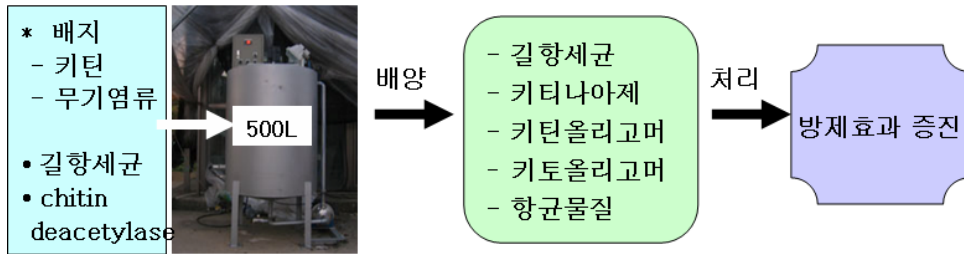
키토산은 복숭아, 배 및 참다래, 오이 및 고추, 딸기, 토마토 등의 저장을 증진시킬 수 있는 것으로 보고되었고(50), 현재 여러 키토산이 각종 식물병을 방제 혹은 작물 생육을 촉진하는 것으로 일반 농가에 많이 판매되고 있다. 그러나 모든 키토산이 모든 병원균을 억제하는 것이 아니라 키토올리고당의 종류, 병원균의 종류에 따라 억제정도가 각각 다른 것으로 알려져 있다(37, 38, 47, 48). 특히, 특정의 키틴 혹은 키토올리고당은 식물 병원균뿐만 아니라 인간, 가축의 병원균 및 식품의 여러 부패균들을 억제하는 것으로 보고되었기 때문에, 이들을 조제하기 위한 연구도 많이 이루어지고 있다(1, 7, 22, 70).

한편, 키틴 및 키토산을 토양에 처리하였을 경우에는 유용미생물이 증식하여 작물의 뿌리가 촉진된다는 보고(한국, 출원번호 10-1994-0000305)가

있고, 키틴분해미생물들을 퇴비 조제 시에 첨가하여 토양에 처리하면 식물병이 방제된다는 보고 (한국, 출원번호 10-1997-0026538, 출원번호 10-2004-0020482) 등도 있다. 본인도 키틴분해성 길항미생물들인 트리코데르마속(*Trichoderma* sp.)과 크로모박테리움속(*Chromobacterium* sp.)을 키틴이 함유된 상토에 처리하고 작물을 육묘 후 포장에 이식하였을 경우 작물의 생육은 물론 토양병을 억제한다는 것을 발견하였다(한국식물병리학회지, 2003).

그러나 무엇보다 중요한 것은 유기합성농약정도의 방제효과를 보여 주어야 한다. 일반적으로 생물농약들은 식물체내로 스며들지 못하고 표면에만 존재하기 때문에 유기합성농약에 비하여 방제효과가 더 낮다. 또한 현재 개발되어지고 있는 생물농약들은 길항미생물을 배양하여 제제화해야 하기 때문에 노력은 물론 비용이 많이 소요된다. 따라서 미생물제나 생물농약이 성공하기 위해서는 기존보다 더 큰 방제효과를 낼 수 있어야 하고, 조제하는데 소요되는 노력과 비용이 더 절감되어야 한다.

이런 측면에서 본 과제는 적은 비용으로 쉽게 조제하여 유기합성농약 정도의 큰 병 방제효과를 나타낼 수 있는 식물병 방제제를 개발하는데 목표를 두고 실시되었다. 이를 달성하기 위하여 본 과제에서는 그림에서와 같은 가설을 세웠다. 즉, 대량배양기에 키틴과 길항력을 지닌 키틴분해세균을 넣고 배양하면 Chitinase와 병원균 억제물질을 분비하고, Chitinase는 키틴을 키틴올리고머로 전환시키며, 여기에 chitin deacetylase를 첨가하면 키틴올리고머들이 키토올리고머로 전환될 것이다. 이런 배양액을 식물체에 처리하게 되면 키틴분해세균, Chitinase, 항균물질, 키토올리고머들이 복합적으로 병원균 억제에 관여하고, 또한 키틴 혹은 키틴올리고머들은 길항세균의 영양원으로 역할을 할 것이다. 이런 가설을 증명하기 위하여 본 과제에서는 첫째, chitin deacetylase 생산균주를 선발하여 효소를 분리, 정제하였고, chitinase 생산균주로부터 효소를 분리, 정제하였다. 두 번째로는 키틴 혹은 키토올리고머, Chitinase의 항균 활성을 조사하고, 두 효소에 의하여 키틴-->키틴올리고머-->키토올리고머로 전환되는 과정 및 패턴을 분석하였다. 세 번째로 대량배양기에서 이들을 극대화될 수 있는 조건을 선정하고, 여기에서 얻어진 배양액의 식물 병 방제효과를 조사하였다.



(간편하면서도 병 방제효과가 우수한 미생물제(배양액)의 개발 전략)

2. 재료 및 방법

가. Chitin deacetylase 생산 균주의 선발 및 효소 특성

1) Chitin deacetylase 생산균주의 선발

가) 공시균주 : KCTC로부터 분양받은 22균주, KACC로부터 5균주, ATCC로부터 1균주, 그리고 본 실험실에서 분리한 키틴분해미생물 35균주(표 1)에 대한 chitin deacetylase 생산여부를 세포질에서 추출한 액과 배양여액에서 조사하였다.

나) 효소액의 조제

(1) 배양여액 : 각 균주의 배지와 최적온도에서 배양 후 filter paper 통과한 액의 효소 활성을 측정하였다.

(2) 세포질 추출 : 상기에서 얻어진 균사를 냉동 후, 균사 (4 g)과 glass bead (6 g)을 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) + 100 mM NaCl + 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride에 넣고 얼음 속에서 1시간 동안 blend하였다. 그 후 glass bead를 제거하고 4℃, 10,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 얻어진 상등액을 50℃ water bath에서 30분 동안 항온 후, 원심분

리에 의해서 침전된 물질을 제거하고 상등액을 조효소로 하였다.

다) 효소 활성 측정

Chitin deacetylase 효소 활성은 glycol chitin을 사용하여 상기 기술된 바와 같이 수행하였다.

2) chitin deacetylase의 특성 조사

가) 균주, 배지 및 배양 : *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*의 포자 현탁액 (10^5 포자/ml)을 PDB, YPG, 키틴+기본배지, 키틴 혹은 키토산이 첨가된 PDB 배지에 접종, 200 rpm의 항온교반기 (25°C)에서 배양하였다. 배양기간에 따라 채취된 배양여액은 filter paper를 통과 후, 효소활성을 측정하였다.

나) 조효소액의 조제 과정 및 방법

- 5일 배양액을 filter paper 통과(통과된 액 = 2,000 ml)
- 통과된 액 1000 ml를 2 L 삼각후라스크에 넣고 ammonium sulfate 700 g을 서서히 첨가하면서 녹임 (2000 ml = 1000 ml x 2개 후라스크)
- 저온실에 하룻밤 stirring (total 약 3000 ml)
- 3000 ml을 4°C, 13000 rpm에서 10분 원심분리
(50 ml 원심튜브에 상기액 50 ml 넣고 원심--> 상등액 버리고 상기액 50 ml 넣고 원심 --> 상등액 버리고 상기액 50 ml 넣고 원심
- * 1개의 50 ml tube : 50 ml씩 넣고 5번 실시 = 250 ml의 액에 대한 pellet
- * 6개의 tube = 250 ml x 6 = 1500 ml
- * 3000 ml = 12개의 tube에 50 ml씩 5번 실시
- 1개 tube의 pellet에 20 mM KH_2SO_4 +NaOH buffer (pH 7.0) 1.25 ml 씩 넣고 녹임 (12 tube x 1.25 ml = 15 ml)
- 투석 : 1개 membrane에 5 ml씩 넣고 저온실에서 overnight 투석
20 mM KH_2SO_4 +NaOH buffer (pH 7.0)로 3번 갈아 줌

다) 단백질 농도 측정 : Microplate에 Bio-Rad Assay를 1:4비율로 희석한 Dye 200 μ l를 넣고, Standard로는 Bgg 0.7 mg, 0.35 mg, 0.175 mg, 0.0875 mg, 0.438 mg, 0.219 mg를 10 μ l씩 넣고, 효소는 추출된 배양여액 20 μ l를 넣고, 595nm (Elisa Reader system)에서 단백질 농도를 측정하였다.

라) SDS-PAGE 후의 chitin deacetylase 활성 검출

상기에 기술된 방법으로 만들어진 0.01%(w/v) glycol chitin과 0.1% SDS를 포함한 gel에서 전기영동 후, 그 gel을 1% Triton X-100이 함유된 pH 5.0의 100 mM sodium acetate buffer에 넣고 37°C에서 3시간 동안 진탕 배양 후, 어둠상태에서 0.01% calcoflour white M2R (Sigma, F 6259)으로 5분 동안 염색하였다. 염색된 gel을 증류수로 1시간 이상 탈색시킨 후 lytic zone을 UV-transilluminator상에서 관찰하였다.

마) Chitin deacetylase의 분리, 정제 및 특성

(1) Chitin deacetylase 의 분리, 정제

*Rhizopus microsporus var. oligosporus*를 PDB에서 5일 동안 배양하여 얻어진 배양여액을 ammonium sulfate로 침전시킨 후, 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0)으로 용해하였다. 용해된 산물은 원심에 의해서 침전물은 제거되고 상등액을 HiLoad Superdex 75 column에서 1시간 당 30 ml의 flow rate로 elution시켰다. 효소 활성을 나타내고 SDS-PAGE에 의해서 효소의 band를 지닌 fraction들 (2 ml/fraction)은 모아서 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 투석하고, HiLoad Q Sepharose column에 처리되었다. 그 column은 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 20 ml로 세척되고, NaCl (0~0.5 M)의 linear gradient로 elution (30 ml/h) 되었다. 효소활성을 갖는 fraction (1 ml)은 SDS-PAGE에서 확인 후 25 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0)에 투석되었다.

(2) 온도에 대한 활성 및 안정성 : *N*-acetylchitohexaose((GlcNAc)₆), 정

제된 효소, 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH 7.0)의 반응물을 eppendorf tube 에 넣고 20~80°C에서 10분 보존 후 활성을 측정하였다. 안정성은 상기의 반응물을 20~80°C에 1~4시간 보존 후 활성을 측정하였다.

(3) pH에 대한 활성 및 안정성 : 2~11의 pH 범위 내에서 $(\text{GlcNAc})_6$ 에 대한 활성을 측정하였다. 안정성은 정제된 효소를 각 pH에서 2시간 동안 둔 후 측정하였으며 각 buffer는 chitinase에서와 동일하다.

나. Chitinase, 키틴올리고당, 키토올리고당의 항균 활성 및 조제 과정

1) 항균 활성 조사

가) 공시 병원균 및 물질 : *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria panax*, *Fusarium oxysporium*, *Botrytis cinerea* 등에 대한 정제된 키틴아아제, 2~6당의 키틴올리고당과 키토올리고당의 항균 활성을 조사하였다.

나) 항균 활성 조사 과정 및 방법 : 공시 병원균을 PDA, 25°C에서 10일간 배양하여 포자를 형성시키고, 형성된 포자를 멸균수로 채취 후 거즈 2겹을 통과하였다. 채취된 포자현탁액 50ul와 1/2 PDB 50ul를 microplate에 넣고 Chitinase, 키틴 혹은 키토올리고당을 50ul씩 첨가하여 25°C에서 18시간 배양 후 현미경하에서 포자발아율을 조사하였다.

2) 키틴올리고당 및 키토올리고당의 조제 과정 및 방법

가) chitinase를 이용한 키틴올리고당의 조제

(1) chitinase에 의한 키틴올리고당의 분해 능력 : 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.0) buffer에 함유된 정제된 효소 (5U/g 기질)와 1mM chitohexaose를 45 C에 5, 10, 15, 30 및 60분을 둔 후, TLC plate (silica gel plate 60 F254 (Merck)에 loading 하여 n-propanol/water/ammonia water (70:30:1, v/v)에서 전개되었다 이 plate 는 aniline-diphenylamine reagent로 분무하고 180C에서 3분 동안 baking하여 각 올리고당을 검출하였다.

(2) chitinase에 의한 키틴올리고당의 조제 : 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.0) buffer에 함유된 정제된 효소 (5U/g 기질)와 0.1% (w/v) crystal chitin을 45 C에 1, 2, 6, 12, 24 및 48시간 둔 후, 5분동안 boiling하여 HPLC에서 분석하였다. HPLC 분석은 NH2P050 4E column에서 acetonitrile : water (70:30, v/v)를 1ml/min 의 flow rate로 전개하여 210 nm에서 측정하였다.

나) 키틴올리고당으로부터 키토올리고당의 조제 과정

(1) Chitin deacetylase 의 생산, 분리, 정제 및 특성

키토올리고당을 조제하기 위하여 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*의 포자현탁액 (10^5 포자/ml)을 PDB, YPG, 키틴+기본배지에 접종, 분당 200 rpm의 항온교반기 (25C) 에서 배양하였다. 배양기간에 따라 채취된 배양여액은 filter paper를 통과 후 상기에서 기술된 방법에 의하여 효소활성 측정,정제 및 특성을 조사하였다.

(2) chitin deacetylase를 이용한 키토올리고당의 조제

(가) 키틴올리고당에 따른 chitin deacetylase의 활성 : 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.0) buffer에 함유된 정제된 chitin deacetylase (50ng)와 2~6당의 키토산 및 glycol chitin (0.5mM)을 45 C에 15, 30 및 60분간 둔 후, 10분동안 boiling하여 활성을 측정하였다

(나) 키틴의 종류에 따른 chitin deacetylase의 활성 : 0.1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ (pH7.0) buffer에 함유된 정제된 chitin deacetylase (50ng)와 crystal chitin, colloidal chitin 및 glycol chitin (0.5mM)을 45 C에 12, 24 및 48시간 둔 후, 10분동안 boiling하여 활성을 측정하였다.

3. 대량의 chitinase 및 키틴올리고당의 생산과 식물 병 방제효과

가. 공시균주의 chitinase 생산 능력

Chromobacterium sp. strain C-61, *Lysobacter enzymogenes* C-3
Serratia plymuthica 및 *Streptomyces* sp. strain S-2의 키틴분해 능력

을 chitin배지에서 접종, 28°C에서 5일간 배양 후, halo zone의 크기에 의해서 판단하였다.

Chitin 배지는 증류수 1 L당 colloidal chitin, 2 g; (NH₄)₂SO₄, 3 g; K₂HPO₄, 3 g; MgSO₄ 7H₂O, 0.2 g; H₃BO₃, 5.6 mg; CuSO₄ 5H₂O, 0.4 g; ZnSO₄ 7H₂O, 0.5 mg; NaMoO₄ 2H₂O, 1.5 mg; Fe citrate, 1.0 mg; CaCl₂, 10 mg; Yeast extract, 0.2 g. pH 7.0으로 하여 고압 멸균시켰다.

나. Colloidal chitin 제조

Chitin (sigma,C-4666) 40 g을 HCl 400 ml에 넣고 1시간 동안 저으면서 녹인 후, 5~10°C에서 증류수 1.5 L를 첨가하여 chitin을 침전시킨 후 여과하여 물을 제거하였다. 수돗물 5 L를 첨가하여 chitin을 침전시킨 후, 상등액을 버리고 침전물을 여과하여 물을 제거한 후, 상등액의 pH가 중성에 가깝도록 3~5번 실시하였다.

다. 배지에 따른 키틴분해세균의 성장 및 chitinase 생산 능력

(NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄, MgSO₄ 7H₂O를 함유한 배지를 원액으로 하고 이를 1/2, 1/4로 희석하여 0.2%의 키틴을 함유한 배지 100 ml를 500 ml의 플라스크에 넣었다. 이 배지에 Nutrient broth(NB)배지에서 배양된 chitin 분해세균 100 ul를 접종하고, 28°C 180 rpm에서 배양하였다. 이 배양액을 매일 30 ml씩 채취, 20분 동안 10,000 g에서 원심분리 후 상등액에 대한 chitinase 활성을 측정하였다.

라. 대량의 chitinase 및 키틴올리고당의 생산 조건

키틴분해세균들은 28°C, 180rpm의 Nutrient broth에서 각각 1일간 배양하였다. 이 배양액 100ml를 500L의 키틴+최소영양배지를 지닌 대량배양기에 접종하고 28°C에서 배양하면서 5일 간격으로 키틴분해세균들의 밀도와 chitinase 활성을 조사하였다.

1) 키틴분해세균의 밀도 : *Chromobacterium* sp. strain C-61은 ampicillin+polymyxin, *Lysobacter* *enzymogenensis*는

ampicillin+kanamycin, *Serratia plymuthica* 는 ampicillin+novobiocin 을 첨가한 NA배지 위에서 희석평판법에 의하여 조사되었다.

2) chitinase 활성 : 상기에서 기술된 방법에 의하여 실시되었다.

마. 오이 흰가루병에 대한 병 방제효과 조사

1) 병 방제효과를 증진시키기 위한 실험 : 순천대학 구내 유리 온실에 오이를 정식하고 흰가루병의 이병엽을 처리하여 자연 발병토록 한 다음 길항세균의 단독 혹은 혼합액, 배양액과 세균액, chitin deacetylase를 첨가한 배양액과 첨가하지 않은 배양액 등을 오이 잎에 살포 후 흰가루의 변화 양상을 매일 관찰하였다. 방제효과가 우수했던 배양액을 선정하여 살포시기에 따른 병 방제효과를 조사하였고, 오이 잎 위에 처리된 길항세균의 밀도를 5일 간격으로 희석평판법에 의하여 조사하였다.

2) 비닐하우스 포장에서의 병 방제효과 조사 : 전남 순천시 대대동 김태현씨의 오이재배 비닐하우스에서 *Chromobacterium* sp. strain C-61과 *Lysobacter enzymogenensis*의 혼합배양액 원액과 10배 희석액을 10평에 2.5말을 처리하고 10일 후의 발병도를 조사하였다. 발병도(%)는 다음의 공식에 의하여 산출되었다.

$$\text{발병도}(\%) = \{ \sum(\text{발병수} \times \text{계수}) \div 4N \} \times 100$$

여기에서 0=발병 무, 1=병반 면적 1~5%, 2=병반 면적을 5.1~20%, 3=병반 면적을 20.1~40%, 4=병반 면적을 40.1% 이상으로 하였고, N=조사엽수이다.

방제가는 {(무처리군 발병도-처리군 발병도)÷무처리군 발병도}× 100에 의하여 산출되었다.

한편, 본 배양액과 시판중인 친환경 흰가루병 방제제를 오이 잎에 살포 후, 흰가루의 변화를 매일 관찰하여 흰가루가 다시 형성되기 시작하는 기간을 비교, 분석하였다

바. 오이 뿌리혹선충에 대한 방제효과

1) 포장 실험 : 2006년 전남 순천시 대대동 김태현씨의 비닐하우스 포장 오이에 본 배양액을 점적 호스를 통하여 10일 간격 4회 관주하고 수확기에

오이의 뿌리에 형성된 혹을 관찰하였다. 아울러 주변의 잡초 뿌리에 형성된 혹을 조사하여 방제효과를 검증하였다.

2) 풋트 실험 : 오이 뿌리로부터 선충알을 채취하여 풋트에 접종하고 오이 유묘를 이식한 후 배양액처리구와 무처리구간의 뿌리혹형성정도를 비교하였다.

라. 토마토의 흰가루병, 잎곰팡이병 및 균핵병에 대한 방제효과

1) 토마토 흰가루병 : 풋트 재배된 토마토에 흰가루가 발생하고 있어서 본 배양액을 살포 후 흰가루의 변화 양상을 관찰하였다.

2) 토마토 잎곰팡이병과 균핵병 : 전남 고흥군 포두면의 토마토 친환경재배 농가에서 2006년 12월에 잎곰팡이병이 발생하기 시작하여 본 배양액을 1개월 간격으로 2회 살포하여 방제효과를 조사하였다. 한편, 동일 포장에서 2월에 균핵병이 발생하기 시작하여 10일 간격 2회 살포 후 병 방제효과를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. chitin deacetylase 생산 균주의 선발 및 효소 특성

키틴의 아세틸기를 제거함으로써 키토산이 만들어지는데, 아세틸기는 알칼리(NaOH)나 chitin deacetylase를 처리하여 제거될 수 있다(61, 62). 현재 chitin deacetylase의 생산은 효모인 *Candida* spp., *Saccharomyces* spp.(34)와 진균인 *Mucor* spp.(20, 62), *Aspergillus* spp.(2) *Colletotrichum* spp.(58, 60), *Absidia* sp.(13), *Metargizium* spp. 및 세균인 *Alcaligenes* spp. 등에서 보고되었다. 따라서 이 실험에서는 KCTC, ATCC, KACC 등으로부터 분양받은 여러 균주와 게나 새우로부터 분리된 여러 키틴분해미생물로부터 chitin deacetylase의 생산능력이 우수한 균주를 선발하고, 그 효소의 특성을 조사하였다.

1) chitin deacetylase 생산균주의 선발

표 1에서 보는바와 같이 chitin deacetylase를 생산하는 것으로 보고된 *Absidia coerulea* (KCTC6900)와 *Alcaligenes* sp. (ATCC 55938) 균주는 효소를 생산하였지만 배양여액으로 분비하지 못하였다. 보고되지 않은 균주로는 *Saccharomyces cerevisiae* (KCTC 7911), *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (KCTC 6969), *Zygosaccharomyces rouxii* (KCTC 7966) 등이 생산하였는데, 특히 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* 는 다른 균주들보다 더 많은 량의 효소를 생산하고, 또한 배양여액으로 분비되었다. 이 균주는 아직 chitin deacetylase 생산균주로 보고되지 않았기 때문에 이 과제의 공시 균주로 선정하였다

표 1. chitin deacetylase 생산균주의 선발에 이용된 미생물과 그들의 효소 활성

일련 번호	균주번호	균주명	Chitin deacetylase 활성		
			세포질 추출	배양 여액	비고
1	KCTC 7911	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+	
2	7108	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	
3	7238	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	
4	7239	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	
5	7523	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	
6	7227	<i>Candida shehatae</i> var. <i>shehatae</i>	-	-	
7	7644	<i>Candida diddensiae</i>	-	-	
8	7663	<i>Candida atlantica</i>	-	-	
9	7666	<i>Candida dendrica</i>	-	-	
10	17508	<i>Candida cleridarum</i>	-	-	
11	17277	<i>Candida azyma</i>	-	-	
12	17281	<i>Candida apicola</i>	-	-	
13	6900	<i>Absidia coerulea</i>	+	-	보고된균주
14	6903	<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>fumeus</i>	-	-	
15	6987	<i>Aspergillus versicolor</i>	-	-	
16	16682	<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	
17	6969	<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	+++	+++	
18	16775	<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	
19	6041	<i>Rhizopus</i> sp.	-	-	
20	7966	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	+	-	
21	16773	<i>Muco hiemalis</i>	-	-	
22	2678	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i>	-	-	
23	KACC 40217	<i>Metargizium anisopliae</i>	-	-	
24	40223	<i>Metargizium anisopliae</i>	-	-	
25	40230	<i>Metargizium anisopliae</i>	-	-	
26	40231	<i>Metargizium anisopliae</i>	-	-	
27	40969	<i>Metargizium anisopliae</i>	-	-	
28	ATCC 55938	<i>Alcaligenes</i> sp.	+	-	보고된 균주
29		<i>Trichoderma harzianum</i> P1	-	-	
30		<i>Chromobacterium</i> strain C-61	-	-	
31		<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	
32		<i>Serratia marcescens</i>	-	-	
33		<i>Streptomyces</i> spp.			
34	기타 미지의 키틴분해세균 30종		-	-	

2) chitin deacetylase의 생산 조건

*Rhizopus microsporus var. oligosporus*가 생산한 chitin deacetylase는 buffer의 종류 및 pH에 따라 다양한 특성을 보여 주었다. 따라서 정확한 효소 활성 측정 시스템을 확립하기 위하여 buffer의 종류 및 pH에 따른 배양여액의 활성을 조사하였는데, 그림 1에서 보는 바와 같이 pH 7.0에서 가장 우수하였다. 동일 pH에서도 buffer의 종류에 따라 효소활성에 차이가 있었지만, $\text{KH}_2\text{PO}_4+\text{NaOH}$ pH 7.0에서 가장 우수하였고, Tris-HCL buffer를 사용하였을 경우에는 대조구에서 높은 값이 검출되었기 때문에 사용할 수 없었다. 따라서 이후의 모든 효소 활성 측정은 $\text{KH}_2\text{PO}_4+\text{NaOH}$ pH 7.0에서 실시되었다.

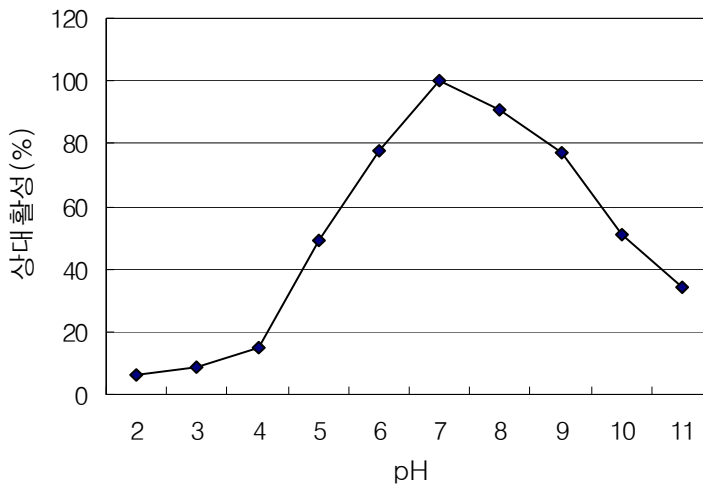


그림 1. pH에 따른 배양여액의 chitin deacetylase 활성

이 균주는 또한 키틴분해미생물들이 잘 생육할 수 있는 chitin agar plate에서의 생육이 아주 느렸고, 키틴분해효소도 생산하지 않았다. 또한 YPG 배지보다는 PDA에서의 생육이 더 우수하였고 두 배지 모두 25 C에서의 생육이 가장 우수하였다. 따라서 YPG와 PDA 100ml에 포자현탁액(10^5 포자/ml) 1ml를 접종하고, 25 C, 분당 200rpm의 항온교반기에서 배양 후, 배양기간에 따른 배양여액의 효소활성을 측정한 결과, 그림 2에서 보는 바와 같이 YPG보다는 PDB에서 더 우수하였다. 또한 PDB에서는 5일 배양, YPG에서는 6일 배양

에서 가장 높은 효소 활성을 나타내고 그 이후 감소하였다. 그러나 ml당 10^7 의 포자현탁액을 접종하였을 경우에는 배양 3일후에 최고의 활성을 나타냈다.

이 균주로부터 chitin deacetylase의 생산을 유도해 보기 위하여 colloidal chitin과 chitosan을 첨가한 PDB와 YPG에서 배양하여 효소활성을 측정하여 보았는데, 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았다. 즉, 이 효소의 생산은 chitin이나 chitosan에 의해서 유도되지 않고, 생육 정도에 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

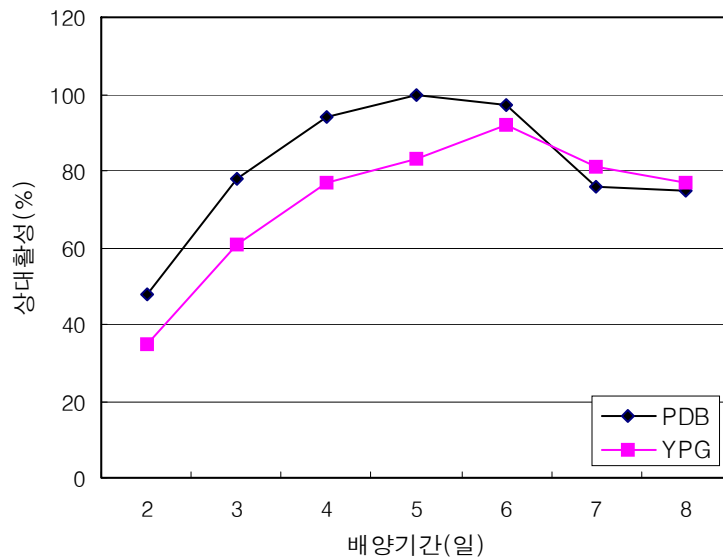


그림 2. 배양기간과 배지에 따른 배양여액의 chitin deacetylase 활성

나. 키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성과 그들의 조제

1) 키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성

키틴올리고당 혹은 키토올리고당이 인간, 가축 및 식물의 다양한 병원균과 식품의 여러 부패균들을 억제하는 것으로 보고되었다. 그러나 모든 올리고당이 모든 병원균을 억제하는 것이 아니라 올리고당의 길이, 대상 병원균의 종류에 따라 억제정도가 각각 다른 것으로 알려져 있다. Chitinase도 식물병원진균의 세포벽을 분해하여 억제하는 것으로 보고되었지만, Chitinase의 종류에 따라 그 억제력이 다른 것으로 알려져 있다. 따라서 이 실험에서는 주요 식물 병원균에 대한 키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 억제효과를 조사하였고, 그들의 억제에 필요한 최소 농도를 결정하였다.

가) 키틴올리고당 및 키토올리고당의 항균 활성

잣빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*), 시들음병균(*Fusarium oxysporium*)과 배의 저장성 병원균(*Cladosporium* spp.) 등에 대한 키틴올리고당과 키토올리고당의 포자발아 억제효과를 조사하였다(그림 3, 4). 4 병원균 모두 포자발아를 억제할 수 있는 농도가 달랐지만, 키틴올리고당 보다는 키토올리고당에 의해서 더 잘 억제되었다. 또한, 2~6의 키토올리고당 중에서 당의 수가 증가할수록 더 높은 억제활성을 보여 주었다.

따라서 더 다양한 병원균의 포자발아 억제에 대한 키토올리고당의 최소농도를 결정하였다(표 2). 그 결과 6당의 키토산인 경우 *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium tenuissimum*에 대해서는 5ppm에서도 포자발아를 50% 이상 억제하였고, *Alternaria panax*, *Colletotrichum gloeosporioides* 와 *Fusarium oxysporium* 등은 50 ppm에서 포자발아를 억제하였다.

이상의 결과를 통하여 대부분의 식물병원균은 키틴올리고당보다 키토올리고당이 더 잘 억제하고, 또한 5~6당이 더 잘 억제할 것으로 생각되었다. 따라서 이들을 식물 병 방제에 이용하기 위해서는 가능한 한 5~6당의 키토올리고당이 많이 생성될 수 있는 조건을 선정해주는 것이 필요할 것 같다.

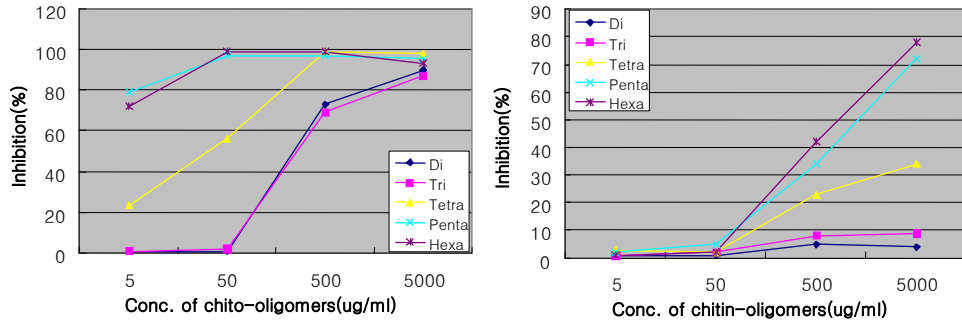


그림 3. *Botrytis cinerea*의 포자발아에 대한 키틴 및 키토올리고당의 억제효과

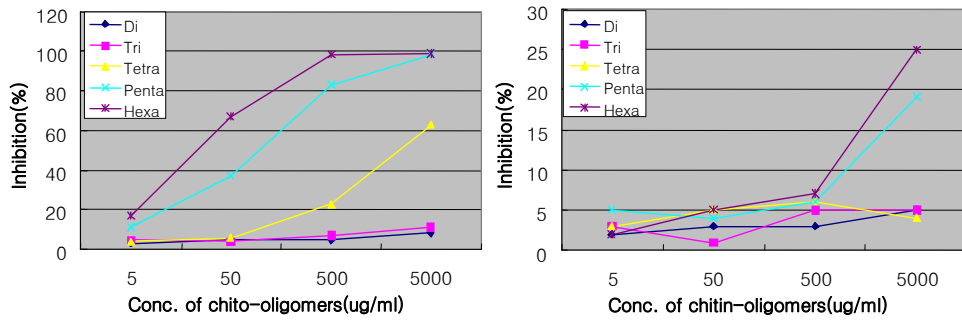


그림 4. *Fusarium oxysporium*의 포자발아에 대한 키틴 및 키토올리고당의 억제효과

표 2. 식물병원균에 대한 키토올리고당의 최소 발아억제 농도

병원균	최소 발아억제농도(ppm)			
	3당	4당	5당	6당
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	5000	500	50	50
<i>Alternaria panax</i>	5000	500	50	50
<i>Fusarium oxysporium</i>	-	5000	500	50
<i>Botrytis cinerea</i>	500	50	5	5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	500	50	5	5
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	500	50	5	5

나) Chitinase의 항균활성

정제된 Chitinase의 농도에 따른 *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium tenuissimum* 및 *Fusarium oxysporium* 의 포자 발아 억제효과를 조사하였다. 그 결과 *Cladosporium sphaerospermum* 과 *Cladosporium tenuissimum* 는 20ppm의 농도에서도 50% 이상의 발아 억제효과를 나타냈으나, *Botrytis cinerea*의 경우에는 200ppm에서 50% 이상의 발아 억제효과를 나타내고, *Fusarium oxysporium* 의 경우에는 2000ppm에서 40% 정도만의 억제를 나타냈다 (그림 5A).

또한 Chitinase의 특이적인 활성에 따른 포자발아 억제효과를 조사해 보기 위하여 200ppm의 동일 농도에서 특이적 활성이 다른 5종의 Chitinase에 대한 *Botrytis cinerea*의 포자발아 억제효과를 조사한 결과(그림 5B), Chitinase의 특이적 활성과 발아억제효과는 비례한다는 것을 알 수 있었다.

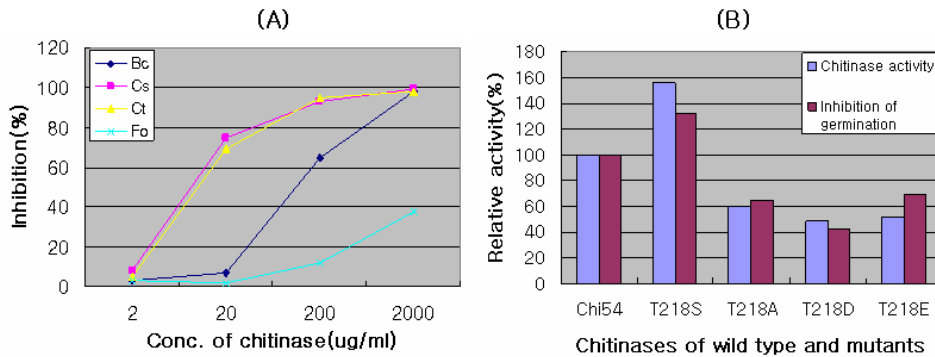


그림 5. 식물병원균의 포자발아에 대한 chitinase의 억제효과. A; chitinase의 농도에 따른 Bc=*Botrytis cinerea*, Cs=*Cladosporium sphaerospermum*, Ct=*Cladosporium tenuissimum*, Fo= *Fusarium oxysporium*의 억제효과, B;chitinase의 종류에 따른 *Botrytis cinerea* 의 억제효과

2) 키틴으로부터 키틴올리고당 및 키토올리고당의 조제

현재 알려진 chitin deacetylase는 키틴올리고당의 아세틸기를 잘 제거하지만 결정성 키틴에 대한 아세틸기는 잘 제거시키지 못하는 것으로 알려져 있

다. 따라서 현재의 많은 연구들은 키틴에 NaOH를 처리하여 키토산으로 만들고 여기에 chitosanase를 처리하여 키토올리고당을 만들려고 하고 있다. 그러나 NaOH의 처리는 식품의 안정성 문제뿐만 아니라 제거해야하는 문제점들이 대두되고 있다. 따라서 이 실험에서는 키틴에 chitinase를 처리하여 키틴올리고당으로 만들고, 여기에 chitin deacetylase를 처리하여 키토올리고당으로 전환하려는 시도를 모색하였다.

가) chitinase를 이용하여 키틴으로부터 키틴올리고당의 조제

(1) chitinase에 의한 키틴의 분해 능력

(가) 키틴올리고머들의 HPLC 분석 : 분해산물을 정량 및 정성분석하기 위하여 HPLC에서 알려진 키틴올리고당에 대한 분석을 실시하였다. 그 결과 그림 6에서 보는 바와 같이 1당의 retention time이 2.775분, 2당이 9.775분, 3당이 13.167분, 4당이 18.458분, 5당이 25.825분, 6당이 36.275분 이었다. 따라서 이들을 기준으로 해서 chitinase에 의한 키틴의 분해 산물의 양을 조사하였다.

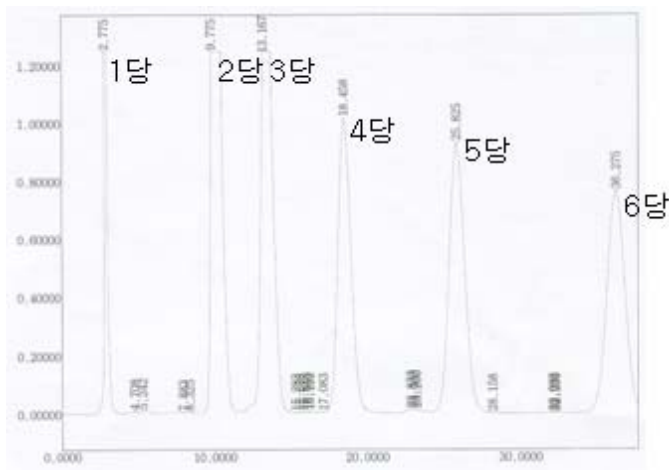


그림 6. 키틴올리고머들의 HPLC분석

(나) chitinase에 의한 키틴의 분해산물 : 정제된 chitinase에 의한 결정성키틴

의 분해산물을 반응시간에 따라 조사한 결과, 표 3에서 보는 바와 같이 1시간 이후부터 분해 산물이 검출되었지만, 5,6당이 가장 많은 시기는 6시간 보존하였을 경우이다. 12시간 이후에는 5,6당의 분해산물이 감소되기 시작하여 24시간 이후에는 1~3당만 검출되었다.

표 3. 반응시간에 따라 chitinase에 의하여 분해된 키틴올리고당의 비율

반응시간 (시간)	분해 산물(%)						
	GlcNAc	(GlcNAc) ₂	(GlcNAc) ₃	(GlcNAc) ₄	(GlcNAc) ₅	(GlcNAc) ₆	>(GlcNAc) ₆
1	2.5	4.5	2.7	1.5	2.8	1.1	79.9
2	3.4	18.2	12.5	3.8	6.2	2.9	53.0
6	4.9	27.3	19.5	6.2	12.7	8.3	22.1
12	6.7	42.6	23.5	12.2	6.3	4.6	4.1
24	10.5	53.2	34.5	1.8	ND	ND	ND
48	19.7	52.8	27.5	ND	ND	ND	ND

* 반응혼합물 = 0.1% (w/v) crystal chitin, 정제된 chitinase 5U/g 기질, 0.1M buffer (pH 7.0)

* 45 C에서 각 반응시간 동안 보존 후, 5분동안 boiling하고 HPLC 분석

나) chitin deacetylase를 이용하여 키틴올리고당으로 부터 키토올리고당의 조제

(1) chitin deacetylase 의 생산, 정제 및 특성

(가) chitin deacetylase 의 생산 조건

Rhizopus microsporus var. oligosporus (KCTC 6969)는 25C에서 가장 좋은 생장을 나타냈다. 따라서 배양액 100ml에 포자현탁액(10^5 포자/ml) 1ml를 접종하고, 분당 200rpm의 항온교반기 (25C) 에서 배양하면서 배양기간에 따른 배양여액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 그림 7에서 보는 바와 같이 PDB배지가 가장 우수하였고, 그 다음으로 YPG, 키틴+기본배지 순이었다. 또한 PDB에서는 배양 5일, YPG에서는 배양 6일째에 가장 높은 효소 활성을 나타내고 그 이후 감소하였는데, 키틴+기본배지에서는 배양 7일째까지 계속 증가하는 경향이였다. 한편, 이 효소는 chitin과 chitosan에 의해서 유도

되지 않았다

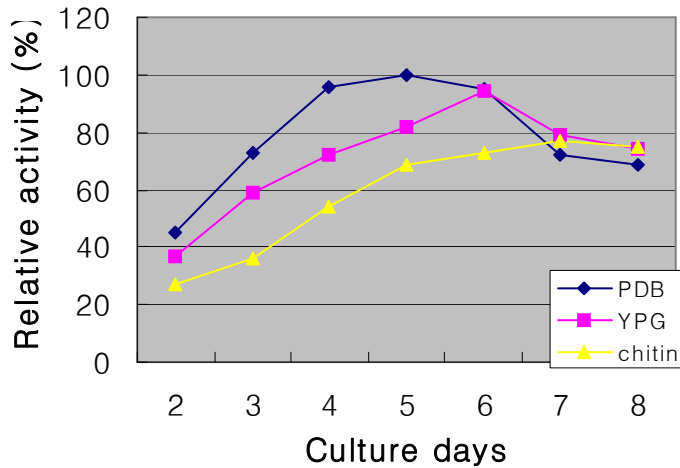


그림 7. 배지와 배양기간에 따른 chitin deacetylase 활성

(나) chitin deacetylase 의 분리 및 정제

*Rhizopus microsporus var. oligosporus*를 PDB에서 5일 동안 배양하여 얻어진 배양여액을 SDS-PAGE한 결과, 그림 8A,B에서 보는 바와 같이 chitin deacetylase는 약 60-kDa과 45-kDa의 두 밴드에서 검출되었다. 이들 중, 60-kDa의 chitin deacetylase는 HiLoad Superdex 75 column을 통과하여 활성이 있는 fraction은 SDS-PAGE에 의해서 확인되었다 (그림 8C). 1차 정제된 효소는 모아서 투석후, HiLoad Q Sepharose FF column을 통과하였다. 활성이 있는 fraction은 SDS-PAGE에 의해서 확인되었다(그림 8D).

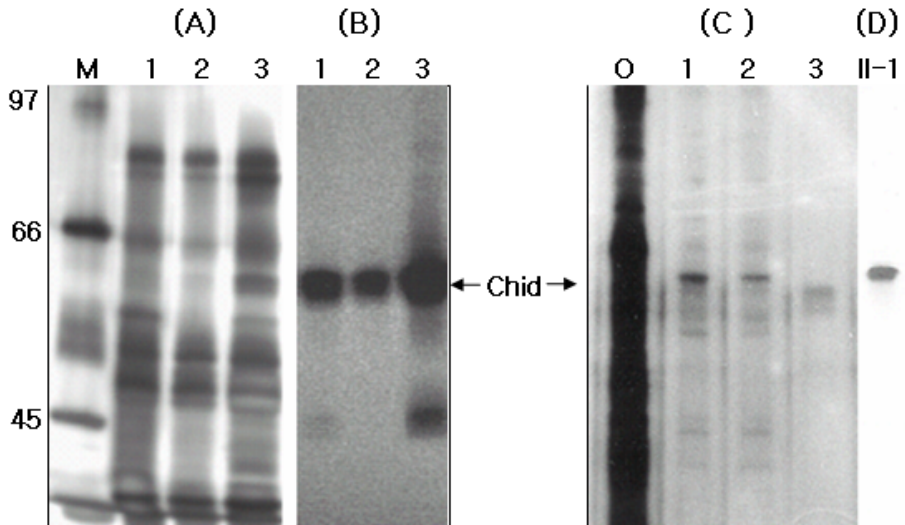


그림 8. *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*가 생산한 chitin deacetylase의 정제. A; 배양여액의 silver staining, B; 배양여액의 active staining, C; 배양여액의 1차 정제, D; 2차 정제

(3) 정제된 chitin deacetylase의 특성

기질인 Hexa-*N*-acetylchitohexaose((GlcNAc)₆)에 대한 chitin deacetylase의 활성은 60C에서 가장 우수하였고, 그 이후 감소하였다 (그림 9A). 정제된 효소를 각 온도에 시간별로 둔 후, 그 활성을 조사한 결과 (그림 9B), 90 C에서는 1시간이내에 활성을 거의 상실하였고, 80 C에서는 2시간 이후 40% 이하의 활성을 보여 주었으며, 50, 60, 70C에서도 정도의 차이는 있었지만, 계속적으로 활성이 감소하고 있음을 알 수 있었다.

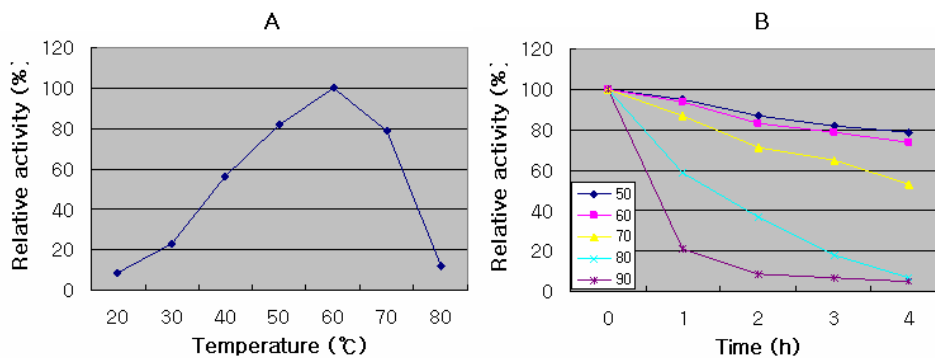


그림 9. 온도에 따른 정제된 chitin deacetylase의 활성(A)과 안정성(B)

Hexa-*N*-acetylchitohexaose((GlcNAc)₆) 를 기질로 하였을 경우, 활성은 pH 7.0에서 가장 우수하고 그 이후 급격히 감소하였다. 안정성 실험은 효소를 각 pH에서 2시간 동안 둔 후 조사하였는데, pH 7.0에서 가장 우수하였고 pH8~11의 범주내에서는 70% 이상의 활성을 유지하였다 (그림 10).

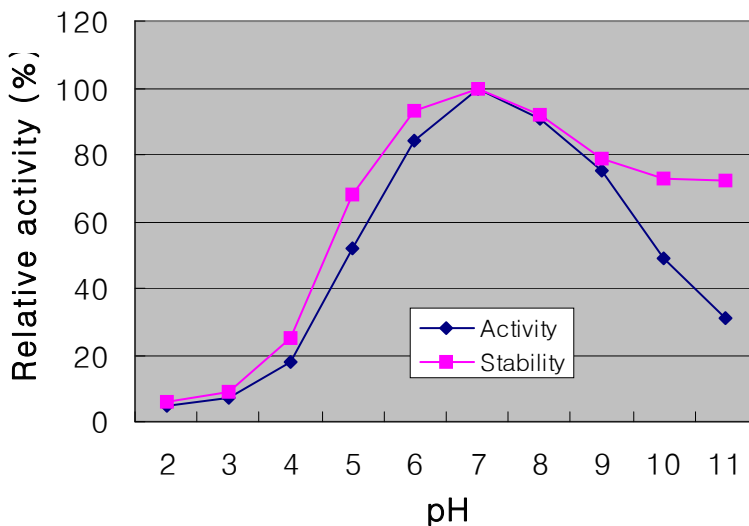


그림 10. pH에 따른 정제된 chitin deacetylase의 활성과 안정성

(2) 키틴올리고당으로부터 키토올리고당의 조제

(가) 키틴올리고당에 따른 chitin deacetylase의 활성 : 표 4에서 보는 바와 같이 (GlcNAc)₆에 대한 활성이 가장 우수하였고 그 다음으로 (GlcNAc)₅, (GlcNAc)₄ 순이었는데, 2당과 3당에 대한 활성은 매우 낮았다. 한편, Glycol chitin에 대한 활성도 (GlcNAc)₅에 비하여 1/2이상의 수준을 유지하였다.

표 4. 키틴올리고당에 따른 chitin deacetylase의 활성

기질	상대 활성 (%)		
	15분	30분	60분
(GlcNAc) ₂	0	0	0
(GlcNAc) ₃	0	1.2	4.7
(GlcNAc) ₄	72.3	88.5	94.3
(GlcNAc) ₅	87.6	93.7	96.7
(GlcNAc) ₆	100.0	100.0	100.0
Glycol chitin	54.2	62.3	77.3

* 반응혼합물 = 각 기질(0.5mM), 정제된 chitin deacetylase (50ng), 0.1M buffer (pH 7.0)

* 45 C에서 각 반응시간 동안 보존 후, 10분동안 boiling하고 활성 측정

(나) 키틴의 종류에 따른 chitin deacetylase의 활성 : 표 5에서 보는 바와 같이 glycol chitin에 비하여 Colloidal chitin이나 Crystal chitin에 대한 활성은 매우 낮았다.

따라서 키틴으로부터 키토올리고당을 만들기 위해서는 chitin deacetylase를 이용하여 키틴을 키토산으로 만든 다음, 이 키토산을 키토올리고당으로 만드는 방법보다 본 실험에서처럼 chitinase를 이용하여 키틴을 키틴올리고당으로 만들고, 키틴올리고당에 chitin deacetylase를 이용하여 키토올리고당으로 만드는 방법이 합리적일 것으로 생각되었다.

표 5. 키틴의 종류에 따른 chitin deacetylase의 활성

기질	상대 활성 (%)		
	12시간	24시간	48시간
Crystal chitin	2.7	4.3	15.6
Colloidal chitin	12.3	32.3	57.8
Glycol chitin	100.0	100.0	100.0

* 반응혼합물 = 각 기질(0.5mg), 정제된 chitin deacetylase (50ng), 0.1M buffer (pH 7.0)

* 45 C에서 각 반응시간 동안 보존 후, 10분동안 boiling하고 활성 측정

(다) 키틴과 키토올리고당의 분해패턴 비교

상기에서 얻어진 여러 조제액을 정량 및 정성분석하기 위하여 HPLC에서 알려진 키틴과 키토 올리고당에 대한 분석을 실시하였다(그림 11). 그 결과 키틴의 경우, 1당의 retention time이 2.775분, 2당이 9.775분, 3당이 13.167분, 4당이 18.458분, 5당이 25.825분, 6당이 36.275분, 키토산의 경우에는 1당이 2.758분, 2당이 9.967분, 3당이 12.825분, 4당이 16.500분, 6당이 21.625분, 6당이 28.867분이었다.

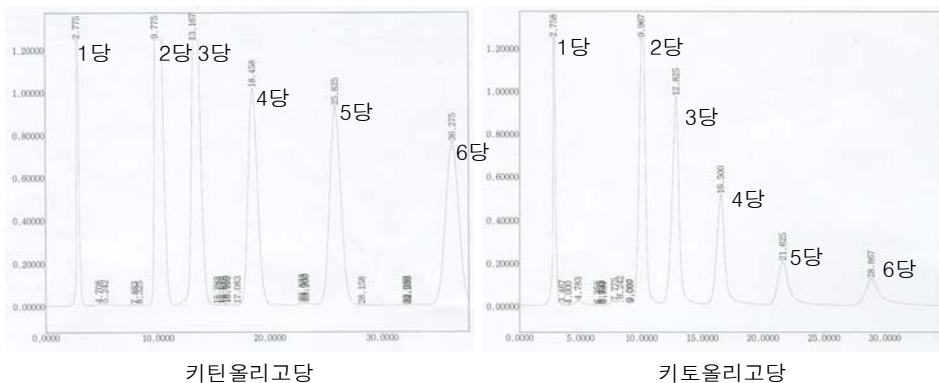


그림 11. 키틴과 키토올리고당의 HPLC 분석

다. 길항세균, chitinase 및 키토올리고당의 대량 생산과 그들의 식물 병 방제 효과 증진

상기의 실험을 통하여 우리는 길항세균, chitinase, 키토올리고머들을 혼합 살포하면 훨씬 더 우수한 병 방제효과를 보여 줄 것이라는 것을 알 수 있다. 이러한 조건은 키틴분해성 길항세균들을 키틴이 함유된 기본 배지에서 배양하고, 여기에 chitin deacetylase 생산 균주 혹은 그 효소를 첨가함으로써 쉽게 얻을 수 있을 것이다. 또한 그 배양액속에는 본 실험에서 조사되지 않은 다양한 항균물질들도 들어 있을 것이다. 따라서 이 배양액을 식물체에 살포하면 길항세균, chitinase, 키토올리고머 및 미지의 항균물질들이 병원균 억제에 관여함은 물론 처리된 길항세균들이 키틴올리고머들을 영양원으로 하여 더 오랫동안 생존할 수 있을 것이다. 반면 배양액의 직접 살포는 식물병원균의 생육에 유리한 조건을 조성해줄 가능성도 있다. 이러한 가능성을 배제하기 위하여 이 실험에서는 식물병원균이 생육하지 못하면서 길항세균만 생육할 수 있는 배지를 선정하였고, 선정된 배지에서 길항세균의 밀도와 chitinase 활성이 최대로 될 수 있는 시기를 선정하였으며, 이들을 살포하였을 경우의 병 방제효과 등을 조사하였다.

1) 공시 세균의 키틴분해 능력

Colloidal chitin을 함유한 기본배지에서 공시 균주의 키틴분해능력은 그림 7에서 보는 바와 같이 *Chromobacterium* sp. strain C-61이 가장 우수하였고, 그 다음으로 *Serratia plymuthica*, *Lysobacter enzymogenes* C-3, *Streptomyces* sp. strain S-2의 순이었다 (그림 12).

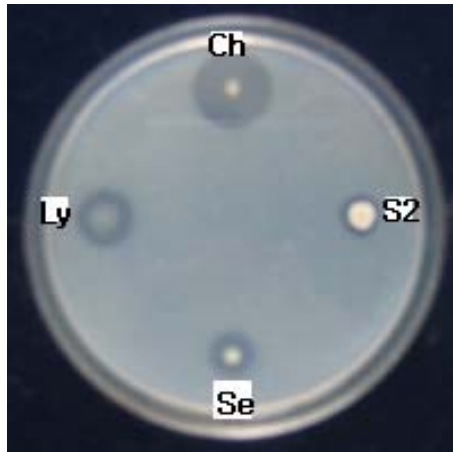


그림 12. 공시 세균의 키틴분해 능력. Ch=*Chromobacterium* sp. strain C-61이 가장 Ly=*Lysobacter enzymogenes*, S2=*treptomyces* sp. strain S-2, Se=*Serratia plymuthica*

2) 공시 세균의 chitinase 생산능력

Chromobacterium sp. strain C-61의 성장 및 chitinase 생산 능력이 우수한 배지를 선정하기 위하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 함유한 배지를 원액으로 하고 이를 1/2, 1/4로 희석한 다음 0.2%의 키틴을 첨가하여 *Chromobacterium* sp. strain C-61을 배양하였다. 그 결과, 그림 13에서 보는 바와 같이 희석배수가 높을수록 strain C-61의 초기 생육은 약간 늦었지만, 배양 5일 이후에는 원액에서의 밀도와 큰 차이를 나타내지 않았고, chitinase의 생산 능력은 희석배수가 높을수록 오히려 더 우수한 경향을 보여 주었다. 따라서 *Chromobacterium* sp. strain C-61의 성장과 chitinase 생산 능력을 극대화 할 수 있는 배지로 증류수 1L당 키틴 1.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1g, KH_2PO_4 0.12g, K_2HPO_4 0.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06g을 함유하는 배지를 선정하였다.

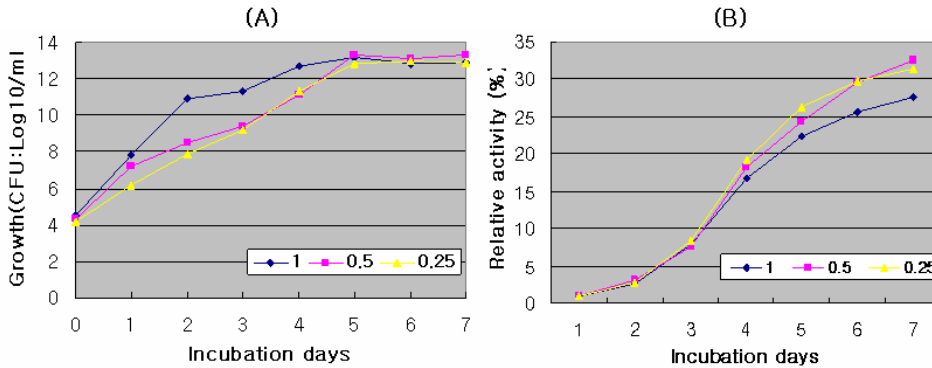


그림 13. 배지에 따른 *Chromobacterium* sp. strain C-61의 생장곡선과 chitinase 활성. 기본배지의 희석 정도 1= 원액, 0.5 =1/2 희석, 0.25 =1/4 희석, 모든 배지는 0.2% chitin 함유, 28°C에서 배양

3) 길항세균 및 chitinase의 대량 생산 조건 확립

가) 길항세균의 생육과 chitinase 생산에 적합한 배지의 선정 : 길항세균의 생육과 chitinase 활성이 극대화될 있는 배지를 선정하기 위하여 배지 원액 (증류수 1L당 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g, KH_2PO_4 4g, K_2HPO_4 3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g)을 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32로 희석하고 키틴 1g을 첨가하였을 경우, 세 균주 모두 희석배수가 높을수록 초기 생육은 약간 늦었지만, 배양 5일 이후에는 원액에서의 밀도와 큰 차이를 나타내지 않았고, Chitinase 생산 능력은 희석배수가 높을수록 오히려 더 우수한 경향이였다. 반면, 증류수에 키틴만 첨가되었을 경우에는 길항세균의 생육이 현저히 저하되었다. 따라서 길항세균의 생육과 chitinase 생산에 적합한 배지로서 증류수 1L당 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1~1.0g, KH_2PO_4 0.12~1.2g, K_2HPO_4 0.1~1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06g~0.6g, 키틴 1g이 함유된 배지를 선정하였다.

여기에는 증류수 1L당 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0g, KH_2PO_4 1.2g, K_2HPO_4 1.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.6g, 키틴 1g이 함유된 배지에 길항세균들을 접종하고 28 C에서 배양하였을 경우의 세균 밀도와 chitinase 활성을 나타냈다. 그림 15에서 보는 바와 같이 세 균주 모두 배양 5일 까지 급격히 증가하다가 배양 10일 까지 완만히 증가하고 그 이후 30일까지는 비슷한 수준을 유지하였다. 균주별 밀도는 strain C-3이 가장 높은 경향이였고, 그 다음으로 strain C-1,

strain C-61순이었다 (Fig. 14A). 한편 Chitinase 활성은 배양 10일까지 급격히 증가하다가 15일까지 완만히 증가하고 그 이후 30일까지는 비슷한 수준을 유지하는 경향이였다. 균주별로는 strain C-61의 활성이 가장 높았고, 그 다음으로 strain C-1이었으며, strain C-3이 가장 낮은 활성을 나타냈다 (Fig. 14B).

나) 길항세균의 생육과 chitinase 생산이 우수한 배양액의 대량생산 조건.

길항세균의 생육과 chitinase 생산이 우수한 배양액을 대량 생산하기 위하여 *Chromobacterium* sp. strain C-61(C-61), *Lysobacter enzymogenes* (C-3) 및 *Serratia plymuthica* (C-1) 의 배양액 100ml씩을 500L용 대량배양기에 접종하고 28℃에서 배양되었다. 길항세균의 밀도는 배양 5일까지 급격히 증가하여 배양 10일과 15일 사이 최고에 이르고, 그 이후 감소하는 경향이었는데, 배양 10일째의 균주 밀도가 strain C-3은 ml 당 1×10^{10} CFU, strain C-1은 7×10^9 , strain C-61은 6×10^8 수준이었다. Chitinase 활성은 배양 10일까지 급격히 증가하다가 15일에서 30일까지는 비슷한 수준을 유지하는 경향이였다(표6).

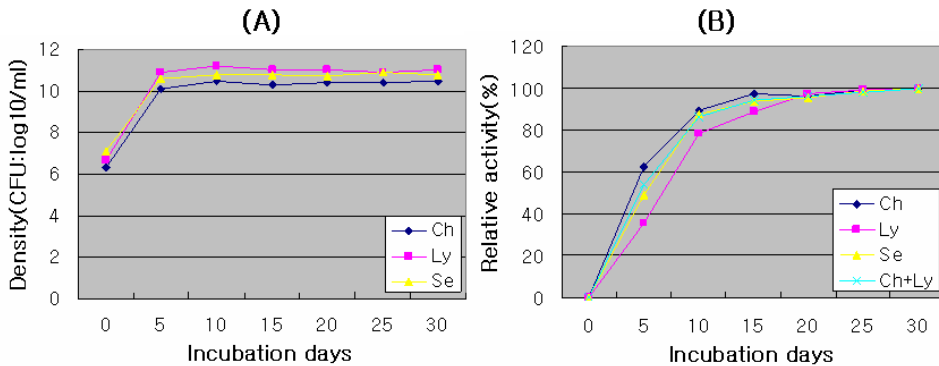


그림 14. 배양기간에 따른 길항세균들의 밀도(A) 와 chitinase 활성(B). 0.2% chitin+기본 배지, 28 ℃ 에서 생육, Ch= *Chromobacterium* sp. strain C-61, Ly = *Lysobacter enzymogenensis*, Se = *Serratia plymuthica*

다) 결론: 앞으로 배양액을 식물 병 방제제로 이용하려고 할 경우에는 28C의 대량배양기에서 10일 정도 배양 후 사용하는 것이 가장 우수할 것으로 판단되었

다.

표 6. 대량배양기에서 배양기간에 따른 길항세균들의 밀도및 chitinase활성

I배양기간 (일)	밀도 (CFU/log 10)			상대 chitinase 활성 (%)
	Ly	Se	Ch	
0	5.4	5.5	4.9	0
5	8.2	7.8	7.2	50.6
10	10.1	9.7	8.6	92.8
15	10.3	9.4	8.7	97.5
20	9.9	9.1	8.0	99.7
25	9.1	8.3	7.2	97.5
30	8.7	7.5	6.8	100.0

* Ch = *Chromobacterium* sp. strain C-61, Ly = *Lysobacter enzymogenensis* strain C-3, Se = *Serratia plymuthica* strain C-1

4) 식물 병 방제효과가 증진된 미생물제의 개발

흰가루병은 다양한 작물에 막대한 피해를 주고 있고, 병원균(흰가루)의 억제 여부를 육안으로 관찰할 수 있기 때문에 병 방제효과를 검정하기가 편리하다. 따라서 이 실험에서는 오이 흰가루병에 대한 방제효과를 하나의 모델로 하여 실시하였다.

가) 길항세균의 단독 혹은 혼합에 의한 억제효과 비교 : 이 실험에 공시된 3 균주모두 흰가루 억제 능력이 무처리에 비하여 매우 우수하였다. 단독 배양액의 경우 strain C-3, C-61, C-1순으로 우수하였는데, strain C-3와 C-61의 혼합배양액은 단독배양액이나 3균주의 혼합배양액보다 더 우수하였다 (그림 15).

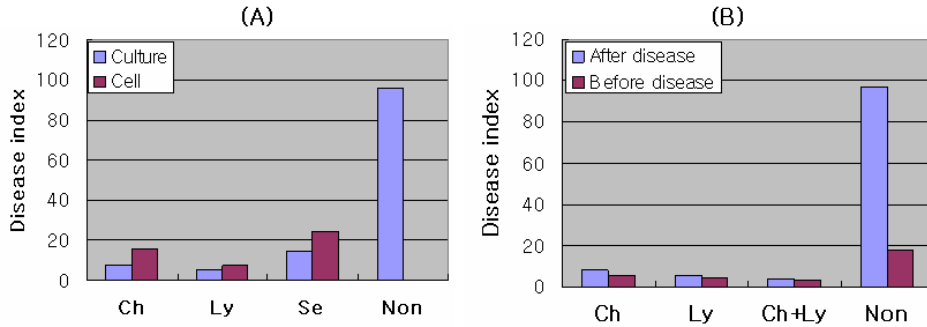


그림 15. 길항세균에 따라 세균액과 배양액(A) 및 병 발생 전후(B)의 흰가루병 억제효과 비교

나) 길항세균액과 배양액의 억제효과 비교. strain C-3와 C-61의 혼합배양액과 이 배양액속에 들어 있는 길항세균만의 농도를 지닌 액(길항세균액)의 억제효과를 비교해 보았는데, 모든 균주에서 배양액의 억제효과가 더 우수하였다. 또한 이들의 억제효과는 병 발생 전에 살포했던 것보다 병 발생 후 처리했던 것에서 더 우수하였다(그림 16).

다) 배양액에 chitin deacetylase를 첨가하였을 경우의 방제 효과. strain C-3와 C-61의 혼합배양액 1L에 chitin deacetylase를 함유한 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* 의 배양액 10ml를 첨가하였을 경우 흰가루 분해 능력과 방제효과 지속기간이 더 우수함을 알 수 있었다(그림 16).



그림 16. 배양액+chitin deacetylase 처리 4일 후 흰가루가 분해된 모습

라) 오이 잎 위에 처리된 길항세균의 밀도 변화 비교 : 오이 잎 위에 처리된 길항세균의 밀도 변화는 균주에 따라 달랐지만, 처리 5일 후까지 급격히 감소하다가 그 이후 완만히 감소하는 경향을 보여 주었다. 균주별 생존 능력은 strain C-1이 가장 우수하였고, 그 다음으로 strain C-3, strain C-61 순이었다. 그리고 모든 균주에서 길항세균액만 처리하였을 경우보다는 배양액을 처리하였을 경우에 더 우수한 생존 능력을 보여 주었다 (그림 17).

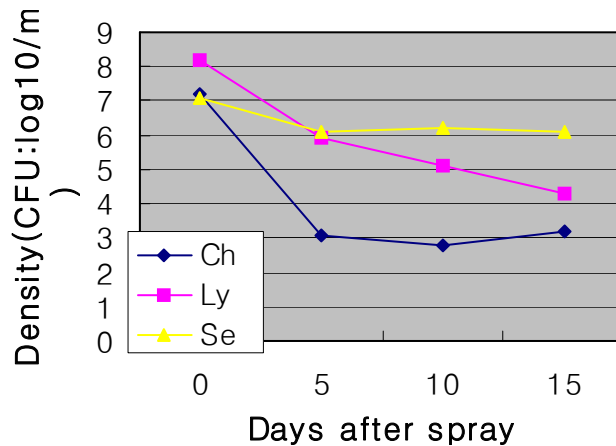


그림 17. 오이 잎 위에 처리된 길항세균의 밀도 변화

결론적으로 strain C-61과 strain C-3의 혼합배양액에 chitin deacetylase을 첨가하여 오이 흰가루병에 처리하였을 경우에는 잎 위에 분포하고 있는 흰가루를 분해, 제거해주는 효과를 지니고 있었다. 유기합성농약을 처리하였을 경우에는 흰가루가 죽어서 그대로 분포하고 있는데 본 배양액을 처리하였을 경우에는 흰가루를 없애 주기 때문에 잎의 광합성 작용에 더 유리할 것으로 판단되었다.

5) 흰가루병 방제효과를 증진시키기 위한 전략

상기에서 지적한 바와 같이 본 배양액의 흰가루 제거효과는 매우 탁월하였다. 그러나 중요한 것은 이들의 방제효과를 더 오랫동안 유지하는 것이다. 우리는 다양한 비닐하우스와 다양한 시기에 본 배양액의 흰가루병 방제효과를 검증하여 왔고, 일반 농가에서 실제 활용하고 있다. 이들 다양한 조건에서의

실험과정을 통하여 본 배양액의 방제효과를 더 지속시킬 수 있는 방안을 모색하였다.

가) 배양액의 처리에 의한 흰가루의 일별 변화 : 그림 18는 배양액을 처리하였을 경우 처리 후 4일째까지 흰가루가 거의 관찰되지 않다가 6일째에 다시 관찰되기 시작함을 보여 준다. 반면, 물을 처리하였거나 아무것도 처리하지 않았을 경우에는 흰가루가 계속 번져 감을 보여 준다. 지금까지의 모든 실험에서 배양액 처리 후 3일까지는 흰가루가 완전히 사라졌었다. 그러나 흰가루가 다시 나타나기 시작하는 기간은 살포시기의 환경에 크게 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다.

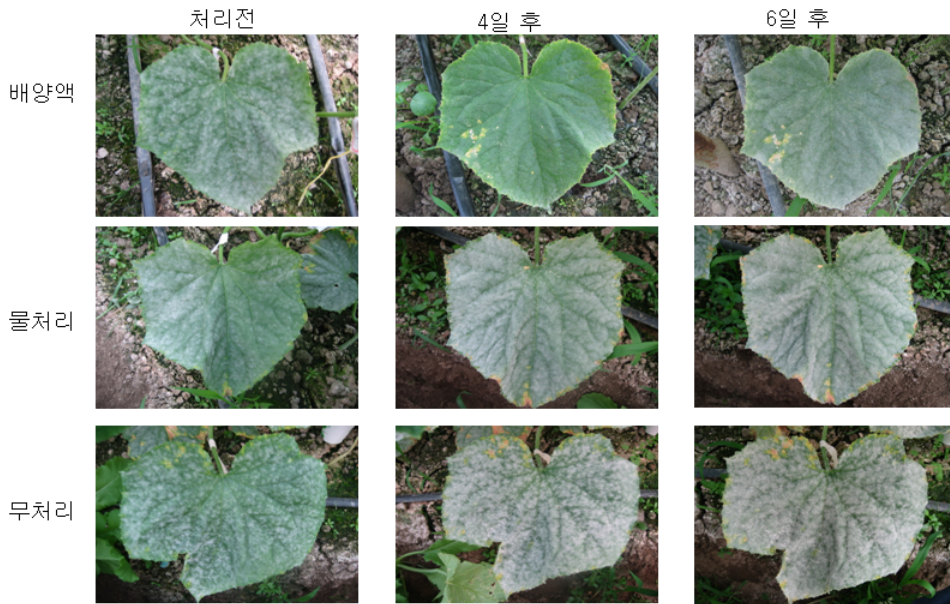


그림 18. 배양액 처리 후의 일수에 따른 흰가루 변화 양상, 배양액, 물처리와 무처리사이의 비교

나) 배양액의 살포시기에 따른 병 방제효과, 표 7은 배양액을 아침(오전 9시) 보다 저녁(오후 6시)때 살포하였을 경우에 흰가루가 훨씬 더 늦게

나타나기 시작하고, 특히 비 오는 날 살포하였을 경우에는 훨씬 더 늦게 나타나기 시작한다는 것을 보여 준다. 이와 같은 결과는 살포된 배양액의 수분이 더 오랫동안 유지 될수록 병 방제효과가 더 지속될 수 있다는 것을 암시한다. 이와 같은 결과는 여러 요인에 의해서 일어나겠지만, 흰가루병 방제효과를 증진시키기 위해서는 무엇 보다 살포된 배양액의 수분을 오랫동안 유지될 수 있는 방법들을 강구해야 된다는 것을 제시한다.

표 7. 배양액의 살포시기에 따른 병 방제효과 비교

살포시기	환경 조건	방제효과 지속 기간(일)*
5월 중순	오전 (9시경)	4일
	오후 (6시경)	7일
5월 하순	28C 정도의 시기	4일
5월 중순	24C 정도의 시기	6일
6월 초순	건조한 날	6일
	비오는 날	10일

* 미생물제 처리 후 흰가루가 다시 보이기 시작한 날까지의 일 수

결론적으로 지상부 병에 대한 미생물제의 방제효과를 증진시키기 위해서는 처리된 길항미생물들이 더 오랫동안 활동할 수 있는 환경을 조성해 주는 것이 무엇보다 중요하겠다는 생각이 들었다. 상기에서 제시된 살포 후의 수분 유지도 하나의 방법이 될 수 있겠지만, 그 외에 살포된 배양액의 증발이 잘 이루어지지 않는 물질(예; 난황유)들과 섞어 살포하거나, 자외선 차단제들을 첨가하여 살포함으로써 방제효과가 더 증진되는가를 실험 중에 있다. 우리는 또한 동일 잎일지라도 살포된 부분의 흰가루만 제거되고, 접촉되지 않은 흰가루에 대해서는 전혀 영향을 미치지 못한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 배양액을 잎에 고루 살포되도록 계면활성제나 전착제 등을 첨가하여 살포하는 방법도

실험 중에 있다. 여기에 결과를 삽입하지는 않았지만, 방제효과 지속기간은 처리된 계절에 따라서도 상당히 차이가 났었다. 따라서 계절에 따른 본 배양액의 적정 살포횟수 등도 더 검토하여 재배가들에게 제공하는 것이 필요할 것 같다.

6) 비닐하우스 포장에서의 병 방제효과

가) 배양액의 살포 농도에 따른 병 방제효과 : 본 배양액의 실제 사용 가능성을 타진해 보기 위하여 비닐하우스 포장에서의 병 방제효과를 조사하였다. 배양 원액의 경우 94.4%, 10배 희석액의 경우에도 93.7%의 높은 방제가를 보여 주었다(표 8, 그림 19).

표 8. 비닐하우스포장에서 배양액의 살포 농도에 따른 흰가루병 방제효과

처리	발병도*				방제가 (%)
	I	II	III	평균	
배양 원액	5.8	4.9	5.3	5.3	94.4
10배 희석액	6.7	4.8	6.2	5.9	93.7
무처리	94.1	92.7	96.2	94.3	-



처리구



무처리구

무처리구

처리구

그림 19. 비닐하우스 포장에서 배양액 처리 후 6일째 모습

나) 시판증인 친환경 흰가루병 방제제와의 효과 비교 : 시판되고 있는 생물농약 또는 친환경자재와 본 배양액의 흰가루병 방제효과를 비교, 분석해 본 결과, 본 미생물제의 원액과 탐갑이 가장 우수한 경향이었고, 그 다음으로 은하수, 푸른손, 에코제트수화제, 본 미생물제의 10배 희석액등이었다. 그러나 클린존, 가루킹, 가루썩, no.va 등은 거의 효과가 없었다 (표 9, 그림 20). 한편, 탐갑의 경우에는 하엽부분에서 시드는 약해 현상이 관찰되었기 때문에 주의가 필요했다.

표 9. 시판되고 있는 친환경자재의 흰가루병 방제효과 비교

친환경자재		방제효과 지속 기간(일)*
상표명	회사명	
은하수	경농	5일
탐 갑	제이아그로(주)	6일 * 약해 위험
푸른손	경농	5일
에코제트 수화제	동부한농화학	5일
클린존	(주) 남보	1일

가루킹	(주) 남보	1일
가루쌩	바이오아그로	1일
no.va	노바플러스(현대특산)	1일
미생물제 원액	본 시험 개발 약제	7일
10배액	본 시험 개발 약제	5일

* 흰가루가 없어졌다가 다시 보이기 시작한 날까지의 일 수



처리 전

처리 후 4일째

그림 20. 비닐하우스 포장에서 여러 친환경자제의 처리 전과 처리 후 4일째 모습

이상의 결과에 의해서 우리는 본 배양액을 오이 흰가루병 방제에 이용할 수 있겠다는 생각을 갖게 되었고, 현재 몇몇 친환경재배농가에서 실제 활용하고 있다. 그러나 앞으로 보다 더 효율적이고 경제적인 살포농도, 살포 간격 및 횟수 등이 결정되어야 될 것 같다. 아울러, 본 배양액에 의한 병 방제효과는 환경에 크게 영향을 받기 때문에 계절에 따른 효율적인 병 방제 매뉴얼도 수립되어야 될 것 같다.

본 실험에 이용된 배양액은 균주와 배지의 제공에 의해서 농민들이 직접 배양해서 사용할 수 있도록 500L용의 간이배양기에서 조제되었다. 여기에서 나온 배양액(500L)은 원액일 경우 약 1,000평의 오이에 살포될 수 있고 10배 희석액일 경우 10,000평의 오이에 사용할 수 있다. 또한 본 배양액은 저렴한 시약들로 조성된 배지에서 조제되었고, 간편하게 조제될 수 있기 때문에 앞으

로 많은 농가에서 활용될 수 있으리라 기대된다.

5) 다른 식물 병에 대한 배양액의 방제효과

가) 오이 뿌리혹선충에 대한 방제효과

2006년 전남 순천시 대대동의 비닐하우스 포장에서 배양액을 점적 호스를 통하여 10일 간격 4회 관주하고 수확기에 오이의 뿌리를 관찰한 결과 그림 21A에서 보는 바와 같이 처리구는 무처리구에 비하여 훨씬 더 적은 혹이 형성되었음을 알 수 있었다. 또한 이 혹은 비닐하우스에 분포하는 잡초(주름잎)뿌리에도 형성되었는데, 점적 호스 주변의 주름잎 뿌리에서는 혹이 전혀 관찰되지 않았지만, 점적 호스에서 멀리 떨어져 있는 주름잎 뿌리에서는 그림 21B에서 보는 바와 같이 무수히 관찰되었다.

따라서 본 배양액이 뿌리혹선충의 방제에도 효과가 있을 것으로 판단되어 선충알을 포트에 접종하고 오이 유묘를 이식한 후 배양액처리구와 무처리구간의 뿌리혹형성정도를 비교해 보았는데, 그림 22에서 보는 바와 같이 배양액처리구에서는 혹이 거의 형성되지 않았다.

현재 오이 뿌리혹선충에 대한 배양액의 살포 농도 및 횟수에 따른 방제효과를 조사하고 있다.

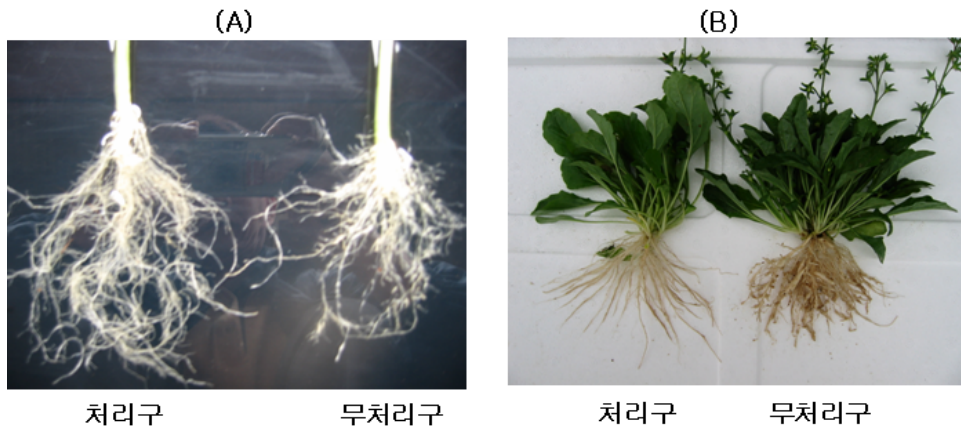


그림 21. 오이 비닐하우스 포장에서 배양액 처리구와 무처리구의 오이(A)와 잡초(주름잎) (B)뿌리에 형성된 뿌리혹의 비교



처리구

무처리구

그림 22. 포트에 뿌리혹 선충알을 접종하고 오이 유묘를 이식 후 배양액 처리한구와 무처리구간의 뿌리혹 형성 정도 비교

나) 토마토의 흰가루병, 잎곰팡이병 및 균핵병에 대한 방제효과

비닐하우스포장에서 토마토 흰가루병은 년중 계속 발생하고 있었는데, 본 배양액의 방제효과가 그림 23에서 보는 바와 같이 매우 우수하였다.



처리 전

처리 후 6일째

처리 전

처리 후 6일째

그림 23. 토마토 흰가루병에 대한 배양액의 방제효과

토마토 잎곰팡이병은 겨울철에 발생하고 있었는데, 전남 고흥군 포두면의 토마토 친환경재배 농가에서 2006년 12월과 1월, 2회에 걸쳐 본 배양액을

살포함으로서 완전 방제할 수 있었다. 그러나 동일 포장에서 발생한 균핵병에 대해서는 50% 정도만의 방제효과를 나타냈다.

다) 오이의 노균병과 만할병에 대한 방제효과

오이 노균병에 대한 본 배양액의 방제효과는 크지 않았고, 만할병은 발생하지 않아 조사되지 못하였다.

라) 다른 과제에서 얻어진 방제효과 : 본 배양액 또는 약간 변형된 미생물제는 고추의 역병, 흰가루병과 인삼의 탄저병, 점무늬병, 모잘록병, 잣빛곰팡이병 등에 탁월한 방제효과를 보여 주고 있다.

4. 결과 요약

가. chitin deacetylase 생산균주의 선발 및 효소 특성

60여 균주로부터 chitin deacetylase를 배양여액으로 분리하는 *Rhizopus microsporus var. oligosporus* (KCTC 6969)를 선발하였다. 이 균주는 25 C에서 가장 좋은 성장을 나타냈으며, 효소 생산능력은 YPG보다 PDB에서 더 우수하였다. PDB에 ml당 10^5 의 포자현탁액을 접종하였을 경우에는 5일 배양, 10^7 의 포자현탁액을 접종하였을 경우에는 배양 3일후에 최고의 활성을 나타냈으며 chitin이나 chitosan에 의해서 유도되지 않았다. 또한 이 균주는 chitin agar plate에서의 생육이 아주 느렸고, chitinase도 생산하지 않았다. 이 균주는 60-kDa과 45-kDa의 두 chitin deacetylase를 생산하였는데, 효소활성은 60C, pH 7.0에서 가장 우수하였다.

나. 키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성과 그들의 조제

키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성은 식물병원균인 *Botrytis cinerea*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Cladosporium tenuissimum*, *Alternaria panax*, *Colletotrichum gloeosporioides* 와 *Fusarium oxysporium*에 대하여 조사되었다. 이들에 대한 항균 활성은 키틴 올리고당보다 키토올리고당에서 특이적으로 더 높았고, 키토올리고당 중에서도 5~6당에서 특이적으로 높았다. 그 키틴올리고당(6당)은 50ppm의 EC(50)을 나타낸 *A. panax*, *C. gloeosporioides*, *F. oxysporium* 보다 5ppm의 EC(50)을 나타낸 *B. cinerea*, *C. sphaerospermum*, *C. tenuissimum*에 대하여 더 높은 항균활성을 보여 주었다. 한편, *C. sphaerospermum*과 *C. tenuissimum*의 포자발아에 대한 Chitinase의 EC(50)은 20ppm이었는데, *B. cinerea*에 대해서는 200ppm, *F. oxysporium*에 대해서는 2000ppm 이상이었다. 정제된 chitinase에 의한 결정성키틴의 분해는 1시간 이후부터 검출되기 시작하여 6시간 이후 5~6당이 가장 많았고, 24시간 이후에는 1~3당만 검출되었다. chitin deacetylase의 활성은 6당의 기질에서 가장 우수하였고 그 다음으로 5당, 4당 순이었는데, 2당과 3당에 대한 활성은 매우 낮았다. 한편, glycol chitin에 대한 활성도 5당에 비하여 1/2이상의 수준을 유지하였는데, colloidal chitin이나 crystal chitin에 대한 활성은 매우 낮았다. 따라서 키틴으로부터 키토올리고당을 만들기 위해서는 chitinase를 이용하여 키틴을 키틴올리고당으로 만들고, 키틴올리고당에 chitin deacetylase를 처리하여 키토올리고당으로 만드는 방법이 합리적일 것으로 생각되었다.

다. 길항세균, Chitinase의 대량 생산과 식물 병 방제 효과 증진 전략

이전 실험들은 키틴분해세균을 키틴함유배지에서 배양하게 되면, 세균뿐만 아니라 Chitinase, 키틴올리고당을 생산하고, 여기에 chitin deacetylase를 첨가하면 키토올리고당을 생산하여 식물병에 더 좋은 방제효과를 나타낼 것이라 결과를 제시하였다. 따라서 이 연구에서는 이들을 대량으로 생산할 수 있는 시스템을 확립하였고, 이들의 병 방제효과를 조사하였다. 오이 흰가루병에

대한 방제효과는 *Lysobacter enzymogenensis* 와 *Chromobacterium* sp. strain C-61 의 단독 배양액보다 혼합배양액, 세균액 보다는 배양액, 그리고 배양액에 chitin deacetylase를 첨가하였을 경우에 더 우수하였다. 비닐하우스 포장에서 흰가루병에 대한 본 배양액의 방제효과는 살포시기의 환경에 크게 영향을 받았는데, 배양원액과 10배 희석액 모두 90% 이상의 높은 방제효과를 보여 주었고, 시판중인 흰가루병 미생물제제들보다 더 우수하였다. 또한 본 배양액은 토마토 흰가루병과 잎곰팡이병, 오이 뿌리혹선충에 우수한 방제효과를 보여주었다. 본 배양액은 저렴한 비용에 의해서 조제하기가 간편하기 때문에 많은 활용이 있으리라 기대된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 1년 차 연구개발 목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구개발 목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

구분	연구개발목표
1차년도 (2004)	열 및 알칼리에 안정되고 chitinase 활성이 증가된 유전자의 선발 항미생물성 키틴유도체 구멍 및 키틴올리고당 조제방법 확립 chitin deacetylase 생산균주 선발

나. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도 착 안 사 항	척도(점수)
1차년도 (2004)	○고활성, 내열성 chitinase 선발	30
	○키틴 혹은 키토올리고당에 따른 항균 효과 규명	30
	○효소생산능력이 우수한 균주의 선발	40

2. 연구개발 목표의 달성도

가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발

고활성 chitinase 1개 (Chi2-389), 내열성 chitinase 1개 (Chi2-33)를

얻을 수 있었으며, 내알칼리성 chitinase는 야생형과 유사하였다. 변이체 Chi2-389는 야생형 chitinase 보다 16% 정도 비활성도가 높게 나타났으며, 변이체 Ch2-33은 최적 온도가 B8-25는 50℃로 야생형과 비슷하였으나 열안정성은 야생형 보다 18% 높게 나타났다. ChBD 대신 CBD와 XBD를 ChBD 부위의 염기서열과 치환한 domain 치환체를 얻었다. CBD가 결손된 Chi48은 활성이 매우 미약하였으며, CBD가 ChBD 보다 colloidal chitin에 대한 친화력을 더 높게 반영하는 것으로 나타났다.

나. chitin deacetylase 생산균주의 선발 및 효소 특성

60여 균주로부터 chitin deacetylase를 배양여액으로 분리하는 *Rhizopus microsporus var. oligosporus* (KCTC 6969)를 선발하였다. 이 균주는 25 C에서 가장 좋은 생장을 나타냈으며, 효소 생산능력은 YPG보다 PDB에서 더 우수하였다. PDB에 ml당 10^5 의 포자현탁액을 접종하였을 경우에는 5일 배양, 10^7 의 포자현탁액을 접종하였을 경우에는 배양 3일후에 최고의 활성을 나타냈으며 chitin이나 chitosan에 의해서 유도되지 않았다. 또한 이 균주는 chitin agar plate에서의 생육이 아주 느렸고, chitinase도 생산하지 않았다. 이 균주는 60 kDa과 45 kDa의 두 chitin deacetylase를 생산하였는데, 효소활성은 60C, pH 7.0에서 가장 우수하였다.

3) 기술발전예의 기여도

가. 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발

비활성도와 열안정성이 증가된 변이체 효소를 얻었고, 도메인 치환으로 colloidal chitin에 대한 친화력이 증가된 효소를 얻은 결과는 분자효소학 및 개량 분야에 크게 기여할 것이다.

나. chitin deacetylase 생산균주의 선발 및 효소 특성

아직 보고되지 않았던 *Rhizopus microsporus var. oligosporus* (KCTC 6969)로부터 chitin deacetylase 생산을 확인한 점은 앞으로 활용 가치가 크다고 판단된다.

제 2 절 2년 차 연구개발 목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구개발 목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

구 분	연구개발 목표
2차년도 (2005)	chitin deacetylase 유전자의 클로닝 키틴올리고당으로부터 키토올리고당 조제 방법 확립 항미생물성 키틴유도체의 생산시스템 확립

나. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도 착안 사항	척도(점수)
2차년도 (2002)	○cDNA 클론 확보	25
	○chitinase 및 chitin deacetylase의 생산 및 분리	25
	○두 효소를 이용한 키토올리고당의 조제방법 확립	25
	○키틴으로부터 대량의 키토올리고당을 생산할 수 있는 조건	25

2. 연구개발 목표의 달성도

가. chitin deacetylase 유전자의 클로닝 및 효소 분리

*Rhizopus microsporus var. oligosporus*로부터 0.5 ~ 2.0 kb 범위의 mRNA를 얻어 합성된 cDNA로부터 약 870,000개의 primary library를 확보하였다. Chitin deacetylase 항체에 교잡된 cDNA plaque의 선발로 최종 2개의 plaque를 선발하였다. cDNA는 1,308 bp의 435개 아미노산으로된 단백질을 코딩하며, 예상되는 단백질의 분자량은 48,000 Da이었다. 이는

glycoprotein으로 판단되며 다른 곰팡이의 chitin deacetylase 단백질과 69% 이하의 유사성을 나타내었다.

나. 키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성과 그들의 조제

키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성을 몇 종류의 식물 병원균에 대하여 조사하였다. 이들에 대한 항균 활성은 키틴올리고당보다 키토올리고당에서 특이적으로 더 높았고, 키토올리고당 중에서도 5~6당에서 특이적으로 높았다. 정제된 chitinase에 의한 결정성키틴의 분해는 1시간 이후부터 검출되기 시작하여 6시간 이후 5~6당이 가장 많았고, 24시간 이후에는 1~3당만 검출되었다. chitin deacetylase의 활성은 6당의 기질에서 가장 우수하였고 그 다음으로 5당, 4당 순이었는데, 2당과 3당에 대한 활성은 매우 낮았다. 한편, glycol chitin에 대한 활성도 5당에 비하여 1/2이상의 수준을 유지하였는데, colloidal chitin이나 crystal chitin에 대한 활성은 매우 낮았다.

3. 기술발전에의 기여도

가. chitin deacetylase 유전자의 클로닝 및 효소 분리

새로운 chitin deacetylase의 유전자와 그 산물을 얻음으로 키틴올리고당을 키토올리고당으로 전환하는데 유리한 점을 제공할 것이다.

나. 키틴올리고당, 키토올리고당 및 Chitinase의 항균활성과 그들의 조제

키토올리고당의 항균력이 더 높음을 확인하였으므로 키틴으로부터 키토올리고당을 만들기 위해서는 chitinase를 이용하여 키틴을 키틴올리고당으로 만들고, 키틴올리고당에 chitin deacetylase를 처리하여 키토올리고당으로 만드는 방법이 합리적일 것으로 판단된다.

제 3 절 3년 차 연구개발 목표, 목표의 달성도 및 기여도

1. 연구개발 목표 및 평가의 착안점

가. 연구개발 목표

구 분	연구개발 목표
3차년도 (2006)	Chitin deacetylase 유전자 비교 및 <i>Bacillus</i> sp.에 chitin deacetylase 유전자의 도입, 발현 키틴분해미생물 및 키틴유도체를 토마토의 병 방제체계확립 키틴분해미생물 및 키틴유도체를 오이의 병 방제체계확립

나. 연구평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도 착안 사항	척도(점수)
3차년도 (2003)	○ <i>Bacillus</i> sp.에 효소 유전자 도입	40
	○토마토의 친환경적 병방제를 할 수 있는 우수 미생물제의 개발	30
	○오이의 친환경적 병방제를 할 수 있는 우수 미생물제의 개발	30

2. 연구개발 목표의 달성도

가. *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자의 도입 및 발현

가장 활성이 높은 transformant *B. subtilis* WB800 (pRDA83)의 상층액을 회수하여 효소활성을 조사한 결과, WB800 (pRDA83)에서 0.45 U/ml로 나타났으며, 이는 당초 공시균주 배양액에서 얻은 0.074 U/ml 보다 약 6배의 증가된 결과이다. *Bacillus subtilis* WB800 (pRDA83)를 12시간 배양하여 상

층액을 얻어 전기영동과 활성염색을 수행한 결과 형질전환주에서 공시균주의 상층농축액과 동일한 60 kDa 근처에서 활성 띠를 보였다. 이 결과로부터 공시균의 chitin deacetylase 유전자가 형질전환주에서 발현되는 것으로 확인되었다.

나. 길항세균, Chitinase의 대량 생산과 식물 병 방제 효과 증진 전략

오이 흰가루병에 대한 방제효과는 *Lysobacter enzymogenensis*와 *Chromobacterium* sp. strain C-61의 단독 배양액보다 혼합배양액, 세균액 보다는 배양액, 그리고 배양액에 chitin deacetylase를 첨가하였을 경우에 더 우수하였다. 비닐하우스 포장에서 흰가루병에 대한 본 배양액의 방제효과는 살포시기의 환경에 크게 영향을 받았는데, 배양원액과 10배 희석액 모두 90% 이상의 높은 방제효과를 보여 주었고, 시판중인 흰가루병 미생물제제들보다 더 우수하였다. 또한 본 배양액은 토마토 흰가루병과 잎곰팡이병, 오이 뿌리혹 선충에 우수한 방제효과를 보여주었다.

3. 기술발전에의 기여도

가. *Bacillus* sp.에 chitin deacetylase 유전자의 도입 및 발현

새로운 chitin deacetylase 유전자가 *Bacillus* sp.에서 발현되므로 세포 배양액을 바로 이용할 수 있는 유리한 점을 제공할 수 있다.

나. 길항세균, Chitinase의 대량 생산과 식물 병 방제 효과 증진 전략

Chitin deacetylase를 첨가하는 것이 병 방제에 더 효과적이라는 결과를 얻었으며, 본 배양액은 저렴한 비용에 의해서 조제하기가 간편하기 때문에 많은 활용이 있으리라 기대된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 효소활성 및 특성이 변화된 chitinase 유전자의 개발 및 chitin deacetylase 유전자의 클로닝

가. 추가 연구의 필요성

- 1) Chitinase 생산을 증대시키기 위한 프로모터 개발
- 2) Chitin deacetylase 생산을 증대시키기 위한 프로모터 개발
- 3) Chitin deacetylase의 효모 내 발현

나. 타 연구에의 응용

- 1) 탄수화물 생물소재 개발에 이용
- 2) Chitin deacetylase의 유용 esterase로 활용
- 3) 다른 종류의 외래단백질 발현시스템 적용

제 2 절 Chitinase, 키틴 및 키토올리고당을 이용한 식물 병 방제효과 증진 시스템 확립

가. 추가 연구의 필요성

- 1) Chitinase 및 Chitin deacetylase를 이용한 기능성키토올리고당의 개발
- 2) 식물병 방제효과를 더 증진시킬 수 있는 시스템의 개발
- 3) 식물병에 따른 본 미생물제의 방제 메뉴얼 개발

나. 타 연구에의 응용

- 1) 다른 식물 병 방제에 활용
- 2) 기능성 키토올리고당 (예, 항균 및 항암제)의 개발
- 3) 각종 식물병의 친환경적 방제에 활용

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

키틴의 아세틸기를 제거함으로써 키토산이 만들어지는데, 현재 이용되고 있는 키토산의 대부분은 알칼리 처리에 의해서 만들어지고 있고, 키토올리고당은 chitosanase를 이용한 키토산의 분해에 의해서 얻으려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 키틴올리고당 혹은 키토올리고당이 인간, 가축 및 식물의 다양한 병원균과 식품의 여러 부패균들을 억제하는 것으로 보고되었지만, 모든 올리고당이 모든 병원균을 억제하는 것이 아니라 올리고당의 길이, 대상 병원균의 종류에 따라 억제정도가 각각 다르다. 따라서, 해외에서는 대상 병원균을 가장 잘 억제할 수 있는 올리고당의 종류, 길이 및 농도 등을 정확히 파악하려는 연구가 시도되고 있다.

이러한 키틴유도체는 생물 혹은 효소화학적 방법에 의해서 만들어져야 한다. 특히 인간의 질병치료제나 식품의 향미생물제로 이용될 올리고당은 생물 혹은 효소화학적 방법으로 만들어져야 할 것이며, 키틴유도체를 만들 수 있는 효소(chitinase, chitin deacetylase 등) 및 균주들은 상업화가 가능하다. 이를 위하여 해외에서는 굴지의 생물산업 회사들이 효소이용 키틴유도체를 만들려는 노력을 기울이고 있다.

최근에는 chitinase를 이용하여 키틴을 키틴올리고당으로 만들고, chitin deacetylase를 이용하여 키틴올리고당을 키토올리고당으로 만들려고 하고 있으며, chitin deacetylase의 3차구조를 연구하여 효소의 특성을 개량하려는 연구가 시도되고 있다.

제 7 장 참고문헌

- 1) Aiba, S. 1994. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by N-acetylation. Carbohydr Res. 265(2):323-328.
- 2) Alfonso, C. et al., 1995. Purification of a heat stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. Curr. Microbiol. 30 : 49-54.
- 3) Aronson, N. N., C. J. Blanchard, and J. D. Madura. 1997. Homology modeling of glycosyl hydrolase samily 18 enzymes and proteins. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 37:999-1005.
- 4) Broadway, R., M. D. L. Williams, W. C. Kain, G. E. Harman, M. Lorito, and D. P. Labeda. 1995. Partial characterization of chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus*. Lett. Appl. Microbiol. 20:271-276
- 5) Broadway, R., C. Gongora, W. C. Kain, J. P. Sanderson, J. A. Monroy, K. C. Bennett, J. B. Warner, and M. P. Hoffman. 1998. Novel chitinolytic enzymes with biological activity against herbivorous insects. J. Chem. Ecol. 24:985-998.
- 6) Chen, J. P., F. Nagayama, and M. C. Chang. 1991. Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 57:2426-2428
- 7) Cheng, C. Y., Y. K. Li. 2000. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. Biotechnol Appl Biochem. 32:197-203.
- 8) Chernin, L., L. Fuente, V. Sobolev, S. Haren, C. Vorgias, A. Oppenheim, and I. Chet. 1997. Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. Appl. Environ. Microbiol. 63:834-839

- 9) Christodoulidou, A., V. Bouriotis, G. Thireos. 1996. Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 271(49):31420-31425.
- 10) Christodoulidou, A., P. Briza, A. Ellinger, V. Bouriotis. 1999. Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes. *FEBS Lett.* 460(2):275-279.
- 11) Cramer, A., S. A. Raillard, E. Bermudez, W. P. Stemmer. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution, *Nature.* 391(6664): 288-291
- 12) Ding, X., B. Gopalakrishnan, L. B. Johnson, F. F. White, X. Wang, T. D. Morgan, K. J. Kramer, S. Muthukrishnan. 1998. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. *Transgenic Res.* 7:77-84
- 13) Gao, X. et al.. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J. Biochem.* 117 :257-263.
- 14) Gal, S. W., J. Y. Choi, C. Y. Kim, Y. H. Cheong, Y. J. Choi, S. Y. Lee, J. D. Bahk, M. J. Cho. 1998. Cloning of the 52-kDa chitinase gene from *Serratia marcescens* KCTC2172 and its proteolytic cleavage into an active 35-kDa enzyme. *FEMS Microbiol Lett.* 160(1):151-158.
- 15) Harayama S. 1998. Artificial evolution by DNA shuffling. *Trends Biotechnol.* 16(2): 76-82
- 16) Hashimoto, M., T. Ikegami, S. Seino, N. Ohuchi, H. Fukada, J. Sugiyama, M. Shirakawa, and T. Watanabe. 2000. Expression and characterization of the chitin-binding domain of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12. *J. Bacteriol.* 182:3045-3054.
- 17) Henrissat, B. 1999. Classification of chitinases modules, p. 137-156, *In* P. Jolles and R. A. A. Muzzarelli (ed.), *Chitin and chitinases*, Birkhauser Verlag, Basel.

- 18) Hopfner, K. P., E. Kopetzki, G. B. Kresse, W. Bode, R. Huber, R. A. Engh. 1998. New enzyme lineages by subdomain shuffling. Proc Natl Acad Sci USA. 17: 9813-9818
- 19) Ikegami, T., T. Okada, M. Hashimoto, S. Seino, T. Watanabe, and M. Shirakawa. 2000. Solution structure of the chitin-binding domain of *Bacillus circulans* WL-12 chitinase A1. J.Biol.Chem. 275:13654-13661.
- 20) Kafetzopoulos, D. et al., 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 2564-2568
- 21) Kafetzopoulos, D. et al., 1993. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 : 8005-8008.
- 22) Kas, H.S. 1997. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. J Microencapsul. 14(6):689-711.
- 23) Kaneko, S, A. Kuno, Z. Fujimoto, D. Shimizu, S. Machida, Y. Sato, K. Yura, M. Go, H. Mizuno, K. Taira, I. Kusakabe, K. Hayashi. 1999. An investigation of the nature and function of module 10 in a family F/10 xylanase FXYN of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by module shuffling with the Cex of *Cellulomonas fimi* and by site-directed mutagenesis, FEBS. Lett. 460(1): 61-66
- 24) Kim, G. J, Y. H. Cheon, H. S. Kim. 2000. Directed evolution of a novel N-carbamylase/ D-hydantoinase fusion enzyme for functional expression with enhanced stability, Biotechnol Bioeng. 68(2): 211-217
- 25) Kim, H, M. Goto, H. J. Jeong, K. H. Jung, I. Kwon, K. Furukawa. 1998. Functional analysis of a hybrid endoglucanase of bacterial origin having a cellulose binding domain from 10. Ahn, D. H., H. Kim, M. Y. Pack. 1997. Immobilization of β -glucosidase using the cellulose-binding domain of *Bacillus subtilis* endo- β -1,4-glucanase,

- Biotechnol. Lett.* 19: 483-486.a fungal exoglucanase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75: 193-204
- 26) Kim, H., Joong-Hoon Ahn, Jenifer M Gorlach, Claudio Caprari, John S. Scott-Craig, and Jonathan D Walton. 2001. Mutational analysis of β -glucanase genes from the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Mol. Plant-Microbe Int.* 14(2):1436-1443.
- 27) Kim, H., Kyung Hwa Jung, and Moo Young Pack. 2000. Molecular characterization of *xynX*, a gene encoding a multidomain xylanase with a thermostablizing domain from *Clostridium thermocellum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:521-527.
- 28) Kim, J. K, I. C. Jang, R. Wu, W. N. Zuo, R. S. Boston, Y. H. Lee, I. P. Ahn, and B. H. Nahm. 2003. Co-expression of a modified maize ribosome-inactivating protein and a rice basic chitinase gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to sheath blight. *Transgenic Res.* 12(4):475-84.
- 29) Kim, Y. S, H. C. Jung, J. G. Pan. 2000. Bactrial cell surface display of an enzyme library for selective screening of improved cellulase variants. *Appl Environ Microbiol.* 66(2): 788-793
- 30) Kobayashi, D. Y., R. M. Reedy, J. A. Bick, and P. V. Oudemans. 2002. Characterization of a chitinase from *Stenotrophomonas maltophilia*. Strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1047-1054.
- 31) Lin, C. S., H. C. Chen, and F. P. Lin. 1997. Expression and characterization of the recombinant gene encoding chitinase from *Aeromonas caviae*. *Enzyme Microb. Technol.* 21:472-478.
- 32) Lonhienne, T., K. Mavromatis, C. E. Vorgias, L. Buchon, C. Gerday, and V. Bouriotis. 2001. Cloning, sequences, and characterization of two chitinase genes from the antarctic *Arthrobacter* sp. strain TAD20: isolation and partial characterization of the enzymes. *J. Bacteriol.* 183:1773-1779

- 33) Malik, A, S. Wenuganen, A. Suwanto, B. Tjahjono. 2003. Cloning, DNA sequence, and expression of *Aeromonas caviae* WS7b chitinase gene. Mol Biotechnol. 23(1):1-10.
- 34) Martinou, A, D. Koutsioulis, V. Bouriotis. 2002. Expression, purification, and characterization of a cobalt-activated chitin deacetylase (Cda2p) from *Saccharomyces cerevisiae*. Protein Expr Purif. 24(1):111-116.
- 35) Mendgen, K. et al., 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. Annu. Rev. Phytopathol. 34 : 367-386.
- 36) Mishra, C, C. E. Semino, K.J. McCreath, H. de la Vega, B. J. Jones, C. A. Specht, P. W. Robbins. 1997. Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 30;13(4):327-36.
- 37) No, H. K, N. Y. Park, S. H. Lee, and S. P. Meyers. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. Int J Food Microbiol. 74(1-2):65-72.
- 38) Oh, H.I, Y.J. Kim, E.J. Chang, and J.Y. Kim. 2001. Antimicrobial characteristics of chitosans against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. Biosci Biotechnol Biochem. 65(11):2378-83.
- 39) Park, H. Y., C. H. Pan, M. Y. So, J. H. Ah, D. H. Jo, S. I. Kim. 2002. Purification, characterization, and cDNA cloning of rice class III chitinase. Mol Cells. 28:13(1):69-76.
- 40) Park, S. K., H. Y. Lee, and J. W. Huh. 1995. Production and some properties of chitinolytic enzymes by antagonistic bacteria. Korean J. plant Pathol. 11:258-264.
- 41) Park, S. K., H. Y. Lee, and K. C. Kim. 1995. Antagonistic effect of chitinolytic bacteria on soilborne plant pathogens. Korean J. Plant Pathol. 11:47-52.

- 42) Park, S. K., H. Y. Lee, and K. C. Kim. 1995. Role of chitinase produced by *Chromobacterium violaceum* in the suppression of *Rhizoctonia* damping-off. Korean J. Plant Pathol. 11:304-311.
- 43) Park, S. K, Y. R. Chung and H. C. Chung. 1998. Enzymatic characteristics of Tn5 insertion mutants of *Chromobacterium violaceum* reduced in chitinolytic and antifungal ability. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).
- 44) Park S. K. and G. E. Harmann. 1998. Cloning, sequencing and expression of a *Chromobacterium violaceum* endochitinase gene in *Escherichia coli*. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).
- 45) Park, S. K. and G. E. Harmann. 1998. Production of a *Trichoderma harzianum* endochitinase by *Escherichia coli*. Korean J. Plant Pathol (ABSTRACT).
- 46) Park, S. R., S. J. Cho, M. K. Kim, S. K. Ryu, W. J. Lim, C. L. An, S. Y. Hong, J. H. Kim, H. Kim, and H. D. Yun. 2002. Activity enhancement of Cel5Z from *Pectobacterium chrysanthemi* PY35 by removing C-terminal region, Biochemical and Biophysical Research Communications. 291:425-430.
- 47) Qin, C, Y. Du, L. Xiao, Z. Li, and X. Gao. 2002. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. Int J Biol Macromol. 31(1-3):111-117.
- 48) Rabea, E.I, M.E. Badawy, C.V. Stevens, G. Smagghe, and W. Steurbaut. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 4(6):1457-1465.
- 49) Ryu, D.D., D. H. Nam. 2000. Recent progress in biomolecular engineering. Biotechnol Prog. 16(1): 2-16
- 50) Shahicli, F., J. K. V. Arachchi, and Y. J. Jeon. 1999. Food applications of chitin and chitosans Trends in Food Science and Technology. 10(2) : 37-51
- 51) Shapira, R., A. Ordentlich, I. Chet, and A. B. Oppenheim. 1989.

- Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. *Phytopathology* 79:1246-1249.
- 52) Shin, E.-S. M.-J. Yang, K. H. Jung, E.-J. Kwon, J. S. Jung, S. K. Park, J. Kim, H. D. Yun, H. Kim. 2002. Influence of the transposition of the thermostabilizing domain of *Clostridium thermocellum* Xylanase (XynX) on xylan-binding and thermostabilization, *Applied and Environmental Microbiology*. 68(7):3496-3501.
- 53) Sitrit, Y., C. E. Vorgias, I. Chet, and A. B. Oppenheim. 1995. Cloning and primary structure of the chiA gene from *Aeromonas caviae*. *J. bacteriol.* 177:4187-4189
- 54) Sneh, B. 1981. Use of Rhizosphere chitinolytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *diantbi* in carnation. *Phytopath. Z.* 100:251-256
- 55) Sun, F. 1999. Modeling DNA shuffling. *J Comput Biol.* 6(1): 77-90
- 56) Svitil, A. L., and Kirchman, D. L. 1998. A chitin-binding domain in a marine bacterial chitinase and other microbial chitinases: implications for the ecology and evolution of 1,4-beta-glycanases. *Microbiol.* 144:1299-1308.
- 57) Suzuki, K., M. Taiyoji, N. Sugawara, N. Nikaidou, and T. Watanabe. 1999. The third chitinase gene (*ChiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem. J.* 343:587-596
- 58) Tokuyasu, K, M. Ohnishi-Kameyama, K. Hayashi. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60(10):1598-603.
- 59) Tokuyasu, K. et al., 1999. Cloning and expression of chitin deacetylase from a deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Biosci. Bioeng.* 87 : 418-423.

- 60) Tsigos, I., V. Bouriotis, 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. J. Biol. Chem. 270:26286-26291.
- 61) Tsigos, I., A. Martinou, D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. Trends Biotechnol. 18(7):305-312.
- 62) Tsigos, I., N. Zydowicz, A. Martinou, A. Domard, and V. Bouriotis. 1999. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. Eur J Biochem. 261(3):698-705.
- 63) Tsujibo, H., H. Orikoshi, K. Shiotani, M. Hayashi, J. Umeda, K. Miyamoto, C. Imada, Y. Okami, and Y. Inamori. 1998. Characterization of chitinase C from a marine bacterium, *Altermonas* sp. strain O-7, and its corresponding gene and domain structure. Appl. Environ. Microbiol. 64:472-478
- 64) Ueda, M., M. Shiro, T. Kawaguchi, and M. Arai. 1996. Expression of the chitinase III gene of *Aeromonas* sp. no. 10S-24 in *Escherichia coli*. 60:1195-1197
- 65) Van Aalten, D. M. F., D. Komander, B. Synstad, S. Gaseidnes, M. G. Peter, and V. G. H. Eijsink. 2001. Structural insights into the catalytic mechanism of a family 18 exo-chitinase. Proc. Natl. Acad. Scil. USA. 98:8979-8984.
- 66) Van Aalten, D. M. F., B. Synstad, M. B. Brurberg, E. Hough, B. W. Riise, V. G. H. Eijsink, and R. K. Wierenga. 2000. Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1,9-Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:5842-5847
- 67) Watanabe, T., K. Suzuki, W. Oyanagi, K. Ohnishi, and H. Tanaka. 1990. Gene cloning of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 revealed its evolutionary relationship to *Serratia* chitinase and to the type III homology units of fibronectin. J. Biol. Chem. 265:15659-15665

- 68) Win N. N., and W. F. Stevens. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57(3):334-341.
- 69) Wu, M. L., Y. C. Chuang, J. P. Chen, C. S. Chen, and M. C. Chang. 2001. Identification and characterization of the three chitin-binding domains within the multidomain chitinase Chi92 from *Aeromonas hydrophila* JP101. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5100-5106.
- 70) Zhang, H., Y. Du, X. Yu, M. Mitsutomi, S. Aiba. 1999. Preparation of chitoooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *Carbohydr Res.* 320(3-4):257-60.
- 71) Willem F. Stevens., Kyaw Nyein Aye, Renuka Karuppuswamy, Tangir Ahamed. 2006. Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresource Technology* 97:577-582.
- 72) Yoshio ARAKI and Eiji ITO,. 1975. A Pathway of Chitosan Formation in *Mucor rouxii*. *Eur.J. Biochem.* 55:71-78.
- 73) Charles A. Specht,. Chitra Mishra, Carlos E. Semino, Kenneth J. McCreath, Humberto De La Vega, Beverly J. Jones, and Phillips W. Robbins. 1997. Cloning and Expression of Two Chitin Deacetylase Genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST VOL.* 13:327-336
- 74) Iason Tsigos,. Nathalie Zydowicz, Aggeliki Martinou, Alain Domard and Vassilis Bouriotis. 1999. Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on *N*-acetylchitoooligosaccharides. *Eur. J. Biochem.* 261:698-705
- 75) Iason Tsigos,. Aggeliki Martinou, Dimitris Kafetzopoulos and Vassilis Bouriotis. 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Tibtech* July 2000 (Vol. 18)
- 76) Tokuyasu K., Ohnishi-Kameyama M, Hayashi K. 1996. Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Biosci Biotechnol Biochem.*

Oct;60(10):1598-603.

- 77) Karine Blondeau,. Binesh Shrestha, Willem F. Stevens, Francoise L. Hegarat. 2004. Expression of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* in *Pichia pastoris*: purification and characterization. *Protein Expression and Purification*. 38:196-204.
- 78) Kazuo Ohishi,. Kohji Murase, Toshaya Ohta, and Hideo Etoh. 2000. Cloning and Sequencing of the Deacetylase Gene from *Vibrio alginolyticus* H-8. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 90, No. 5:561-563.
- 79) Ken Tokuyasu,. Mayumi Ohnishi-K, K Hayashi, and Yutaka Mori. 1999. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 87, No, 4:418-423.
- 80) Vassilis Bouriotis,. Dimitris Kafetzopoulos, and Aggeliki Martinou. April 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: Purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 90, pp. 2564-2568.
- 81) Vassilis Bouriotis,. Iason Tsigos. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *The Journal of Biological Chemistry*. PP. 26286-26291.
- 82) Trudel J,. Asselin A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. May 1; 178(2):362-6.
- 83) Trudel J,. Asselin A. 1990. Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*. Sep; 189(2):249-53.
- 84) Gao XD,. Katsumoto T, Onodera K. 1995. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *J Biochem(Tokyo)*. Feb;117(2):257-63.
- 85) Alfonso C, Nuero OM, Santamaria F, Reyes F. 1995. Purification

of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Curr Microbiol.* Jan;30(1):49-54.

- 86) 박노동, 국주희, 정우진, 김길용. 2005. 미생물 Chitin Deacetylase의 특성과 응용. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 33, No. 1:9-15.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술 개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.