

발간등록번호

11-1541000-001430-01

맞춤형 효소를 이용한 생물농약 성능 향상 기술 개발
(Improvement of insecticidal activity of bioinsecticide
by using customized enzyme)

한국생명공학연구원

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “맞춤형 효소를 이용한 생물농약 성능 향상 기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 최수근

세부연구책임자 : 최수근

연 구 원 : 박승환

연 구 원 : 정다은

연 구 원 : 이채영

협동연구기관명 : (주)제노포커스

협동연구책임자 : 김의중

요 약 문

I. 제 목 : 맞춤형 효소를 이용한 생물농약 성능 향상 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 화학농약은 토양 및 수질오염을 유발하고 천적 및 유익 생물에 피해를 입히며 농약사용자의 급성 및 만성 중독을 일으켜 사회적 문제가 되고 있음. 최근 안전한 먹거리에 대한 관심이 증가하고 있으며 화학농약 사용에 대한 규제가 강화되고 있는 등 친환경 농업의 중요성이 강조되고 있어 생물농약의 수요가 증대되리라 예상되고 있음.
- 현재 국내외 생물농약 중 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 균주를 이용한 Bt제가 가장 많이 사용되고 있으나 화학농약에 비해 활성이 낮고 포장에서의 재현성이 저조하며 가격이 비싸 시장 확대에 어려움이 있음.
- 따라서 시장의 요구조건인 효과가 확실하고 가격이 저렴한 제품을 만들기 위해서는 성능이 획기적으로 향상된 Bt살충제 등 새로운 개념의 생물농약 개발이 요구됨. 이는 생물농약 시장 확대에 기여하게 될 것임.
- Bt는 포자를 형성하는 그람양성세균으로 포자형성기에 거대한 단백질 크리스탈을 만드는데 이 크리스탈이 특정 곤충에 대해 살충효과가 있음. 곤충이 크리스탈을 먹으면 중장(midgut)의 pH에 의해 크리스탈이 단일 폴리펩타이드로 분해되며 다시 중장 내의 단백질 분해효소에 의해 절단되면서 활성화 됨. 활성화된 Bt 독소는 중장 내의 특정 receptor에 결합하여 pore를 형성함으로써 결국 곤충이 죽게됨.
- 이와 같이 Bt 독소의 살충활성은 곤충의 중장 내에서 일어나는데 곤충의 중장에는 peritrophic membrane (PM)이 존재함. PM은 chitin이 다량 함유된 chitin-protein matrix로써 여러 층을 이루어 중장의 표면을 둘러싸고 있음. 이 PM은 음식물 덩어리, 효소, 또는 병원균으로부터 중장을 보호하는 역할을 담당하고 있음. PM이 독소단백질이나 병원균으로부터 중장을 보호하고 있기 때문에 PM 형성을 방해하는 전략은 병원성 곤충의 제어에 좋은 타겟이 될 수 있음. 또한 PM 형성 억제제는 Bt 독소와 같은 생물농약이 중장 표면에 접근하는 것이 용이하여 생물농약의 활성을 증대시킬 것임.
- PM은 키틴이 다량 함유되어 있기 때문에 키틴분해효소가 PM의 형성을 억제하는데 효과가 있을 것이라 생각되는데 실제로 키틴분해효소를 이용하여 Bt 활성을 증가시키는 보고가 다수 있음. 담배잎, *Bt israelensis*, *Bacillus licheniformis*, *B. circulans*, *Bt kurstaki* HD-1 및 Bt 분리균 등에서 유래한 키틴분해효소가 Bt 제의 살충활성을 증가시킨다는 보고가 있음.
- 또한 고등동물의 Galectin-1 (Gal1), 식물성 Lectin (Lec) 등 키틴과 결합하는 단백질들도 PM의 키틴과 결합할 수 있고 이 결합은 정상적인 PM 형성을 방해하여 궁극적으로 해당

곤충에 대해 살충활성이 나타난다는 보고가 있음.

- 이와 같이 키틴분해효소, GalI 및 식물성 Lec 등은 곤충의 PM에 결합하여 정상적인 PM 형성을 방해하기 때문에 기존 생물농약과 같이 사용하면 기존 생물농약의 성능을 향상시킬 수 있을 것으로 기대됨. 이를 위해서는 비용이 적게 들고 안전한 대량생산 방법이 있어야 함.
- 본 과제에서는 기존에 사용되고 있는 생물농약의 성능을 향상시키기 위하여 곤충의 PM을 타겟으로 정하고 PM 형성을 억제하는 기능을 가진 단백질을 선정하여 그 유전자를 확보한 후 이를 안전하면서 적은 비용으로 대량생산이 가능한 숙주미생물에서 대량발현 할 수 있는 방법을 확립하고자 함.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 수행내용

가. 키틴 분해효소 확보 및 대량 생산 기술 개발

- 서로 다른 62종의 Bt 균주로부터 degenerate primer를 사용하여 총 119종의 키틴분해효소 클로닝 및 염기서열 비교 분석
- 키틴분해효소 대량발현을 위해 Bt *cry* 프로모터를 이용한 맞춤형 바실러스 발현시스템 개발
- 개발된 발현시스템을 이용하여 *Bacillus subtilis*에서 키틴분해효소 대량발현
- 곰팡이 유래 3종의 chitinase 클로닝 및 염기서열 분석
- 3종의 곰팡이 유래 chitinase 과발현을 위한 발현벡터 제작 및 *Aspergillus niger*를 숙주균으로 대량 발현

나. 분자진화기술을 이용한 키틴 분해효소 개량

- 확보된 키틴분해효소 유전자 중 우수한 효소활성을 보이는 유전자들을 선정하여 이들을 대상으로 family shuffling 수행
- 키틴분해 활성이 증가된 변이체 확보

다. 키틴분해효소 활성 검정

- 확보된 키틴분해효소 및 개량효소의 *Rhizoctonia solani* 및 *Pythium ultimum*에 대한 항진균 활성 확인
- 확보된 키틴분해효소와 glucanase의 synergistic antifungal activity 확인

라. 신규 생물농약 개발

- 병해충의 공격에 대항하여 식물에서 생산되는 pathogenesis-related (PR) protein 중 PR3, PR4 및 PR8 chitinase 유전자를 합성생물학을 이용하여 생합성
- 바실러스 발현시스템을 이용하여 PR3, PR4 및 PR8 chitinase 대량발현
- PR3 chitinase의 온실가루이에 대한 살충활성 검정
- 광범위한 곤충에 대해 우수한 살충활성을 가지며 고등생물에 대한 독성이 없어 친환경적이

지만 대량생산이 어려운 Gal1 기반 신규 생물농약 개발을 위해 합성생물학을 이용한 *gal1* 유전자 생합성

- 바실러스 발현시스템을 이용한 Gal1 대량발현 및 살충활성 검증
- 우수한 살충활성을 가진 식물성 *lec* 유전자 생합성
- 바실러스 발현시스템을 이용한 *lec* 대량발현

마. 실용화 연구

- *Paenibacillus polymyxa* PoxB는 대장균에서 과발현되었을 경우 효소 활성을 가지는 inclusion body를 만들며 C-terminal에 다른 단백질을 fusion 하여도 active inclusion body를 만드는 능력이 있음
- *P. polymyxa* PoxB를 fusion 파트너로 이용하여 Gal1과 Bt chitinase의 active inclusion body 형성
- 바실러스 포자를 PM을 타겟으로 하는 효소 및 단백질의 운반 도구로 사용하기 위하여 바실러스tm 포자 표면에 효소 및 단백질을 display함
- Gal1의 *B. subtilis* 포자 표면 display
- PGPR 또는 ISR 효과가 있는 바실러스 균에 키틴분해효소를 과발현하여 성능을 향상시킴
- 보유중인 서로 다른 85종의 *Bacillus* 균이 내는 휘발성물질의 식물생장 및 ISR 효과 조사
- 이 중 우수한 식물생장 촉진 효과 및 ISR 효과를 보이는 균을 대상으로 Bt chitinase를 도입하여 과발현 및 항진균 활성 조사

2. 연구범위 및 방법

가. 키틴 분해효소 확보 및 대량 생산 기술 개발

- CAZy와 NCBI로부터 Bt 키틴분해효소 정보를 수집하고 MEGA4 및 Phylyp 프로그램을 사용하여 염기서열을 비교 분석한 후 그로부터 degenerate primer 제작
- 제작된 primer를 이용하여 본 연구팀에서 확보하고 있는 Bt 균주 중 서로 다른 62종의 Bt 균주 chromosome을 대상으로 PCR을 수행하여 endo-type 키틴 분해 효소 확보
- endo-type chitinase의 대량발현을 위해 Bt *cry* 프로모터를 이용한 맞춤형 발현시스템 개발
- 개발된 발현시스템을 이용하여 *B. subtilis*에서 Bt chitinase 과발현
- *Trichoderma harzianum*으로부터 RNA를 분리하여 cDNA를 제작하고 그로부터 PCR을 이용하여 Chitinase 유전자 확보
- *A. niger*용 integration 벡터에 *gpdA* 프로모터, chitinase 유전자 및 *pdca* terminator를 클로닝하여 발현벡터 제작
- 발효조에서 배양하여 발현양 조사

나. 분자진화기술을 이용한 키틴 분해효소 개량

- 확보된 키틴분해효소 유전자 중 우수한 효소활성을 보이는 유전자 선정
- 이들 유전자를 혼합하여 DNase I을 이용한 DNA shuffling 방법으로 분자진화 수행
- 바실러스에서 라이브러리 작업을 수행하기 위하여 형질전환 효율이 획기적으로 증대된 *Bacillus* 균주 제작
- Chitinase 활성검정을 통한 우수활성 변이체 선발

다. 키틴분해효소 활성 검정

- 키틴분해효소 및 개량효소의 *Rhizoctonia solani* 및 *Pythium ultimum* 등 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성 검정
- 확보된 키틴분해효소와 glucanase를 조합하여 synergistic antifungal activity 확인을 위한 항진균 활성 검정

라. 신규 생물농약 개발

- *gall*, *lec*, PR3, PR4 및 PR8 전체 유전자를 코오돈 최적화기술을 이용하여 생합성
- 합성된 유전자들을 기 개발된 바실러스 발현시스템을 이용하여 발현벡터 제작
- *Bacillus* 숙주균을 사용하여 Gall, Lec, PR3, PR4 및 PR8 대량발현
- Gall, Lec 및 PR3가 대량발현된 바실러스균을 이용하여 온실가루이 및 배추좀나방을 대상으로 살충활성 검정

마. 실용화 연구

- *P. polymyxa* *poxB* 유전자의 C-terminal region에 *gall* 및 Bt chitinase 유전자 fusion
- Fusion construct를 대장균에 도입한 후 inclusion body (IB) 형성 여부 관찰
- IB 분리 후 chitinase 효소 활성 측정
- Gall의 포자표면 display 여부를 검정하기 위하여 *gall* 유전자와 *gfp* 유전자 fusion
- Fusion construct를 *Bacillus*에 도입, 과발현 시킨 후 포자를 순수분리 하고 Flow cytometer를 이용하여 표면발현 여부 검정
- 보유 중인 서로 다른 85종의 *Bacillus* 균의 휘발성 물질이 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 성장과 ISR에 미치는 영향을 조사
- 상기 휘발성 물질의 ISR 효과 검정을 위해 식물병원균 *Erwinia cartovora*에 대한 병저항성 측정
- 식물생장 및 ISR 효과가 우수한 *Bacillus* 균주에 Bt chitinase 도입 및 과발현

IV. 연구개발결과

1. 키틴 분해효소 확보 및 대량발현

가. Bt chitinase 개발

- CAZy와 NCBI의 database를 통해 현재까지 NCBI에 등록된 58개의 Bt 유래의 키틴 분해

효소 유전자의 nucleotide 및 amino acid 서열 데이터를 확보하였음.

- 확보한 데이터 중 부분 sequencing 되었거나 잘못된 자료들을 제외하여 46개의 데이터를 얻을 수 있었는데 36개의 endo-type과 10개의 exo-type으로 나눌 수 있음.
- Chitinase의 nucleotide 서열 비교를 통해 상동성이 높은 5'말단과 3'말단 부분을 바탕으로 endo-type 키틴 분해 효소와 exo-type 키틴 분해 효소 유전자의 degenerate primer를 제작하였음.
- 제작된 primer를 이용하여 본 연구팀에서 확보하고 있는 Bt 균주 중 서로 다른 62종의 Bt 균주 chromosome을 대상으로 PCR을 수행하여 각각 endo-/exo-type 키틴 분해 효소로 추정되는 약 2 kb와 약 1.2 kb의 PCR 산물을 얻었음. Endo-type 키틴 분해 효소의 경우 57개, exo-type 키틴 분해 효소의 경우 62개의 PCR 산물을 확보하였음.
- Endo-type 키틴 분해 효소 유전자의 염기서열을 결정하였음.
- endo-type chitinase의 대량발현을 위해 바실러스 발현시스템을 개발하였음.
- 현재 전 세계에서 생산되고 있는 산업용 효소의 60%가 *Bacillus*에서 생산되고 있을 정도로 *B. subtilis*는 산업적으로 중요한 균주이지만 상업적으로 접근 가능한 발현시스템은 거의 없음.
- 또한 바실러스 발현시스템의 문제점은 대장균과 비교하여 여전히 강력하고 조절 가능한 프로모터가 없고, 많은 단백질 분해효소의 존재로 인해 발현된 단백질의 분해가 일어난다.
- 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 강력한 프로모터를 확보하고 균주개량을 통하여 바실러스 발현시스템을 개발하였음.
- Bt의 독소단백질 유전자 (*cry*)의 프로모터를 선정하였는데 이는 세포건체 중량의 25 내지 30% 정도의 발현양을 보이는 강력한 프로모터임.
- 선정된 프로모터는 3차에 걸쳐 개량하였고 Gfp의 발현양을 조사한 결과 초기 wild-type 프로모터에 비해 약 40배의 발현양 증가를 보였음.
- 개발된 발현시스템을 이용하여 Bt chitinase의 대량발현을 시도한 결과 과발현에 성공하였음.

나. 곰팡이 유래 키틴 분해효소 개발

- 우수한 항진균 활성을 가진 *Trichoderma harzianum* chitinase를 생산하기 위해서 *Aspergillus*에서 재조합 발현 연구를 수행하였음.
- 다양한 *T. harzianum* KCCM 기탁 균주들로부터 *nag1*, *ech42* 및 *chit36P* 3종의 chitinase 유전자를 확보하였음.
- 이중, *T. harzianum* TM 유래 *Chit36P* 유전자는 *Botrytis cinerea* 포자의 발아를 억제하고, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfisii* 성장을 저해하는 등 항균활성이 비교적 잘 알려진 AAK 54377 단백질에 해당함.
- Chit36P 발현: pASP31-Chit36P vector 와 pASP33-Chit36P vector를 *A. niger* ACK447균주에 형질전환하였음. 플라스크 배양 결과 *glaA* signal peptide 이용 시에는 발현률이 현저히 낮았으며, Native signal peptide 발현 시 발현률이 높음을 확인함. 플라스크 배양한 결

과 10.55 U/ml로 확인되었으며, 최적화된 배지 조건으로 발효조에서 배양한 결과, 35 U/ml의 높은 활성을 보였음.

- Ech42 발현: pASP31-Ech42 vector 와 pASP33-Ech42 vector를 *A. niger* 균주에 형질전환한 후 2% chitin이 포함된 배지에서 분해능을 비교한 결과, *glaA* signal peptide 이용 시에는 발현률이 현저히 낮았으며, native signal peptide 이용 시 발현됨을 확인함. 플라스크 배양에서 500 U/ml 발현됨을 확인하였으며, 배지 최적화를 거쳐 최종 발효조에서 최대 1,100 U/ml 까지 생산 가능함을 확인함.
- Nag1 발현: pASP33-Nag1 vector를 *A. niger* 균주에 형질전환하여 선별된 형질전환체를 플라스크 배양한 결과 21Nag1-10을 포함한 균주의 chitinase 활성은 101.2 U/ml로 확인되었음. 발효조에서 탄소원 및 질소원에 따라 발현량이 현저히 차이가 나며, 그 중 M1, M2 배지 조성에서 가장 높게 발현됨을 확인함. 배지 및 발효조 최적 조건에서 500 U/ml, 5 g/L 수준으로 과량 생산됨을 확인하였음.

2. 분자진화기술을 이용한 키틴 분해효소 개량

- Bt endochitinase의 분자진화를 위해 최종 31개의 균주로부터 유래한 31개 endochitinase의 nucleotide sequence를 선택하였음.
- Chitinase 개량을 위한 family shuffling을 위해서는 먼저 바실러스 속주균의 낮은 형질전환 효율을 극복해야 하는 것이 필수적임. 이를 위해 속주균이 가지고 있는 restriction-modification (RM) 시스템을 제거하여 형질전환 효율이 최소 10배 이상 증가한 속주균을 제작하였음.
- 확보된 Bt endo-chitinase 중 우수한 효소활성을 보이는 14개 유전자를 선정하고 이들을 대상으로 DNase I 방법으로 family shuffling을 수행함.
- shuffling된 DNA fragment는 기 개발된 바실러스 발현시스템에 클로닝한 후 RM 시스템이 제거된 *B. subtilis*에 형질전환 한 결과 다양한 효소활성을 보이는 클론을 얻었음.
- plate 상에서 투명환이 상대적으로 큰 콜로니들을 선정하여 4-nitrophenyl N,N'-diacetyl- β -D-chitobioside를 기질로 하여 chitinase 효소 활성을 측정해 본 결과 약 1.5 - 2배 정도 효소활성이 증가된 변이체를 다수 확보하였음.

3. 키틴분해효소 활성 검정

- 키틴분해효소 및 개량효소가 과발현된 바실러스 균은 *Rhizoctonia solani* 및 *Pythium ultimum* 등 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성이 증가하였음을 확인하였음.
- 확보된 키틴분해효소의 효소살균제 개발 가능성을 타진하기 위하여 시판중인 glucanase와 혼합한 후 항진균활성을 측정하였음. 그 결과 glucanase와 키틴분해효소를 독립적으로 처리한 것 보다 두 가지를 혼합하면 항진균활성이 증가하는 것으로 보아 키틴분해효소는 glucanase와 synergistic antifungal activity가 있음을 확인하였음.

4. 신규 생물농약 개발

가. pathogenesis-related protein

- 식물은 병원균이나 곤충의 공격을 받으면 방어작용의 일환으로 PR protein을 만드는데 이

들은 주로 glucanase, chitinase, proteinase, proteinase inhibitor 등으로 현재까지 17 family 가 알려져 있음.

- PR protein을 이용한 생물농약 개발 가능성을 타진하기 위하여 *Bacillus*를 숙주균으로 PR protein의 과발현을 시도하였음.
- 여러 PR protein 중 담배에서 합성되는 PR3, PR4 및 PR8 chitinase 유전자를 바실러스 숙주균에 맞추어 코오돈을 최적화하여 합성하였음. 합성된 유전자는 기 개발된 바실러스 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 *B. subtilis*에서 과발현에 성공하였음.
- 과발현된 PR3 단백질은 온실가루이 (whitefly)를 대상으로 살충성 검정을 수행하였음. 대조구 (triton X-100 또는 PR3 유전자를 가지고 있지 않은 벡터 만을 가진 균주)와 PR3를 과발현한 균주 배양액을 오이의 잎 뒷면에 처리한 후 4일에 걸쳐 잎에 붙어 있는 온실가루이의 개수를 측정하였음. 그 결과 PR3를 처리한 잎에서 온실가루이의 개수가 triton X-100 만을 처리한 잎에 비해서는 약 5배 정도, 벡터만 가진 균주를 처리한 잎에 비해 약 3배 정도 줄어들어 있는 것으로 보아 PR3 단백질이 온실가루이에 대해 기피효과가 있는 것으로 사료됨.

나. Galectin-1

- Gall은 carbohydrate 특히 β -galactosides에 특이적으로 결합하는 mammalian sugar-binding protein으로 키틴에도 잘 결합하는데 특히 곤충 중장의 peritrophic membrane (PM)에 결합하여 정상적인 PM 형성을 방해함.
- Gall을 처리한 곤충에서는 PM 층이 발견되지 않고 대신 다양한 미생물이 장에서 발견되는데 PM의 보호막이 없어짐으로 인해 곤충의 장은 다양한 미생물이 내는 물질에 의해 쉽게 공격을 받아 결국 곤충이 죽게 됨. 즉 Gall은 우수한 살충능력을 가지고 있음.
- 따라서 동물성 Gall은 (1) 고등동물에 대한 독성이 없고 (2) 단백질이므로 환경에서 일정 시간 경과 후 분해가 일어나므로 잔류하지 않고 (3) 타겟인 키틴은 대부분의 곤충이 가지고 있으므로 살충 스펙트럼이 넓어 차세대 생물농약으로 유용하게 사용될 수 있으며 단독 또는 Bt제와 섞어서 사용할 수 있을 것임.
- 이와 같이 동물성 Gall은 차세대 생물농약으로서 여러 가지 장점에도 불구하고 대량생산이 어려우므로 상업화에 어려움이 있었음.
- 이러한 문제점을 극복하기 위하여 대량생산이 쉬운 *Bacillus* 숙주균을 이용하여 Gall을 대량생산하고자 하였음. 이를 위해 gall 유전자를 *Bacillus* 숙주균에 맞추어 코오돈을 최적화하여 합성하였음. 합성된 유전자는 기 개발된 *Bacillus* 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 *B. subtilis*에서 과발현에 성공하였음.
- 과발현된 Gall은 온실가루이 (whitefly)를 대상으로 살충성 검정을 수행하였음. 대조구 (triton X-100 또는 gall 유전자를 가지고 있지 않은 벡터 만을 가진 균주)와 Gall을 과발현한 균주 배양액을 오이의 잎 뒷면에 처리한 후 4일에 걸쳐 잎에 붙어 있는 온실가루이의 개수를 측정하였음. 그 결과 Gall을 처리한 잎에서 온실가루이의 개수가 triton X-100만을 처리한 잎에 비해서는 약 7배 정도, 벡터만 가진 균주를 처리한 잎에 비해 약 4배 정도 줄어들어 있는 것으로 보아 Gall이 온실가루이에 대해 기피효과가 있는 것으로 사료됨.

- Gall이 가장 널리 사용되는 생물농약인 Bt toxin의 활성을 증대시키는지 알아보기 위하여 배추좀나방을 대상으로 살충성검정을 수행하였음.
- 이를 위해 Bt HD1 균주 배양물을 여러 농도별로 희석하고 여기에 Gall을 과발현한 균주 배양액을 혼합하고 다시 최종농도 0.1%의 트라이톤과 혼합한 다음, 직경 4cm 케일 잎에 처리하였음. 이어, 상기 처리된 케일 잎에 3령기의 배추좀나방 유충 10마리를 접종하고, 72 시간이 경과한 후, 죽은 유충을 계수하였음. 그 결과 Gall은 Bt의 살충활성을 약 4.6배 증가시켰음을 확인하였음.

다. Lectin

- Lectin은 carbohydrate에 결합하는 성질을 가진 단백질로써 생명체에 널리 존재하고 있음. 특히 식물에 존재하는 lectin은 곤충, 곰팡이, 새 또는 초식동물 등으로부터 식물을 방어하는 역할을 수행하고 있음. 이러한 방어작용은 lectin이 포식자의 장 특히 PM에 결합하여 활성을 나타내는데 곤충의 경우 살충활성이 있음.
- 이러한 lectin 역시 유망한 차세대 생물농약 후보이지만 저렴한 비용으로 대량생산이 어려우므로 상업화에 어려움이 있었음.
- 이러한 문제점을 극복하기 위하여 대량생산이 쉬운 *Bacillus* 속주균을 이용하여 lectin을 대량생산하고자 하였음. 이를 위해 lectin 유전자를 *Bacillus* 속주균에 맞추어 코오돈을 최적화하여 합성하였음. 합성된 유전자는 기 개발된 *Bacillus* 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 *B. subtilis*에서 과발현이 되지 않았음.
- Gall은 다른 단백질의 폴딩을 도와주는 fusion partner로 사용될 수 있다는 보고가 있기 때문에 Lectin의 과발현을 돕기 위해 Gall과 lectin을 fusion 시켜 gal-lec 융합유전자를 제작하였고 이를 *Bacillus* 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 과발현에 성공하였음.

5. 실용화 연구

- 곤충 중장의 PM을 타겟으로 하는 효소 및 단백질의 경우 곤충이 섭식하여 PM에 잘 도달하기 위해서는 free한 단백질의 형태보다는 Bt 독소 크리스탈처럼 크리스탈 형태가 유리함.
- 일반적으로 대장균에서 단백질을 과발현하면 inclusion body (IB)를 형성하는데 이 IB는 misfolding 단백질의 결합체로써 활성이 없는 것이 일반적인 견해임.
- 그러나 최근 몇몇 보고에서 IB가 활성을 가진다는 사실이 밝혀졌음.
- 많은 세포에서 포도당이 과량으로 존재하면 central metabolic pathway를 통해 acetate를 분비함. acetate는 acetyl-CoA로부터 AckA 및 Pta 효소에 의해 생성되거나 pyruvate로부터 PoxB 효소에 의해 바로 생성되는 기작이 있음.
- *P. polymyxa* PoxB를 대장균에서 과발현하면 IB를 형성함. 이 IB를 분리하여 PoxB 효소활성을 측정된 결과 IB에 PoxB 활성이 있었음. 이는 PoxB IB가 active IB임을 의미함.
- PoxB를 이용하여 다른 단백질의 active IB 형성이 가능한 지 알아보기 위하여 PoxB의 C 말단에 Gfp 또는 *B. subtilis* AmyE를 fusion 하였음. 이 fusion construct를 대장균에서 과발현시키면 IB가 형성됨을 확인하였음.
- PoxB-Gfp IB를 형광현미경으로 관찰한 결과 형광을 나타내었음. 이는 이 Gfp가 IB 안에

서 제대로 folding이 된 active IB임을 의미함.

- PoxB-AmyE IB를 순수분리한 후 amylase 효소활성을 측정한 결과 효소활성이 관찰되었음. 따라서 PoxB-AmyE IB 역시 active IB임을 알 수 있음.
- 이 PoxB에 GalI 또는 Bt chitinase를 fusion시켰음. 이 fusion construct를 대장균에서 과발현시키면 IB를 형성함. 이중 PoxB-chitinase IB를 순수분리한 후 효소활성을 측정한 결과 chitinase 활성을 측정되었음. 따라서 active IB임을 확인하였음.
- *Bacillus* 포자는 열, 온도 건조 유기용매 등 외부 스트레스에 잘 견디는 매우 안정한 물질이므로 보관과 운반에 매우 유리함. 이러한 성질은 *Bacillus* 포자를 기반으로 한 제품의 상업화를 용이하게 함.
- *Bacillus* 포자를 PM 타겟 단백질의 운반수단으로 이용하기 위해서는 PM 타겟 단백질을 포자표면에 display하는 것이 유리함.
- GalI을 포자표면에 display한 후 display 여부를 쉽게 검정하기 위하여 Gfp를 fusion 시켰음.
- Fusion construct를 *Bacillus*에서 과발현 시킨 후 포자를 분리하여 Flow cytometer로 분석한 결과 Gal-Gfp가 성공적으로 포자표면에 display 되었음을 확인하였음.
- PM 타겟 단백질을 식물생장 효과가 있는 미생물에서 과발현을 시도하였음.
- 이를 위해 보유 중인 서로 다른 85종의 *Bacillus* 균의 휘발성 물질이 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 생장에 미치는 영향을 조사하였음.
- 그 결과 24 종의 미생물이 식물생장 효과가 있음을 확인하였음.
- 상기 85종 미생물 휘발성 물질의 ISR 효과 검정을 위해 식물병원균 *Erwinia cartovora*에 대한 병저항성을 측정하였음.
- 그 결과 50 종의 균주가 ISR 효과를 보임을 확인하였음.
- 식물생장 및 ISR 효과가 우수한 *Bacillus* 균주 중 *Bacillus* strain #11 균주에 Bt chitinase 유전자를 도입한 후 과발현을 시도하였는데 SDS-PAGE 상에서 확인해 본 결과 과발현되었음을 알 수 있었고 항진균활성을 증가시켰음을 확인하였음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 2011년 Chitizyme이라는 상품명으로 항균/항충효과가 입증된 키틴분해효소를 제품화하였음.
- 생물농약 제조업체에 효소 원제를 공급하여 살균/살충, 항균/항충 효과 생물농약 제조에 이용하도록 함.
- 2012년 1월 31일 참여기업 연구원을 대상으로 단백질 발현 기본 원리 및 대량발현 방법 교육하였고 이는 효율적인 단백질 생산에 활용될 수 있을 것임.
- 다음과 같은 4편의 특허를 국내에 출원하였음.
 - 제목: 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질 생산방법, 출원번호: 10-2010-0010044, 출

- 원국: 대한민국, 출원일: 2010-02-03.
- 제목: 단백질 발현 미세 조절방법, 출원번호: 10-2011-0121250, 출원국: 대한민국, 출원일: 2011-11-18.
 - 제목: 갈락틴을 포함하는 생물농약 조성물, 출원번호: 10-2011-0121248, 출원국: 대한민국, 출원일: 2011-11-18.
 - 제목: PoxB 유전자를 이용한 활성 인클루전 바디 생산방법, 출원번호: 10-2011-0121249, 출원국: 대한민국, 출원일: 2011-11-18.
- 다음과 같은 2편의 논문을 발표하였음.
- Park SY, Park SH, Choi SK. 2012. Characterization of sporulation histidine kinases of *Paenibacillus polymyxa*. *Res. Microbiol.* In press.
 - Park SY, Park SH, Choi SK. 2012. Active inclusion body formation using *Paenibacillus polymyxa* PoxB as a fusion partner in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* In press.
- 국내 및 국제 학술대회 성과는 다음과 같음.
- 학술대회 명칭: 2010 한국미생물생명공학회 정기학술대회 및 국제심포지움, 장소: 서울교육문화회관, 일시: 2010-06-24, 발표논문 제목: High-level expression of alkaline serine proteases in *Bacillus subtilis*, 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, and Soo-Keun Choi.
 - 학술대회 명칭: 2010 한국미생물생명공학회 정기학술대회 및 국제심포지움, 장소: 서울교육문화회관, 일시: 2010-06-25, 발표논문 제목: Cloning and nucleotide sequence analysis of *Bacillus thuringiensis* chitinases, 발표자: Soo-Keun Choi, Su-Jin Lee and Seung-Hwan Park
 - 학술대회 명칭: :Society for Industrial Microbiology 60th Annual Meeting, 장소: Hyatt Regency Embarcadero Hotel, San Francisco, CA, USA, 일시: 2010-08-02, 발표논문 제목: A Cry3 expression system for the high-level protein expression in *Bacillus subtilis*, 발표자: Soo-Keun Choi, Su-Jin Lee, Jae-Gu Pan, Seung-Hwan Park and Eui-Joong Kim.
 - 학술대회 명칭: 한국미생물생명공학회 2011 국제학술대회 및 정기학술대회, 장소: 서울교육문화회관, 일시: 2011-06-22, 발표논문 제목: Characterization of Sporulation Histidine Kinases of *Paenibacillus polymyxa*, 발표자: Soo-Young Park, Seung-Hwan Park, Soo-Keun Choi.
 - 학술대회 명칭: 한국미생물생명공학회 2011 국제학술대회 및 정기학술대회, 장소: 서울교육문화회관, 일시: 2011-06-22, 발표논문 제목: Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in *Bacillus subtilis*, 발표자: 정다운, 박승환, 김의중, 최수근.
 - 학술대회 명칭: 112th ASM general meeting, 장소: Moscone North and South (Convention Center), San Francisco, CA, USA, 일시: 2012-06-15 ~ 2012-06-19, 발표논문 제목: Characterization of Sporulation Histidine Kinases of *Paenibacillus*

polymyxa, 발표자: Soo-Young Park, Seung-Hwan Park, Soo-Keun Choi.

- 전시회 참여 실적은 다음과 같음
 - 행사명칭: BIOKOREA 2011, 장소: COEX 3층 Hall C, 일자: 2011-09-28 ~ 2011-09-30, 참가자: 김의중 외 제노포커스, 참여품목: chitinase 외 효소.
 - 행사명칭: 2012 범부처 녹색기술 포럼, 장소: 서울교육문화회관, 일자: 2012-04-03 ~ 2012-04-05, 참석형태: 구두발표, 발표제목: 맞춤형 효소를 이용한 생물농약 성능 향상 기술 개발.
- 연구인력양성성과: 참여연구원 박사학위과정 지원 (2인 수료)
- 본 연구의 효소 및 단백질은 추후 필드테스트 및 발효 스케일업 등의 후속연구를 수행한 후 참여기업을 통해 사업화할 예정이다.

SUMMARY

Control of insect pests in agriculture is mainly achieved using chemical insecticides. However, the use of these chemical pesticides has led to several problems, including environmental pollution and increase in human health effects, such as cancer and several immune system disorders. The selection of insect resistant populations has also caused significant and major outbreaks of secondary pests. Although microbial insecticide have been proposed as substitutes for chemicals their use is limited since most microbes show a narrow spectrum of activity that enables them to kill only certain insect species. Moreover, they have low environmental persistence and they require precise application practices. The most successful insect pathogen used for insect control is the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Bt is the most widely used environmentally compatible biopesticide and produces insecticidal Cry and Cyt proteins active against different insect pests. The mode of action of the insecticidal proteins includes ingestion of the protoxin, activation by midgut proteases to produce the toxin fragment, and an interaction with receptors displayed on midgut epithelial cells, followed by forming pores that cause osmotic shock, burst of midgut cells, and insect death. The insect midgut epithelium is protected from abrasive food particles, digestive enzymes, and pathogen infection by multiple layers of peritrophic membrane (PM) consisting of high chitin and chitin-binding protein content. Solubilized Bt toxins traverse the PM and reach the midgut epithelium in several lepidopteran species. Another report demonstrated that Bt toxins can bind the PM. These studies suggest that many Bt toxins can be trapped by the PM before it reaches the epithelium. Thus, removing the PM may increase insecticidal activity of the Bt toxins, indicating that disrupting formation of the PM is a potential strategy for insect control.

The known agents with PM disruption activity are chitinases, mammalian galectin-1 and plant lectin. The agents are candidates for eco-friendly biopesticides, but their agricultural application is limited by difficulty of mass production. In this study, We have overexpressed the forementioned agents in *Bacillus subtilis*, and confirmed their activities. Also we conducted active inclusion body formation and spore display of the agents, and expression the agent in a plant growth-promoting *Bacillus* strain.

To obtain Bt chitinase genes, we collected the gene sequences from CAZy and NCBI databases and conducted multiple alignment of the sequences. From the result of the sequences alignment, we designed and synthesized degenerated primers. Bt chitinases genes were obtained by polymerase chain reaction with the primers from 62 Bt strains. To overexpress the Bt chitinases genes in *Bacillus subtilis*, we have developed *Bacillus* expression system using a promoter of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene (cry). The cry promoter was improved through three steps, consequently that the promoter strength was increased 40 times. By using the improved promoter, Bt chitinase genes

were successfully overexpressed in *B. subtilis*. Bt chitinases were improved by DNase I-based directed evolution technology, and several Bt chitinase genes were constructed with improved activities. *B. subtilis* strain containing the Bt chitinase or an improved one showed enhanced antifungal activities.

Pathogenesis-related (PR) proteins are produced from plants as the defense strategy against stresses including attacks by microorganism, fungi and insects. Current PR proteins are classified into 17 families. Among them, tobacco PR3 chitinase, PR4 chitinase and PR8 chitinase were selected for the overexpression in *B. subtilis*. The genes were chemically synthesized with the optimization to the *Bacillus* codon, cloned under the control of the *cry* promoter, and introduced into *B. subtilis*. The genes were successfully overexpressed in *B. subtilis*. The expressed PR3 was conducted bioassay against whitefly. The result showed that number of insect on the leaf treated PR3 was significantly reduced, indicating that the PR3 functioned as a repellent against whitefly.

galectin-1 (Gal) is a mammalian sugar-binding protein with an affinity for β -galactosides, and a wide range of biological activities. It is reported that purified Gal from recombinant *Escherichia coli* interacts with the chitinous component of the PM and disrupts the protective function of the PM, and consequently kills the target insect. However *E. coli* is not an eco-friendly host for agricultural application because it contains lipopolysaccharides (LPS), which are endotoxins and pyrogenic in humans and other mammals. In this study, we overexpressed Gal in an environmentally friendly microorganism, *Bacillus subtilis*. The *gal* gene was chemically synthesized, cloned under the control of *cry* promoter, and introduced into *B. subtilis* to overexpress Gal in *B. subtilis*. The genes were successfully overexpressed in *B. subtilis*. The expressed Gal was conducted bioassay against whitefly. The result showed that number of insect on the leaf treated Gal was significantly reduced, indicating that the Gal functioned as a repellent against whitefly. Also, we examined whether Gal can increase Bt toxin activity. The results of bioassay against *Plutella xylostella* revealed that the diluted cell lysate containing Gal increased Bt HD1 toxicity by 4.6-fold. This result indicates that Gal can function as a Bt toxin synergist.

For the agricultural application, crystal form of enzymes has advantages for the stability and uptake by insects. We found that overexpression of *Paenibacillus polymyxa* PoxB in *Escherichia coli* induced the formation of inclusion bodies. An enzyme assay showed that the inclusion bodies exhibited PoxB activity, indicating that they were biologically active. Fusion of GFP and *B. subtilis* AmyE to the C-terminus of the PoxB also induced the formation of biologically active aggregates when they were overexpressed in *E. coli*. Therefore, *P. polymyxa* PoxB can be used as a fusion partner to promote the formation of active inclusion bodies in *E. coli*. Fusion of the Gal and Bt chitinase to the C-terminus of the PoxB also induced the formation of IBs. The purified PoxB-chitinase IBs showed chitinase activity, indicating that the IBs are active IBs.

Bacillus spore is a very stable material, and has great advantages for storage and

delivery. When PM-targeting enzymes are displayed on the Bacillus spore, the enzymes can interact directly to the PM. To monitor the Gal display on the Bacillus spore, Gal was fused to Gfp. When the Gal-Gfp was overproduced in *B. subtilis*, the fusion protein was detected on the spore surface by flow cytometer analysis.

Introduction of chitinase into the plant growth-promoting (PGP) Bacillus may give a synergistic effect on the bacterial function. We investigated PGP activity of our Bacillus strains, and selected one which showed high PGP activity against *Arabidopsis thaliana*. When the Bt chitinase gene was introduced into the PGP Bacillus strain, the antifungal activity of the strain was increased.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of research and development project

Chapter 2. Domestic and international technology developments

Chapter 3. Contents and results of research

Chapter 4. Goal attainment and Contribution of the related fields

Chapter 5. Research performance and application

Chapter 6. Foreign science and technology information

Chapter 7. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 화학농약은 토양 및 수질오염을 유발하고 천적 및 유익 생물에 피해를 입히며 농약사용자의 급성 및 만성 중독을 일으켜 사회적 문제가 되고 있음. 최근 안전한 먹거리에 대한 관심이 증가하고 있으며 화학농약 사용에 대한 규제가 강화되고 있는 등 친환경 농업의 중요성이 강조되고 있어 생물농약의 수요가 증대되리라 예상되고 있음.
- 국내 미생물농약 시장은 2005년도 기준 매출액이 13.6억원으로 전체 농약시장의 0.14% 수준이며 Bt제 시장을 포함하더라도 총 시장규모는 24.7억원으로 전체 농약시장의 0.25% 수준으로 대단히 미약함. 현재 국내외 생물농약 중 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 균주를 이용한 Bt제가 가장 많이 사용되고 있으나 화학농약에 비해 활성이 낮고 포장에서의 재현성이 저조하며 가격이 비싸 시장확대에 어려움이 있음.
- 따라서 시장의 요구조건인 효과가 확실하고 가격이 저렴한 제품을 만들기 위해서는 성능이 획기적으로 향상된 Bt살충제 등 새로운 개념의 생물농약 개발이 요구됨. 이는 생물농약 시장 확대에 기여하게 될 것임.
- Bt는 포자를 형성하는 그람양성세균으로 포자형성기에 거대한 단백질 크리스탈을 만드는데 이 크리스탈이 특정 곤충에 대해 살충효과가 있음. 곤충이 크리스탈을 먹으면 중장(midgut)의 pH에 의해 크리스탈이 단일 폴리펩타이드로 분해되며 다시 중장 내의 단백질 분해효소에 의해 절단되면서 활성화 됨. 활성화된 Bt 독소는 중장 내의 특정 receptor에 결합하여 pore를 형성함으로써 결국 곤충이 죽게됨 (Bravo, 2007).
- 이와 같이 Bt 독소의 살충활성은 곤충의 중장 내에서 일어나는데 곤충의 중장에는 peritrophic membrane (PM)이 존재함 (그림 1).
- PM은 chitin이 다량 함유된 chitin-protein matrix로써 여러 층을 이루어 중장의 표면을 둘러싸고 있음. 이 PM은 음식물 덩어리, 효소, 또는 병원균으로부터 중장을 보호하는 역할을 담당하고 있음. PM이 독소단백질이나 병원균으로부터 중장을 보호하고 있기 때문에 PM 형성을 방해하는 전략은 병원성 곤충의 제어에 좋은 타겟이 될 수 있음. 또한 PM 형성 억제 는 Bt 독소와 같은 생물농약이 중장 표면에 접근하는 것이 용이하여 생물농약의 활성을 증대시킬 것임.
- PM은 키틴이 다량 함유되어 있기 때문에 키틴분해효소가 PM의 형성을 억제하는데 효과가 있을 것이라 생각되는데 실제로 키틴분해효소를 이용하여 Bt 활성을 증가시키는 보고가 다수 있음. 담배잎 (Ding, 2008), *Bt israelensis* (Cai, 2007), *Bacillus licheniformis* (Thamthiankul, 2004), *Bacillus circulans* (Lertcanawanichakul, 2004), *Bt kurstaki* HD-1 (Arora, 2003) 및 Bt 분리균 (Hu, 2009) 등에서 유래한 키틴분해효소가 Bt 제의 살충활성을 증가시킨다는 보고가 있음.
- 또한 고등동물의 galectin-1 (Chen, 2009), 식물성 렉틴 (Ohizumi, 2009) 등 키틴과 결합하는 단백질들도 PM의 키틴과 결합할 수 있고 이 결합은 정상적인 PM 형성을 방해하여 궁극적으로 해당 곤충에 대해 살충활성이 나타난다는 보고가 있음.

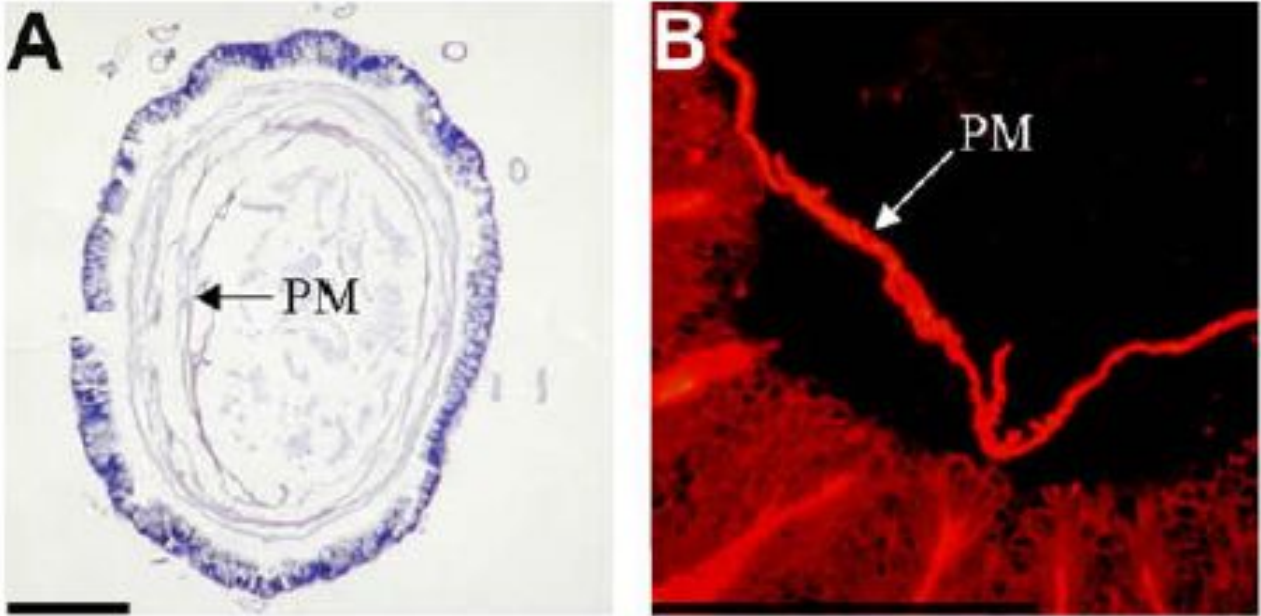


그림 1. 곤충 (*Mamestra brassicae*) 중장의 단면도. PM, peritrophic membrane. (Rees, 2009)

- 이와 같이 키틴분해효소, galectin-1 및 식물성 렉틴 등은 곤충의 PM에 결합하여 정상적인 PM 형성을 방해하기 때문에 기존 생물농약과 같이 사용하면 기존 생물농약의 성능을 향상시킬 수 있을 것으로 기대됨. 이를 위해서는 비용이 적게 들고 안전한 대량생산 방법이 있어야 함.
- 본 과제에서는 기존에 사용되고 있는 생물농약의 성능을 향상시키기 위하여 곤충의 PM을 타겟으로 정하고 PM 형성을 억제하는 기능을 가진 단백질을 선정하여 그 유전자를 확보한 후 이를 안전하면서 적은 비용으로 대량생산이 가능한 숙주미생물에서 대량발현 할 수 있는 방법을 확립하고자 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 국내 미생물농약 제품은 2003년 3월 첫 제품이 등록된 이후 2007년 현재까지 15원제, 24품목 (Bt제 7품목 포함)의 약제가 미생물농약으로 정식 등록되었다. 미생물 살충제는 기존에 화학농약으로 등록되었다가 최근 생물농약으로 등록 변경된 Bt제가 대다수를 차지하고 있다. 이들 Bt제의 경우 기존에는 대부분 원제를 수입하여 판매하고 있었으나, '솔빛채'(Bacillus thuringiensis subsp. aizawai GB413, (주)그린바이오텍) 및 토박이(Bacillus thuringiensis subsp. aizawai YNT423, 동부하이텍(주))의 경우 순수 국내에서 분리한 균주를 이용하여 국내 기술로 제조한 제품으로, 해외 제품과 비등한 효능을 보이고 있다. 현재 Bt제 외에도 (주)KIBC 등에서 세균 원제의 신규한 미생물 살충제를 개발 중이다. 국내 미생물농약 시장은 2005년도 기준 매출액이 13.6억원으로 전체 농약시장의 0.14% 수준으로 대단히 미약하며 Bt제 시장을 포함하더라도 총 시장규모는 24.7억원으로 전체 농약시장의 0.25% 수준이다 (표 1) (자료 출처: 그린바이오텍, 2007. 국내 미생물농약의 개발 동향).
- 2006년 해외 미생물농약 시장의 규모는 약 260백만 달러로 추정되고 있으며 이중 Bt 살충제가 159백만 달러의 규모로 해외 미생물농약 시장의 대부분을 차지하고 있다(그림 2). 해외 미생물농약의 시장 규모는 각국의 화학농약 사용 절감 정책에 의하여 확장되어 2014년에는 약 330-400 백만 달러의 시장규모가 될 것이라 예상되고 있다 (자료 출처: 그린바이오텍, 2007. 국내 미생물농약의 개발 동향).
- 농림수산식품부는 최근 제3차 친환경농업육성 5개년계획'(2011~2015년)을 발표했는데 앞으로 5년간 약 4조5000억원을 투입해 유기농식품산업 시장 규모를 2조원까지 확대하는 등 '친환경농식품 및 연관산업'을 차세대 녹색성장 동력원으로 집중 육성하기로 하였음. 이는 친환경농산물 재배면적 비율을 12%까지 확대하고 화학비료 및 농약 사용량은 15% 감축한다는 계획임. 또 국내외적으로 지속적으로 성장하고 있는 유기농식품산업규모를 4배 이상 늘려 2008년 4천43억원, 2010년 5천505억원, 2015년 2조원으로 늘릴 방침임.
- 한편 지방자치 단체들도 일제히 친환경농업 육성을 위하여 투자를 늘리겠다는 계획을 발표함.
- 전국에서 가장 넓은 친환경 인증면적을 확보한 전라남도는 소비자 신뢰확보를 위해 '시·군 단위 주력 인증기관 지정', '잔류농약 검사', '생산이력등록제', '유기농종합보험', '친환경농산물 명예 감시원제 운영' 등 5대 시책을 2010년부터 추진해옴.
- 전라북도는 2011년 친환경농업 육성을 위해 생산기반 확대, 안전시스템 구축을 통한 소비자 신뢰 제고, 수도권 학교급식 확대 등에 주력하겠다고 밝힘. 오는 2015년까지 친환경인증면적을 경지면적의 10%에 해당하는 2만ha를 목표로 정하고 올해는 1만3000ha달성을 위해 다양한 시책을 추진하기로 함.
- 충청남도는 친환경 농업을 중심 산업으로 육성하는 '친환경농업육성 5개년 실천계획'을 수립함. 도는 2011년을 친환경농업발전 원년으로 정하고, 친환경 농업단지 조성 등 총 19개 사업에 400여억원을 투자하기로 함. 도는 2012년부터 2015년까지 친환경농업 발전의 기반을 다지고, 다양한 정책을 추진해 틈새시장 수준의 친환경 농업을 도내 농업 전반으로 확산 시킨다는 방침임. 또 관련 부서 명칭도 친환경 농산과로 바꾸고 △안정적 생산·공급기반 확충

표 1. 2003-2006년 국내 미생물농약 연별 판매실적 현황 (단위 백만원)

연도	미생물농약 매출	Bt제 매출	계
2003	73	691	764
2004	455	784	1,239
2005	1,368	1,107	2,475
2006	863	354	1,217

출처 : 2006, 2007년 농약연보

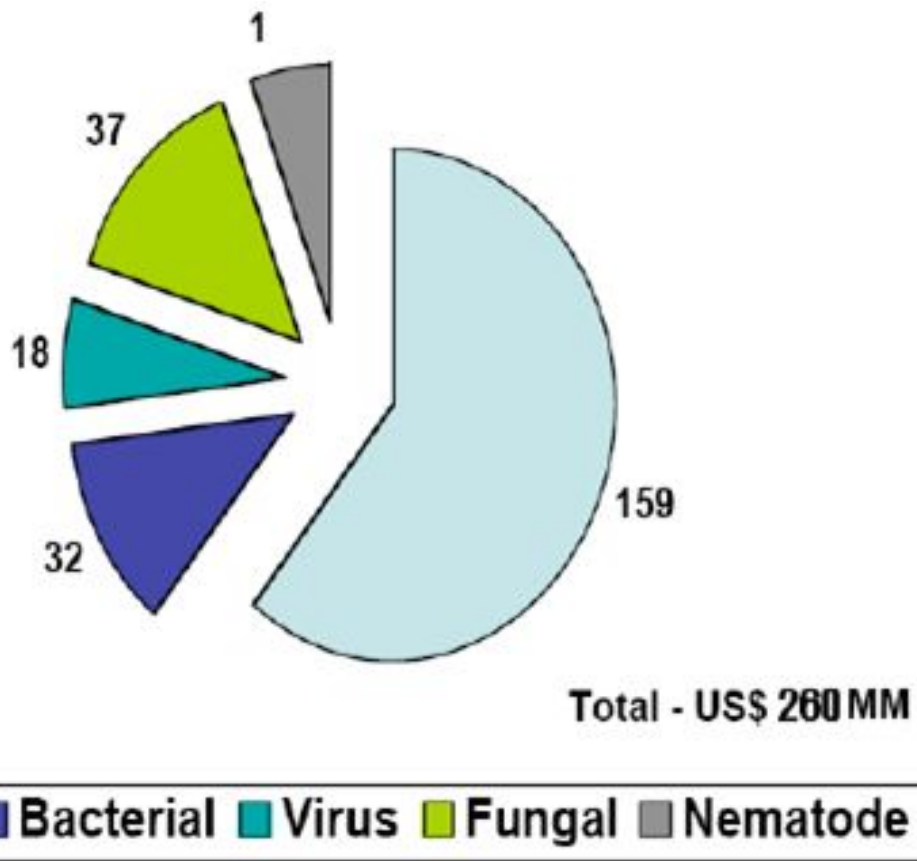


그림 2. 2005년도 전세계 미생물농약시장규모 (그린바이오텍, 2007. 국내미생물농약의 개발 동향).

△ 친환경 농산물 수급 안정화 △친환경 농산물 가공체계 구축 △생산자 단체 조직화 △엄격한 품질 관리 등을 골자로 한 중장기 종합계획을 세울 방침임.

- 경상북도는 우수 친환경농산물 생산으로 지역농업의 지속적인 성장의 기틀을 마련하기 위해 2011년에 총 3477억원을 투자한다고 밝힘. 도는 현재 8.4% 수준인 친환경농산물 재배면적을 내년에는 10% 수준으로 확대하기 위해 친환경 인증면적(무농약 이상)을 올해보다 15% 늘어난 7500ha를 목표로 설정함. 또 지역 맞춤형 친환경농업 생산기반 확대를 위해 광역친환경농업단지(단지규모 600ha 이상) 3개소, 친환경농업 및 녹색성장우수 지구(지구규모 10ha 이상) 9개소 등 규모별 친환경농업기반 조성과 유기농업 실천이 우수하고 파급효과가 클 것으로 판단되는 시범지역 3개 시군을 지정해 인증면적 확대를 위한 시설·장비 기자재를 지원하기로 함.
- 경상남도 역시 소비자 고품질 안전농산물에 대한 수요가 급증할 것에 대비하고 친환경농업 육성시책을 체계적으로 추진하기 위해 친환경농업 육성 5개년 계획(2011~2015년)을 수립, 발표했는데 이번 계획은 5년간 친환경농업기반 구축, 무농약 이상 인증 확대, 학교급식 납품 확대 지원, 친환경농산물 판로 확대 4개 분야 17개 사업에 총 4,777억원을 투입할 계획임.
- 제주시는 2011년 친환경농업 육성에 39억5200만원을 집중 투자한다고 밝힘. 시에 따르면 친환경농업 집중 육성은 FTA 등 시장 개방화에 대응하고, 소비자 중심의 안전 농산물 생산판매를 통한 지역 농업 경쟁력 강화를 위한 취지로, 올해에도 친환경농업 분야에 39억5200만원(보조 27억9500만원, 자부담11억5700만원)을 투자키로 함.
- 이와 같이 친환경 농업에 대한 관심은 어느 때보다 높으며 정부 및 지방자치단체는 친환경 농업을 육성하려는 확고한 의지를 가지고 있음.
- 친환경농업 육성정책이 성공하기 위해서는 농업인들 및 소비자의 인식 변화, 적절한 지원, 유통망 개선 등 여러 가지 요인이 있을 수 있으나 화학농약의 사용을 줄이거나 없애기 위해서는 우수한 친환경 생물농약을 다양하게 확보하는 것이 매우 중요함.
- 현재 생물농약들 중 Bt제가 많이 사용되고 있는데 Bt제는 특정 곤충에 대해 우수한 살충활성을 가지고 있어서 타겟이 아닌 다른 곤충이나 고등생물에는 해가 없으므로 친환경적이지만 화학농약에 비해 활성이 낮고 가격이 비싸기 때문에 사용 확대에는 어려움이 있음. 따라서 Bt제의 활성을 증대시키는 보조제가 개발되면 Bt제의 활용도를 증대시켜 친환경농업확대에 기여하게 될 것임.
- 한편 키틴이 곤충 및 병원성 곰팡이 등의 주요 성분이기 때문에 키틴을 타겟으로 하는 새로운 생물농약은 활성 스펙트럼이 매우 넓어서 다양한 농업분야에 광범위하게 사용될 가능성이 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 키틴 분해효소 확보 및 대량발현

가. Bt 키틴 분해효소 개발

- Bt 균에서 유래한 chitinase가 Bt제의 살충활성을 증진시킨다는 보고가 있으므로 살충활성 증진에 가장 적합한 효소를 찾기 위해 본 연구팀에서 확보하고 있는 Bt 균주 중 서로 다른 62종의 Bt 균주로부터 chitinase 유전자를 확보하기로 함. 이를 위해 CAZy와 NCBI의 database를 통해 현재까지 NCBI에 등록된 58개의 Bt 유래의 키틴 분해 효소 유전자의 nucleotide 및 amino acid 서열 데이터를 확보하였음. 확보한 데이터 중 부분 sequencing 되었거나 잘못된 자료들을 제외하여 46개의 데이터를 얻을 수 있었는데 36개의 endo-type과 10개의 exo-type으로 나눌 수 있음.
- Chitinase의 nucleotide 서열 비교를 통해 상동성이 높은 5'말단과 3'말단 부분을 바탕으로 endo-type 키틴 분해 효소와 exo-type 키틴 분해 효소 유전자의 degenerate primer를 제작하였음.
- 제작된 primer를 이용하여 본 연구팀에서 확보하고 있는 Bt 균주 중 서로 다른 62종의 Bt 균주 (표 2) chromosome을 대상으로 PCR을 수행하여 각각 endo-/exo-type 키틴 분해 효소로 추정되는 약 2 kb와 약 1.2 kb의 PCR 산물을 얻었음. Endo-type 키틴 분해 효소의 경우 57개, exo-type 키틴 분해 효소의 경우 62개의 PCR 산물을 확보하였음 (그림 3).
- endo-type chitinase PCR 산물의 염기서열을 결정하였음 (그림 4).
- 그 결과 active site는 잘 보존이 되어 있었으며 N-terminal catalytic domain은 상동성이 높은 반면 C-terminal chitin binding domain은 상대적으로 상동성이 낮았음. 이는 substrate specificity가 서로 다를 가능성이 있음.
- endo-type chitinase의 대량발현을 위해 바실러스 발현시스템을 개발하였음.
- *B. subtilis*는 GRAS 미생물이며 인체에 안전하고, 단백질 분비시스템이 잘 발달되어 있으며 계놈정보가 알려져 있고, 유전자 조작이 쉽고 발효경험이 풍부하다는 점 등 발현숙주로서 많은 장점을 가지고 있음.
- 현재 전 세계에서 생산되고 있는 산업용 효소의 60%가 바실러스에서 생산되고 있을 정도로 산업적으로 중요한 균주임.
- 바실러스를 이용한 단백질 생산에 많은 연구가 진행되고 있으나 현재까지 알려진 바실러스 발현시스템의 문제점은 대장균과 비교하여 여전히 강력하고 조절 가능한 프로모터가 없고, 많은 단백질 분해효소의 존재로 인해 발현된 단백질의 분해가 일어남 (Schumann, 2007).
- 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 강력한 프로모터를 확보하고 균주개량을 통하여 바실러스 발현시스템을 개발하였음.

표 2. 본 연구에 사용된 Bt 균주들

subsp.	strain	subsp.	strain	subsp.	strain
1	<i>kurstaki</i> HD 1	22	<i>entomocidus</i> NRRL 4047	43	<i>israelensis</i> HD 567
2	<i>kurstaki</i> Dipel	23	<i>entomocidus</i> HD 9	44	<i>israelensis</i> 922906
3	<i>kurstaki</i> HD263	24	<i>subtoxicus</i> HD 109	45	<i>indiana</i> HD 521 (W)
4	<i>kurstaki</i> Thuricide	25	<i>aizawai</i>	46	<i>indiana</i> HD 521 (B)
5	<i>kurstaki</i> Biobit	26	<i>aizawai/pacificus</i> HD 11	47	<i>dakota</i> HD 511
6	<i>kurstaki</i> HD 648	27	<i>aizawai</i> HD 137	48	<i>tohokyensis</i> 4V1
7	<i>kurstaki</i> HD 73	28	<i>morrisoni</i> HD 12	49	<i>kumamotoensis</i> HD 867
8	<i>thuringiensis</i> HD 2	29	<i>morrisoni</i> HD 116	50	<i>tochigiensis</i> HD 868
9	<i>thuringiensis</i> HD 2	30	<i>morrisoni</i> NRRL 4049	51	<i>colmeri</i> IS 720
10	<i>finitimus</i> HD 3	31	<i>sandiego</i>	52	<i>colmeri</i> HD 847
11	<i>alesti</i> HD 4	32	<i>ostrinae</i> HD 501	53	<i>berliner</i>
12	<i>alesti</i> NRRL4041	33	<i>tolworthi</i> HD 537	54	<i>kurstaki</i> HD 203
13	<i>sotto</i>	34	<i>tolworthi</i> NRRL 4050	55	<i>thuringiensis</i> Bt 996
14	<i>dendrolimus</i> HD 7	35	<i>darmastadiensis</i> OHBA	56	<i>moritai</i>
15	<i>kenya</i> HDB 23	36	<i>darmastadiensis</i> IPL	57	<i>kurstaki</i> 4D11
16	<i>galleriae</i> HD 29(R)	37	<i>darmastadiensis</i> HD 146	58	<i>thompsoni</i> HD 542
17	<i>galleriae</i> HD 29(S)	38	<i>toumanoffi</i> HD 201	59	<i>morrisoni</i> HD 518
18	<i>galleriae</i> NRRL 4045	39	<i>kyushuensis</i> HD 541	60	<i>aizawai</i> HD 133
19	<i>canadensis</i> HD224	40	<i>thompsoni</i> HD 542-1	61	<i>entomocidus</i> HD 198
20	<i>canadensis</i> NRRL 4056	41	<i>pakistani</i> HD 395	62	<i>canadensis</i> HD 30
21	<i>entomocidus</i> HD 635	42	<i>israelensis</i> IPS 82		

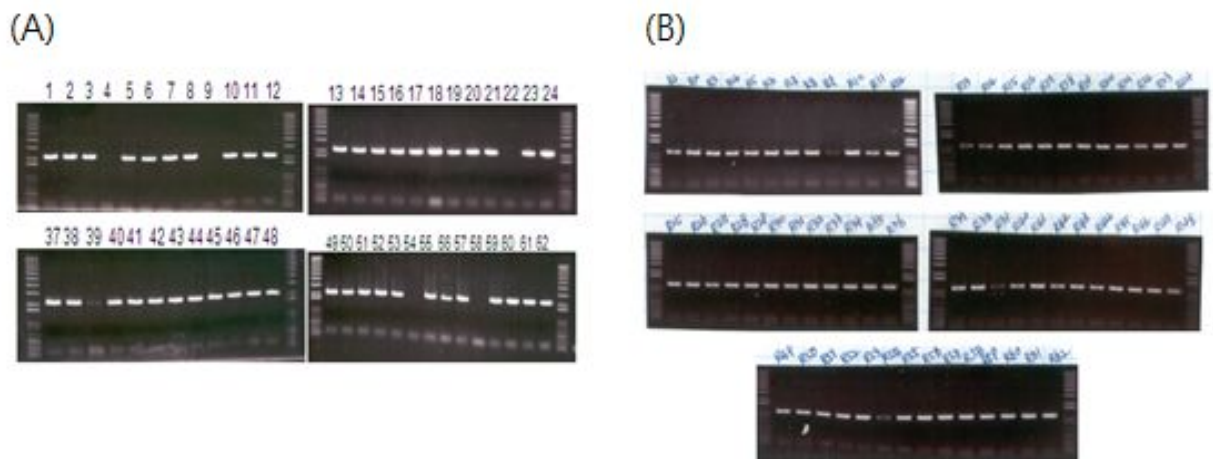


그림 3. Bt endo- (A), exo-type (B) chitinase의 PCR 산물.

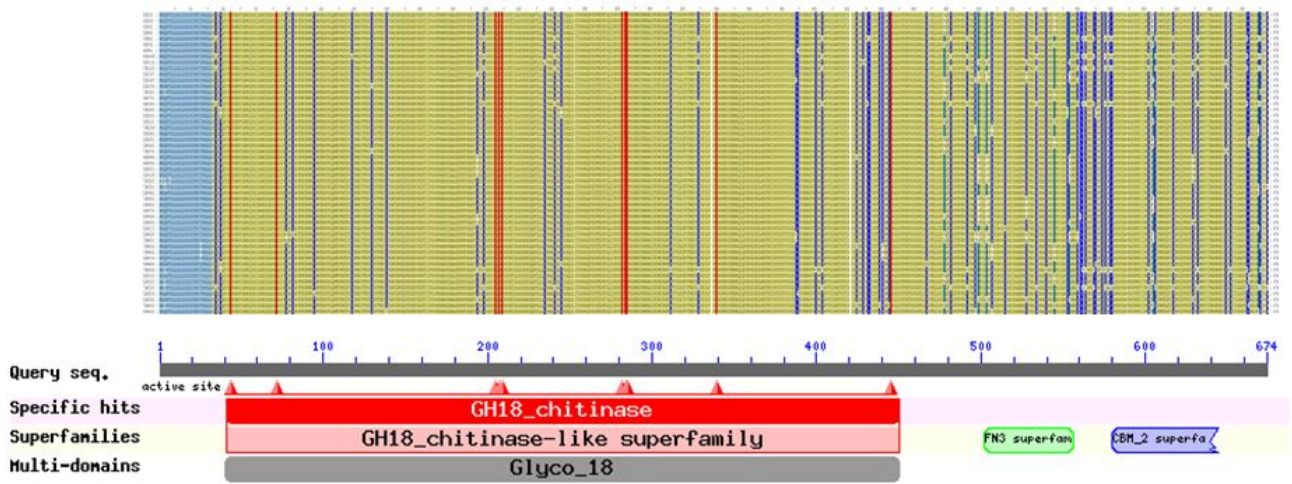


그림 4. Bt endo-chitinase 유전자 염기서열의 multiple align.

- *Bacillus thuringiensis* (Bt)의 독소단백질 유전자 (*cry*)는 세포건체 중량의 25 내지 30% 정도의 발현양을 보이며 세포성장 정지기에서 특이적으로 발현되므로 autoinducible system에 적합함 (Agaisse, 1995).
- 3차에 걸쳐 개량된 *cry* 프로모터의 Gfp 발현양을 비교한 결과 초기 wild-type 프로모터에 비해 약 40 배의 발현양 증가를 보임 (그림 5).
- 상기 개발된 바실러스 발현시스템을 이용하여 Bt chitinase들의 과발현을 유도하였음. SDS-PAGE를 통하여 발현양을 조사한 결과 Bt chitinase가 과발현되었음을 확인하였음 (그림 6).

나. 곰팡이 유래 키틴 분해효소 개발

- 우수한 항진균 활성을 가진 *Trichoderma harzianum* chitinase (표 3)를 생산하기 위해서 *Aspergillus*에서 재조합 발현 연구를 수행하였음.
- *Aspergillus* 균은 인체에 안전한 GRAS 균이며 homologous protein의 경우 수십 g/L, heterologous protein의 경우 수 g/L 정도의 높은 단백질 발현율을 나타내고 yeast 또는 *E. coli* 대비 25 ~ 30% 수준의 저렴한 생산공정 비용으로 인해 Novozyme, DSM 등 주요 효소 기업들도 단백질 생산에 많이 이용하고 있음.

(1) *T. harzianum* chitinase 발현확인

- *T. harzianum* KCCM1763, KCCM11279, KCTC 6043을 분양 받은 후 플라스크에서 배양한 결과 Chitinase 발현량은 KCTC 6043 균주에서 현저히 높게 발현됨을 확인함 (그림 7, 표 4).

(2) *T. harzianum* 유래의 키틴 분해효소 유전자의 nucleotide 및 아미노산 서열 비교 분석

- *T. harzianum* KCCM 11763, KCCM 11279, KCCM 6043으로부터 각각 RNA를 준비하여 *nag1*, *ech42* 및 *chit36P* 3종의 chitinase 유전자를 대상으로 PCR한 결과 KCCM 6043균주에서 PCR product를 확인할 수 있었음.
- *T. harzianum* TM 유래 Chit36P AAK 54377 단백질 서열에 상응하는 프라이머를 제작하여 RNA로부터 1.04 kb PCR product를 확보하였음. 염기서열 분석 후 아미노산 서열을 분석한 결과 DNA 염기서열에서는 12개의 염기가 다름을 확인하였으나, 단백질 서열에서는 AAK 54377과 100% 동일함을 확인함. AAK 54377 단백질은 *Botrytis cinerea* 포자의 발아를 억제하고, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* 성장을 저해하는 작용이 있음.
- *T. harzianum* ATCC 74058 유래 Ech42 AAA18167 단백질 서열에 상응하는 프라이머를 제작하여 RNA로부터 1.27kb PCR product를 확보하였음. 염기서열 분석 후 아미노산 서열을 분석한 결과 AAK18167과 100% 동일한 유전자임을 확인함.
- *T. harzianum* P1 유래 Nag1 AAB50829 단백질 서열에 상응하는 프라이머를 제작하여 RNA로부터 1.74kb PCR product를 확보하였음. 염기서열 분석 후 아미노산 서열을 분석한 결과 AAB50829와 5개 아미노산 서열이 다름을 확인함. *T. atroviride* ATCC 74016 유래 AAT4222와는 100% 동일하였음.

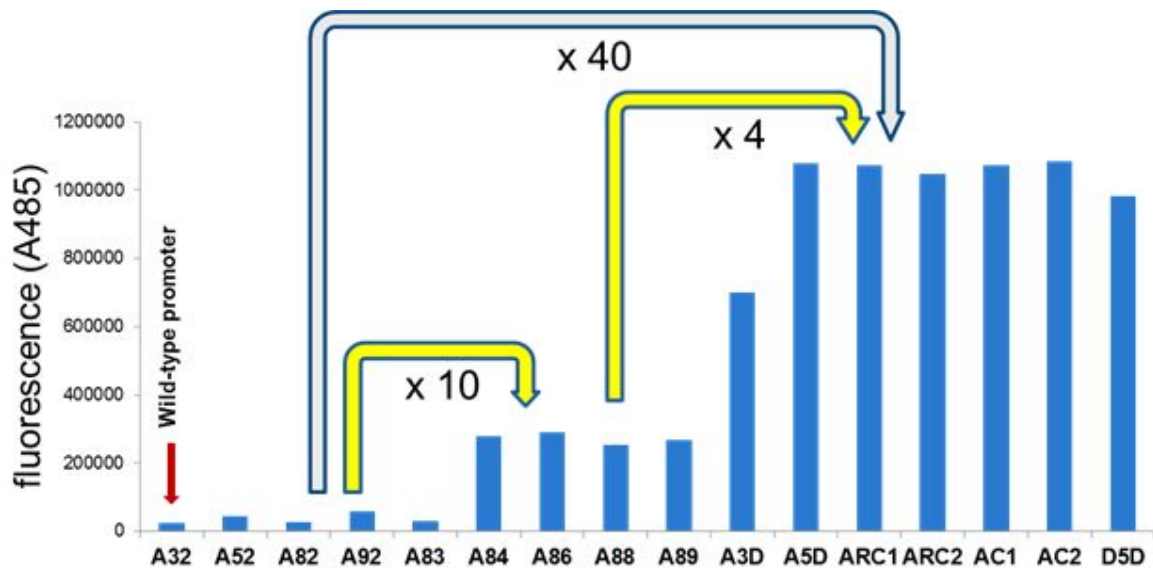


그림 5. Gfp를 이용한 cry 프로모터의 발현양 비교.

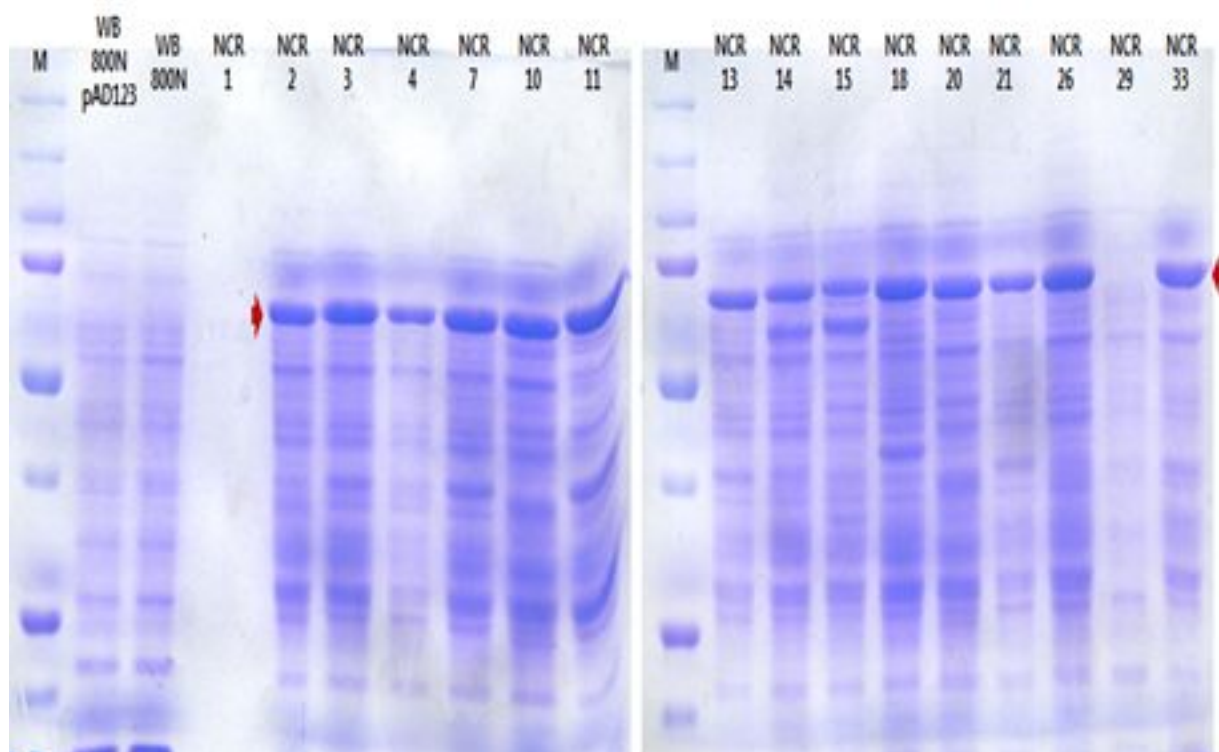


그림 6. SDS-PAGE로 Bt chitinase 발현 조사.

표 3. *Trichoderma harzianum* 유래 chitinase

	Endo-type	Endo(exo)-type	Endo-type
Locus number	AAA18167	AAK 54377	AAB 50829
Gene Name	<i>ech42</i>	<i>chit33,36(P),37</i>	<i>nag1</i>
Domain	GH18_Chitinase	GH18_Chitinase	GH20_HexA
Protein Size	42.6	33.1, 36.2, 36.8	62.8
최적 pH	4-6	4-6	4-6
최적 Temp.	40-45	-	-
Inhibitor	Cu,Mn,Fe,K,Co,Na, Zn, EDTA, Urea DMSO,	-	Ag,Hg
Activators	Mg ²⁺ +Ca ²⁺	-	-

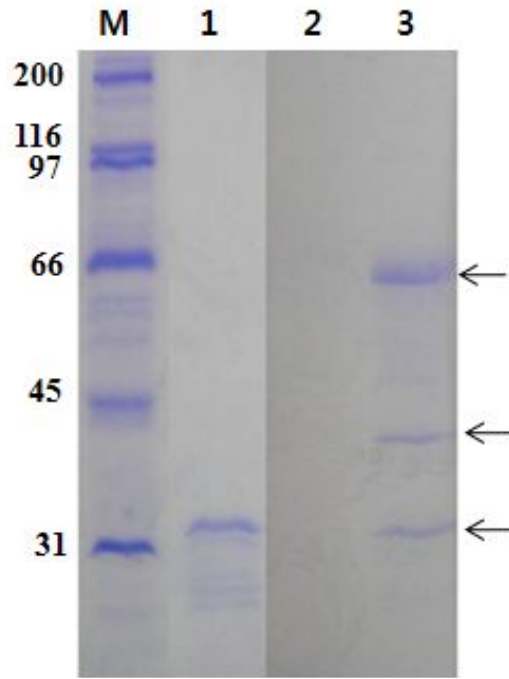


그림 7. *T. harzianum* 균주의 플라스크 배양액을 SDS-PAGE로 분석한 그림. M, marker; 1, KCCM 11763; 2, KCCM 11279; 3, KCCM 6043. 화살표, 위부터 Nag1, Chit36, Chit33.

표 4. 플라스크에서 4일 배양한 *T. harzianum* 배양 상등액의 Chitinase 활성 확인

균 주 명	U/ml	mg/ml
KCCM 11763	1.2	0.12
KCCM 11279	-	0.02
KCTC 6043	10.6	0.33

(3) Chitinase Integration vector

- 재조합 단백질 발현을 위한 promoter로 *A. niger* GF101에서 분리한 *glaA* 개량 promoter와 terminator로는 *A. nidulans* A4 균주로부터 확보한 *pdca* 유전자를 이용하였음. 외래 단백질 발현시스템으로 signal peptide 및 propeptide는 발현하고자 하는 유전자에 따라 크게 달라진다는 보고가 있으므로 *A. niger* 유래 *glaA* signal peptide와 propeptide를 이용하여 발현할 수 있는 pASP31 vector와 native signal peptide를 이용하여 발현할 수 있는 pASP33 vector를 구축하였음 (그림 8). Chitinase 유전자들은 PCR을 통하여 최종 확보한 절편을 pASP31, 33 vector에 *StuI/NotI* 으로 cloning하였음 (그림 9).

(4) Chit36P 발현

- pASP31-Chit36P vector 와 pASP33-Chit36P vector를 *A. niger* ACK447균주에 형질전환하여 hygromycin 100 ug/ml에서 저항성을 보이는 형질전환체를 다수 확보하였음. 배지에 4MU-NAG을 overlay한 후 생기는 환의 크기를 비교하여, 고발현이 예상되는 형질전환체를 각각 확보함. 확보한 형질전환체로부터 각각 gDNA를 추출하여 PCR 한 결과 target gene이 모두 integration 되었음을 확인함.
- 플라스크 배양 결과 *glaA* signal peptide 이용시에는 발현률이 현저히 낮았으며, native signal peptide 발현 시 발현률이 높음을 확인함. 이 중 33Chit36P 2, 3번 형질전환체의 플라스크 배양 결과 효소 활성은 6.5 U/ml로 확인되었음. SDS-PAGE 결과 36kD 효소가 glycosylation으로 인해 45kD이 됨을 확인함 (그림 10). pASP31-Chit36P vector 형질전환체 100개를 더 확보하여 4MU-Nag overlay를 통해 과발현 균주 16개를 선별하였음 (그림 11). 선별된 16개 균주를 플라스크 배양한 결과, 33Chit36P-12 균주의 chitinase 활성은 10.55 U/ml로 확인되었음(그림 12, 13). 최적화된 배지 조건으로 발효조에서 배양한 결과, 35 U/ml의 높은 활성을 보였음(그림 14).

(5) Ech42 발현

- pASP31-Ech42 vector 와 pASP33-Ech42 vector (그림 15)를 *A. niger* 균주에 형질전환하여 hygromycin 100 ug/ml에서 저항성을 보이는 형질전환체를 각각 10개씩 확보하였음. 2% chitin이 포함된 배지에서 분해능을 비교한 결과, *glaA* signal peptide 이용 시에는 발현률이 현저히 낮았으며, native signal peptide 이용 시 발현됨을 확인함 (그림 16). 투명환이 큰 7개의 균주를 플라스크 배양한 결과 33Ech9 균주 평균 발현량이 250 U/ml로 확인함 (그림 17). pASP33-Ech42 vector의 형질전환체 70여개를 더 분석한 결과 33Ech46, 59번 균주가 플라스크 배양에서 500 U/ml 발현됨을 확인함 (그림 18).
- Ech42 활성에 영향을 주는 Inhibitor로 Cu, Mn, Fe, K, Co, Na, Zn, EDTA, Urea, DMSO 등이 알려져 있으며, Activator로는 Mg²⁺, Ca²⁺ 등이 알려져 있음. 배지조성에 따라 발현되는 단백질의 양은 동일하나, 활성에서는 GM 배지에서 6배 높음 (그림19). Ech42는 최적 배지 조성에서 최대 1,100 U/ml 생산 가능함을 확인함 (그림 20).

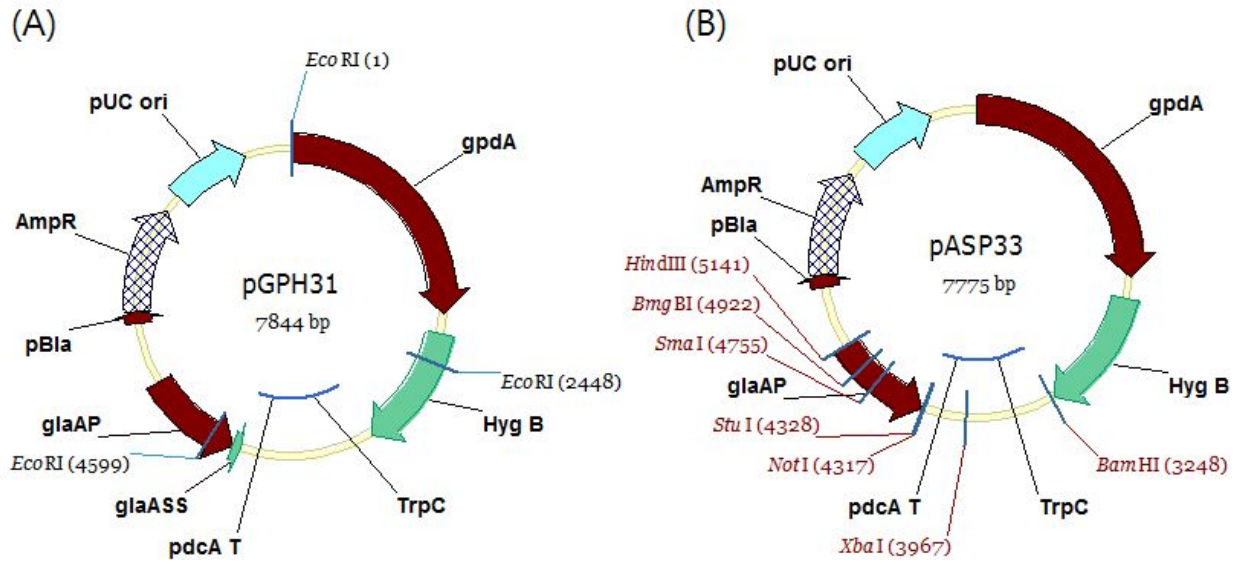


그림 8. *A. niger*에서 chitinase를 발현하기 위한 vector 제조. A, *glaA* signal peptide; B, native signal peptide.

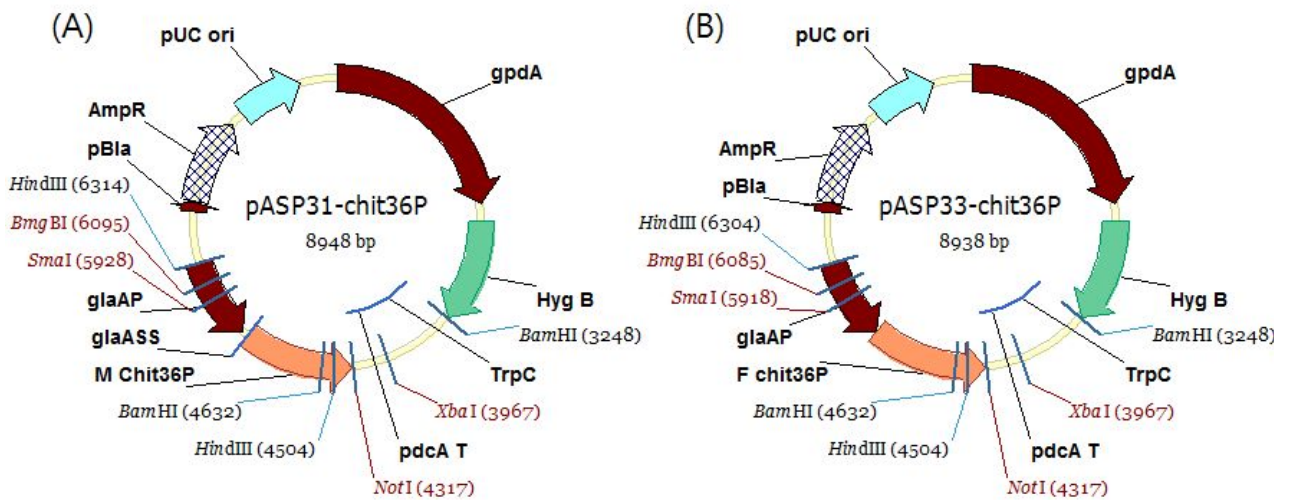


그림 9. *A. niger*에서 chitinase를 발현하기 위한 vector 제조. A, pASP31-Chit36P, *glaA* signal peptide 이용할 수 있는 vector; B, pASP33-Chit36P, native signal peptide을 이용할 수 있는 vector.

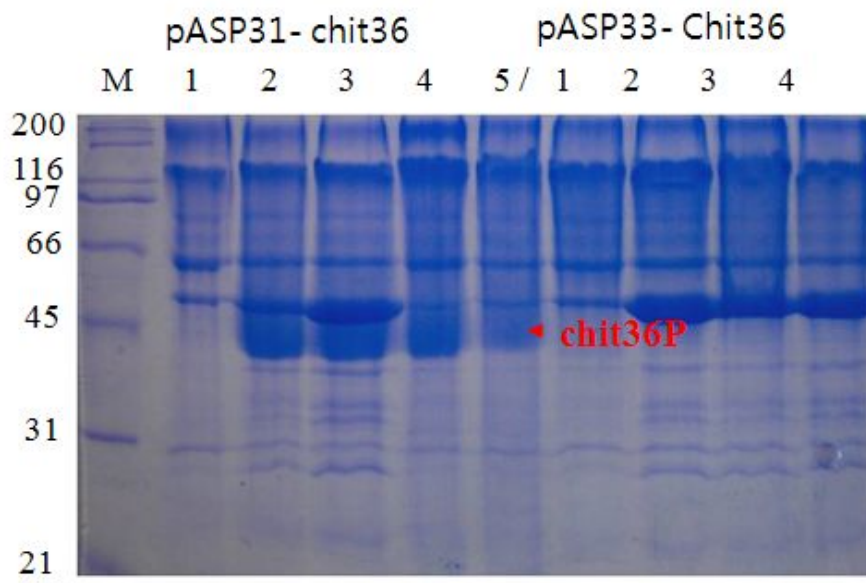


그림 10. Signal peptide에 따른 Chit36P 발현량 비교.

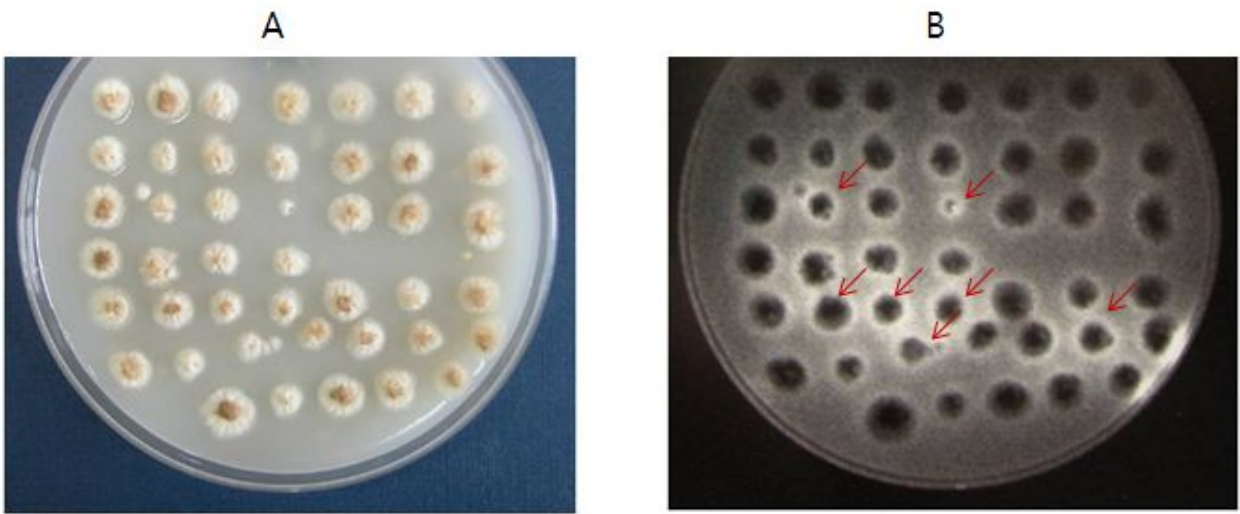


그림 11. pASP33-Chit36P vector 형질전환체로부터 과발현 균주 선별. A, Chitin 2%가 포함된 배지; B, 4MU-Nag의 overlay에 의한 pASP33-Chit36PP 형질전환체로부터 과발현 균주 선별.

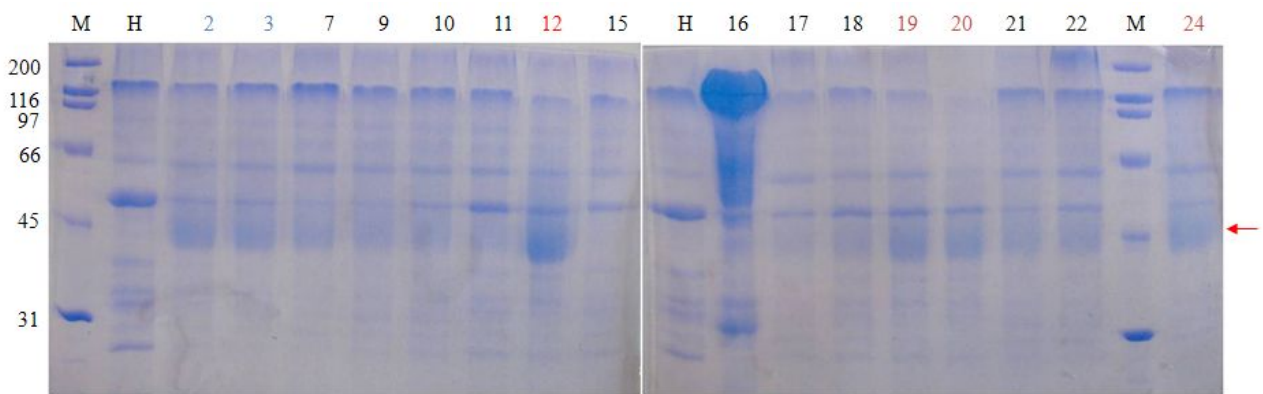


그림 12. pASP33-Chit36P vector 형질전환체 배양상등액의 SDS-PAGE 분석.
화살표, Chit36P.

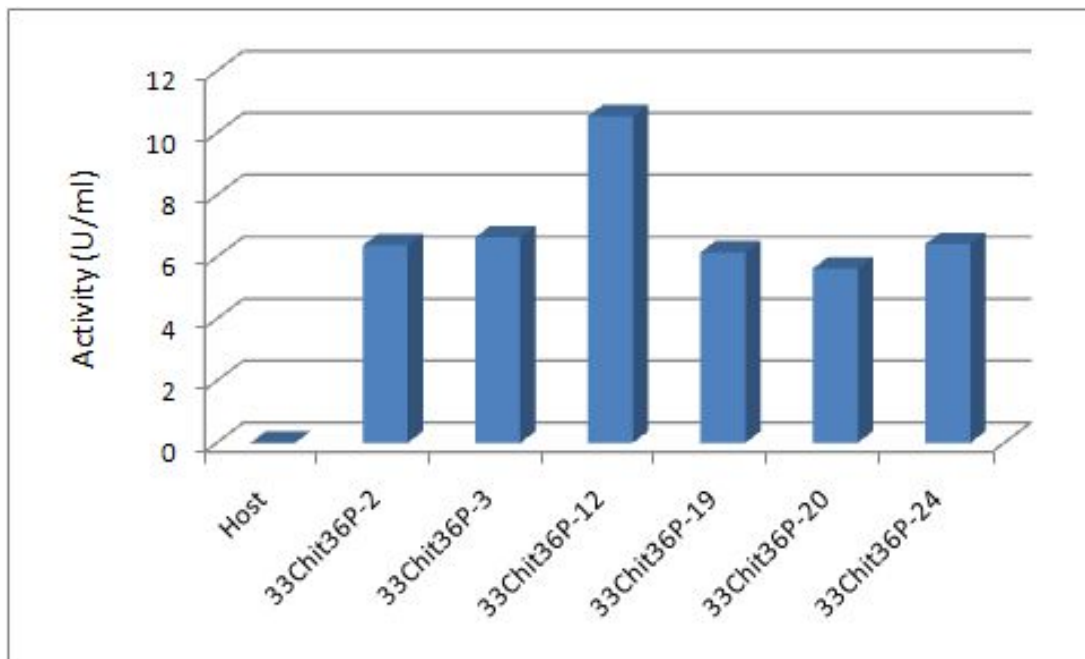


그림 13. *A. niger* 형질전환체 활성 확인.

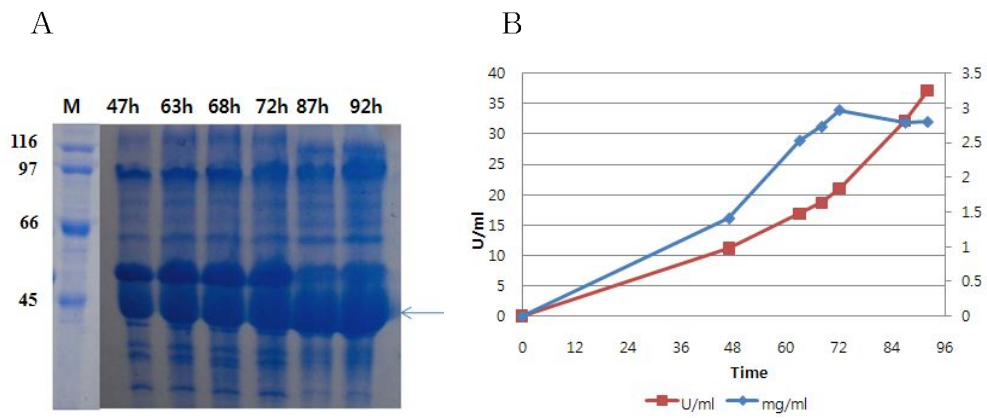
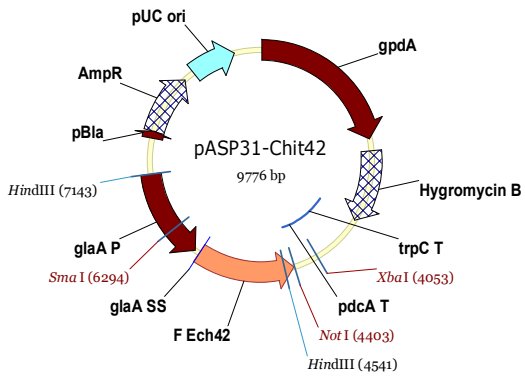


그림 14. 33Chit36P-12 변이체를 포함한 형질전환체의 2 L 발효 후 발효 상등액 분석. A, SDS-PAGE 분석; B, 전체 단백질 농도 및 chitinase 활성 분석.

A



B

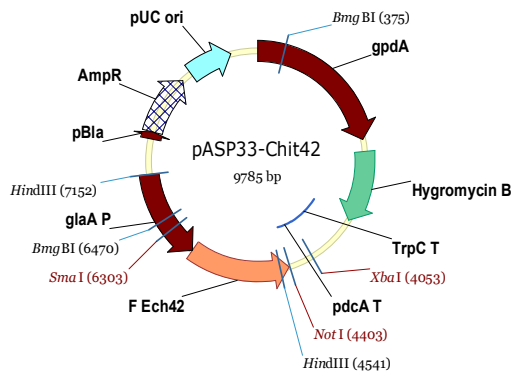


그림 15. *A. niger*에서 chitinase를 발현하기 위한 vector 제조. A, pASP31-Ech42, *glaA* Signal peptide 이용 할 수 있는 vector; B, pASP33-Ech42, native signal peptide을 이용할 수 있는 vector.

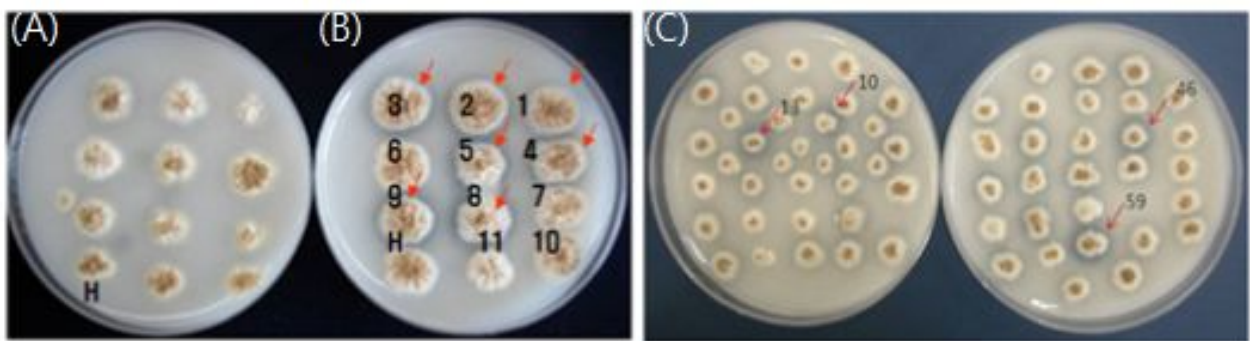


그림 16. chitin 배지에서 Ech42 과발현 균주 선별. A, pASP31-Chit42 형질전환체; B and C, pASP33-Chit42 형질전환체.

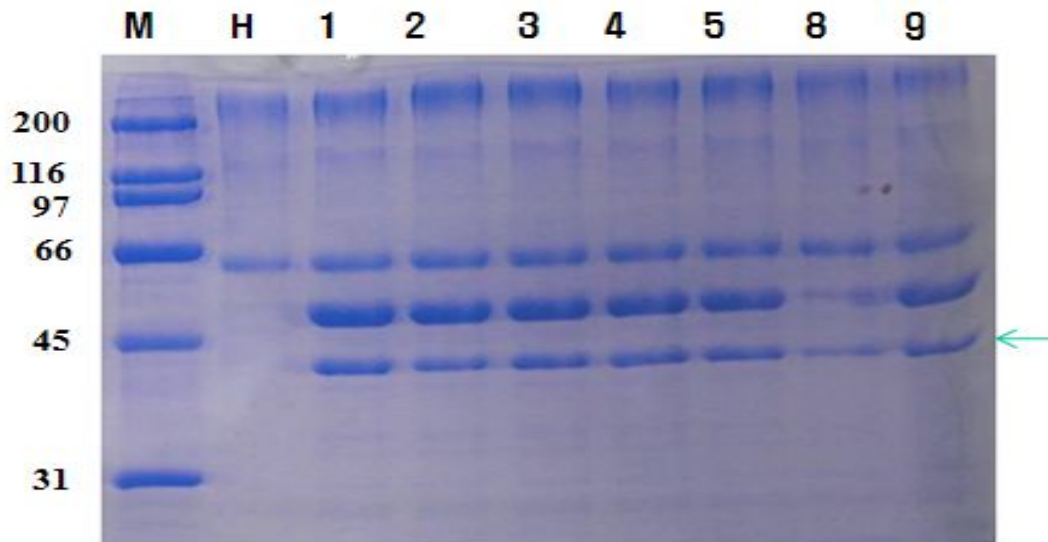


그림 17. pASP33-Chit42를 포함한 균주의 플라스크 배양 상등액의 SDS-PAGE 분석.

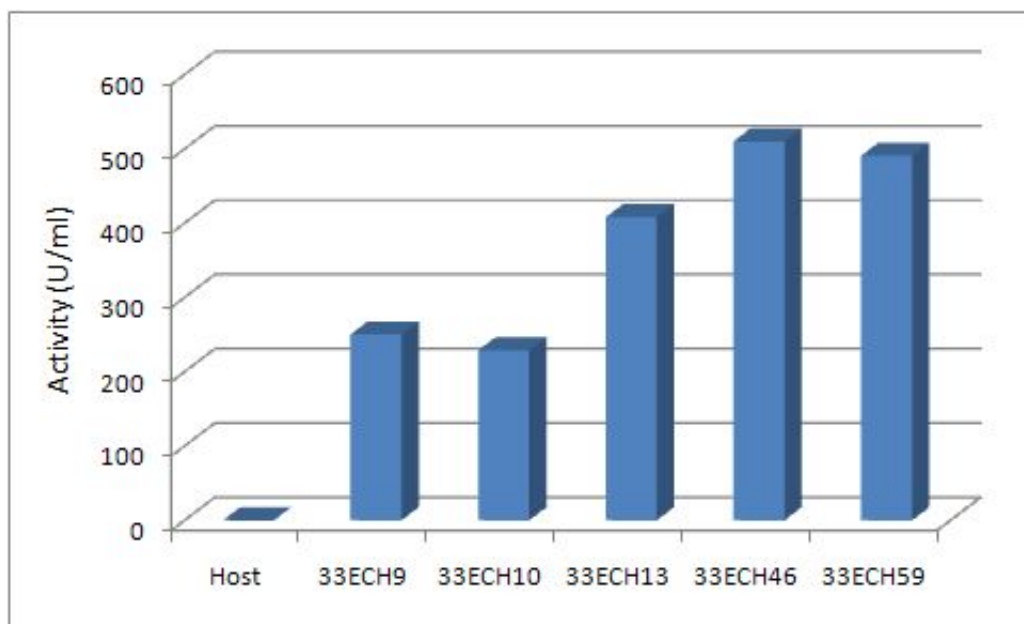


그림 18. pASP33-Chit42 vector 형질전환체의 chitinase 활성 확인.

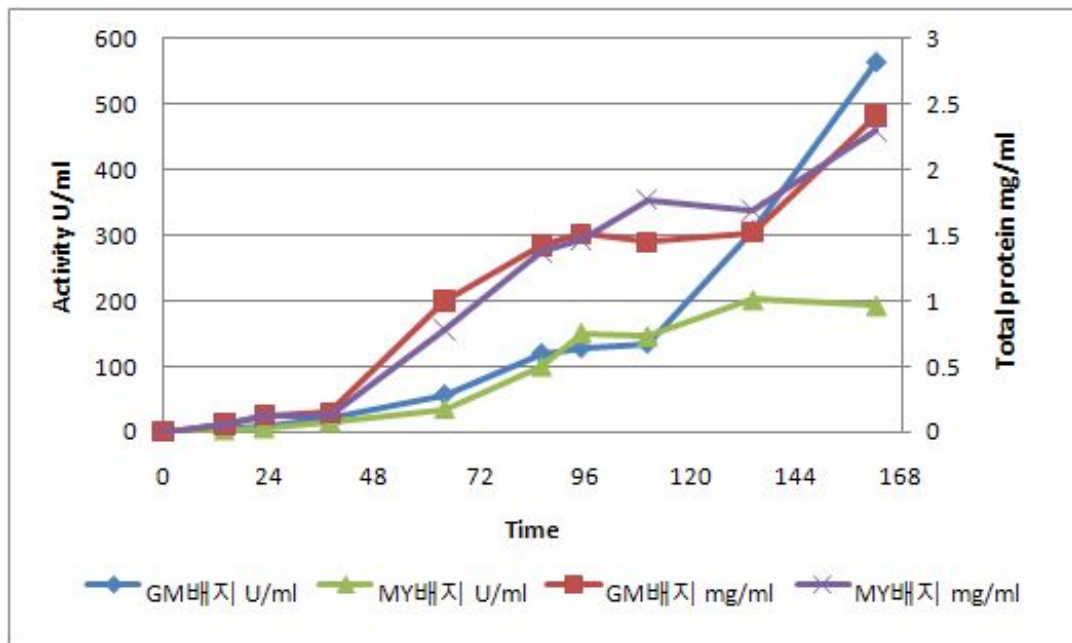


그림 19. 2L 발효조에서 33Ech9을 포함한 형질전환체의 배지 구성에 따른 ECH42 생산량 비교.

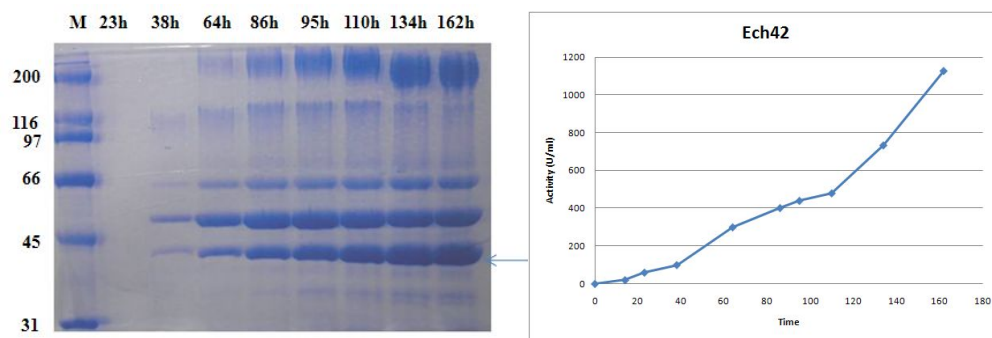


그림 20. 최적 배지 조성에서 33Ech46을 포함한 형질전환체의 2L 발효 상등액의 SDS-PAGE 분석 및 Ech42 활성 확인.

(6) Nag1 발현

- pASP33-Nag1 vector (그림 21)를 *A. niger* 균주에 형질전환하여 hygromycin 100 ug/ml에서 저항성을 보이는 형질전환체를 100개를 확보하였음. 4MU-Nag를 overlay하여 Nag1이 과발현된 균주를 선별하였음. 선별한 형질전환체를 플라스크 배양한 결과 21Nag1-10을 포함한 균주의 chitinase 활성은 101.2 U/ml로 확인되었음. 발효조에서 탄소원 및 질소원에 따라 발현량이 현저히 차이가 났으며, 그 중 M1, M2 배지 조성에서 가장 높게 발현됨을 확인함. 650rpm과 950rpm으로 배양한 결과 950rpm에서 2배 높게 발현되었음 (그림 22).
- 배지 및 발효조 최적 조건에서 500U/ml, 5g/L Chitinase 생산량을 확인하였음 (그림 23).

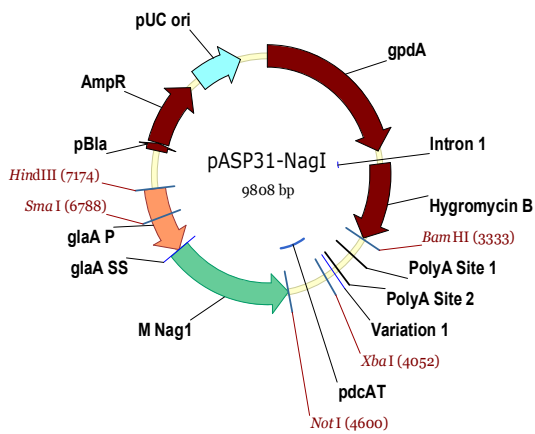
(7) 시제품 제작

- 각 효소는 spray drying을 거쳐 분말로 제조하였으며, 브랜드명 GF-Chitinase 으로 시제품을 제작, 출시하였음.

2. 분자진화기술을 이용한 키틴 분해효소 개량

- Bt endochitinase의 염기서열에 해당하는 57개의 sequence data 분석을 수행한 결과, 염기서열 data의 alignment를 통해 잘못 sequencing 된 것이나 한 균주 내에서 유래한 같은 sequence data는 제외하여 최종 31개의 균주로부터 유래한 31개 endochitinase의 nucleotide sequence를 선택하였음.
- 선택된 endochitinase 중 중간에 stop codon이 생긴 3개를 제외한 28개의 endochitinase의 amino acid sequence를 비교, 분석한 결과 전체적으로 Bt endochitinase 간에 약 6개 내외에 달하는 amino acid가 차이 나는 수준으로 마치 random mutagenesis를 한 것처럼 아주 잘 만들어진 natural library의 특성을 보였음. 소수의 변화이기는 하나, nonpolar에서 polar로, polar에서 charged로 또는 negatively charged에서 positively charged amino acid group 으로 바뀌는 등 의미 있는 변화들이 일어나 있음. 상동성이 높지만 cloning된 키틴분해효소는 chitin agar plate에서 다양한 효소 활성을 보임.
- Bt chitinase는 유사성이 매우 높은 가운데에서도 nucleotide 및 amino acid 서열상에서 차이들을 보이며, 그 자체로 natural diversity가 높는데 이런 자연적으로 형성되어 있는 Bt chitinase의 natural library scale을 인위적으로 넓히면 본래보다 더 다양하고 강한 활성을 지니는 chitinase를 얻을 수 있을 것임.
- Chitinase 개량을 위한 family shuffling을 위해서는 먼저 바실러스 속주균의 낮은 형질전환 효율을 극복해야 함.
- 일반적으로 형질전환 효율이 낮은 원인은 속주균이 가지고 있는 restriction-modification (RM) 시스템 때문인데 이는 외래 DNA 유입을 차단하여 자기 DNA를 보호하는 역할을 수행하고 있음.
- 따라서 이러한 RM 시스템에 관여하는 유전자들을 제거하면 형질전환효율이 획기적으로 증가한다는 보고가 다수 있음.

A



B

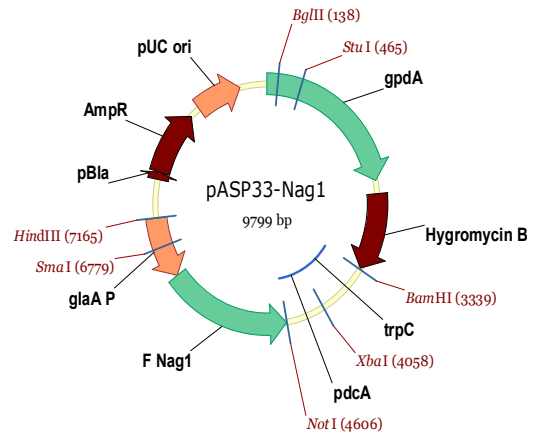


그림 21. *A. niger*에서 chitinase를 발현하기 위한 vector 제조. A, pASP31-Nag1, *glaA* signal peptide 이용할 수 있는 vector; B, pASP33-nag1, native signal peptide을 이용할 수 있는 vector.

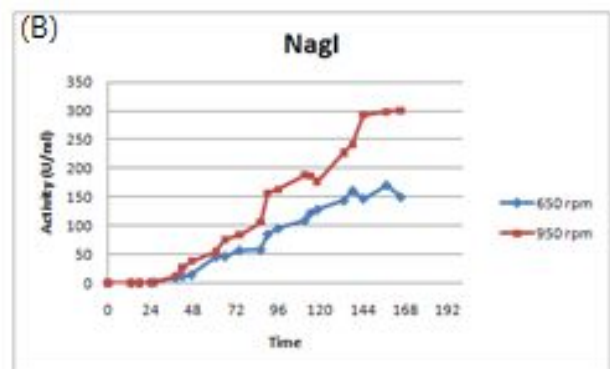
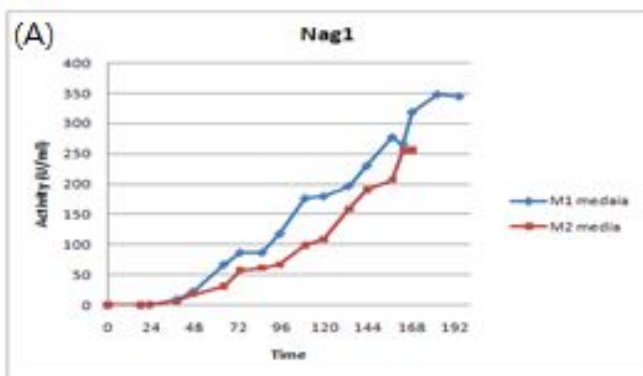


그림 22. 발효조에서 21Nag1-10을 포함한 형질전환체의 배지 조성 및 rpm에 따른 Nag1생산량 비교. A, 배지 조성에 따른 발현량 비교 (질소원으로서 M1은 Yeast extract 이용 M2는 대두분 이용); B, rpm에 따른 발현량 비교.

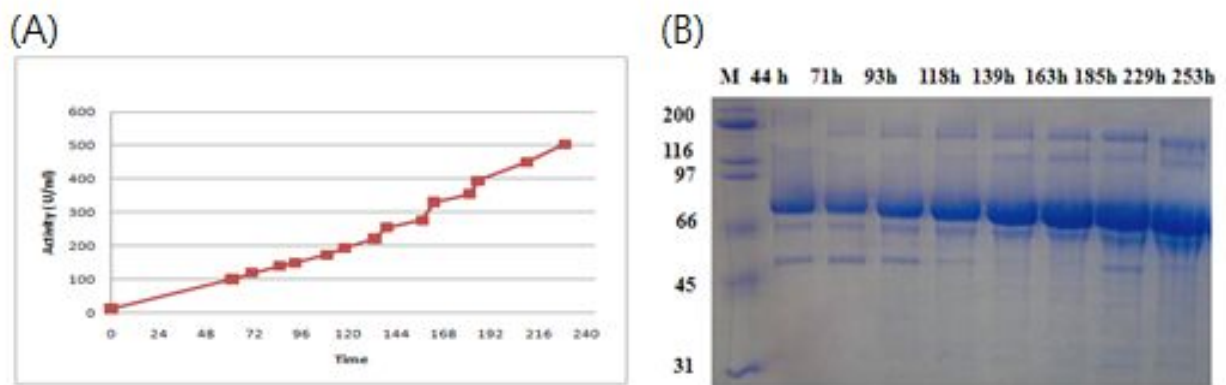


그림 23. 950rpm, M1 media 발효조건에서 21Nag1-10을 포함한 형질전환체 발효 배양 상등액 분석. A, chitinase activity; B, SDS-PAGE 분석.

- Chitinase 개량을 위한 family shuffling을 위해서는 먼저 바실러스 속주균의 낮은 형질전환 효율을 극복해야 함. 이를 위해 속주균이 가지고 있는 restriction-modification (RM) 시스템을 single-crossover integration과 in vivo recombination 기법을 이용하여 marker-free 하게 제거하였음. RM 시스템이 제거된 균주는 형질전환 효율이 최소 10배 이상 증가하였음 (그림 24).
- 분자진화 기술을 이용한 Bt chitinase의 개량을 위해 DNase I을 이용한 기술을 사용하였음 (그림 25).
- 확보된 Bt endo-chitinase 중 우수한 효소활성을 보이는 14개 유전자를 선정하고 이들을 대상으로 family shuffling을 수행하기로 함.
- 이를 위해 이들 유전자를 혼합하여 DNase I을 처리한 후 reassembly 하고 프라이머를 사용하여 다시 PCR을 수행함으로써 shuffling된 chitinase 유전자 fragment를 얻었음 (그림 26).
- shuffling된 DNA fragment는 기 개발된 바실러스 발현시스템에 클로닝한 후 RM 시스템이 제거된 *B. subtilis*에 형질전환 한 결과 다양한 효소활성을 보이는 클론을 얻었음 (그림 27).
- plate 상에서 투명환이 상대적으로 큰 콜로니들을 선정하여 4-nitrophenyl N,N'-diacetyl- β -D-chitobioside를 기질로 하여 chitinase 효소 활성을 측정해 본 결과 약 1.5~2배 정도 효소 활성이 증가된 변이체를 다수 확보하였음 (그림 28).

3. 키틴분해효소 활성 검정

- 키틴분해효소 및 개량효소가 과발현된 바실러스 균은 *Rhizoctonia solani* 및 *Pythium ultimum* 등 식물병원성 곰팡이에 대한 항진균 활성이 증가하였음을 확인하였음 (그림 29).
- 확보된 키틴분해효소의 효소살균제 개발 가능성을 타진하기 위하여 시판중인 glucanase와 혼합한 후 항진균활성을 측정하였음. 그 결과 glucanase와 키틴분해효소를 독립적으로 처리하였을 때에는 항진균활성이 없거나 약했지만 두 가지를 혼합하면 항진균활성이 나타나는 것으로 보아 키틴분해효소는 glucanase와 synergistic antifungal activity가 있음을 확인하였음 (그림 30).

4. 신규 생물농약 개발

가. pathogenesis-related protein

- 식물은 병원균이나 곤충의 공격을 받으면 방어작용의 일환으로 pathogenesis-related protein을 만드는데 이들은 주로 glucanase, chitinase, proteinase, proteinase inhibitor 등으로 현재 까지 17 family가 밝혀져 있음 (표 4, van Loon, 2006).
- PR protein을 이용한 생물농약 개발 가능성을 타진하기 위하여 *Bacillus*를 속주균으로 PR protein의 과발현을 시도하였음.
- 여러 PR protein 중 담배에서 합성되는 PR3, PR4 및 PR8 chitinase 유전자를 *Bacillus* 속주균에 맞추어 코오돈을 최적화하여 합성하였음. 합성된 유전자는 기 개발된 *Bacillus* 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 *B. subtilis*에서 과발현에 성공하였음 (그림 31).

Wild-type
B. subtilis

Mutant
B. subtilis

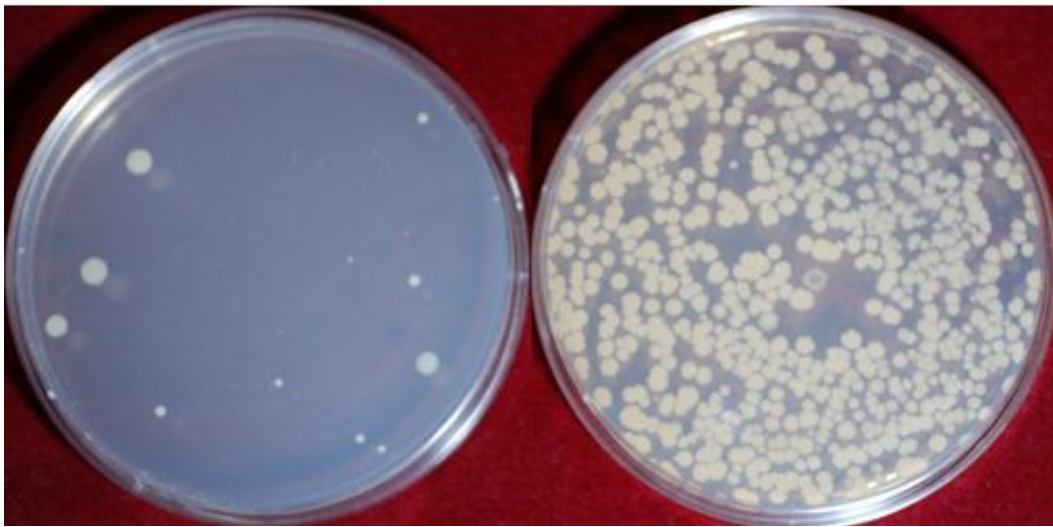


그림 24. RM 시스템과 관련된 유전자들을 제거하기 전과 제거한 후의 형질전환 효율 비교.

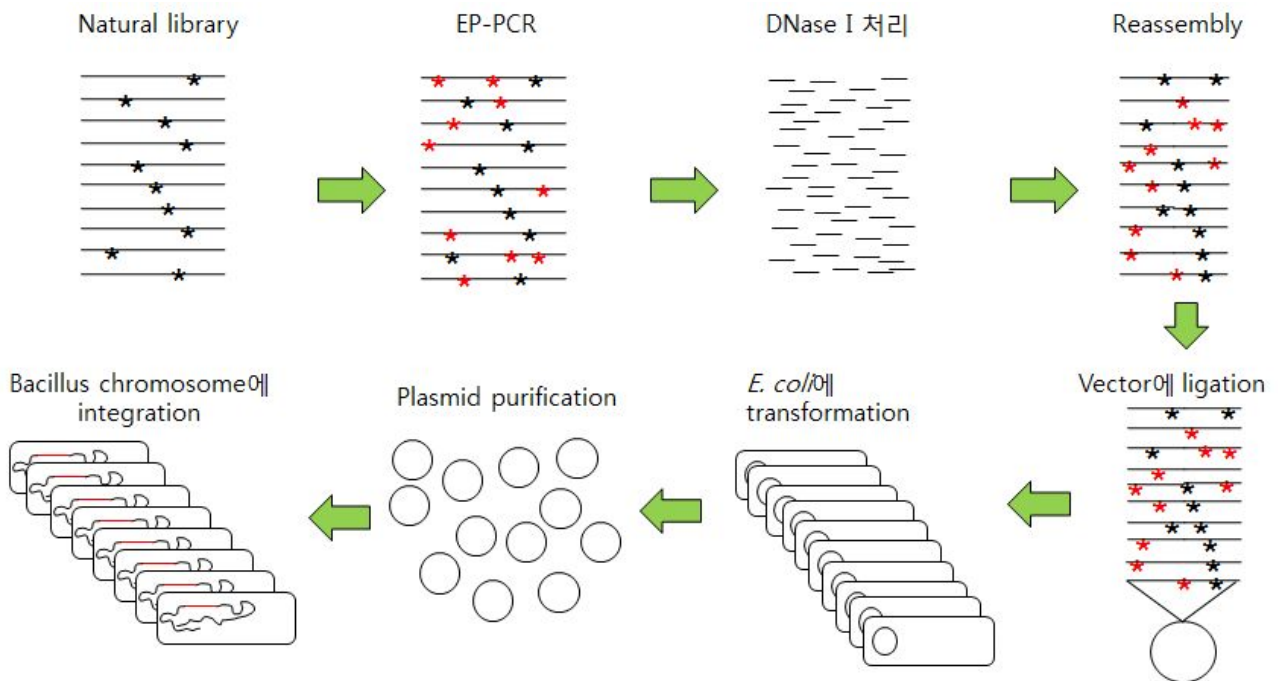


그림 25. 키틴분해효소 유전자 라이브러리 제작 모식도.

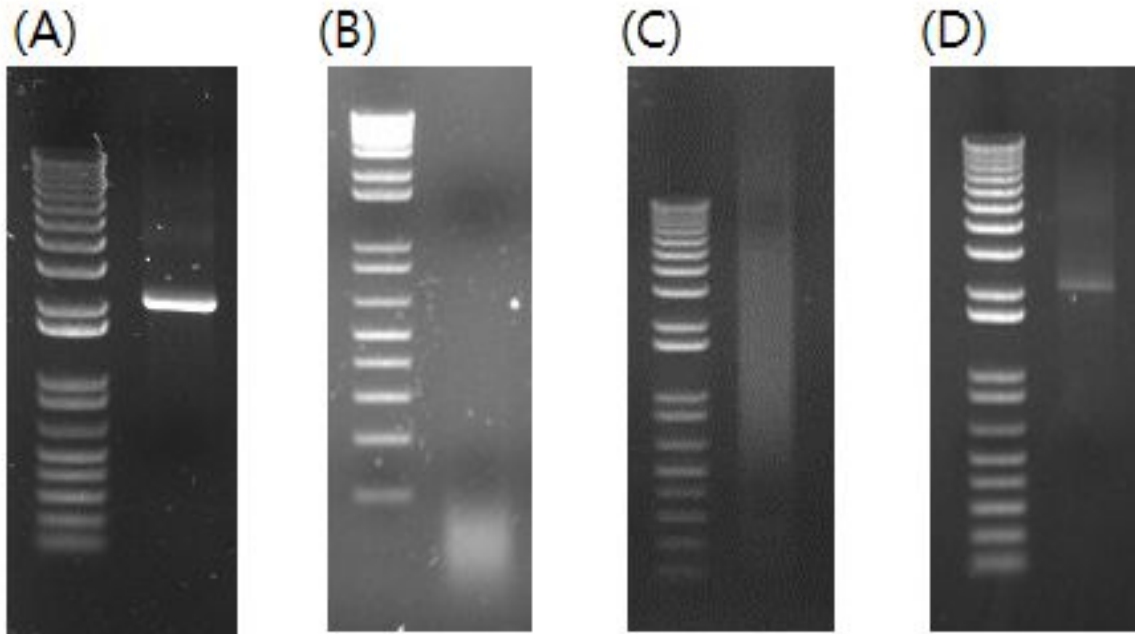


그림 26. endo-chitinase의 DNA shuffling. A, endo-chitinase PCR product; B, DNase I 처리; C, reassembly; D, PCR with primers.

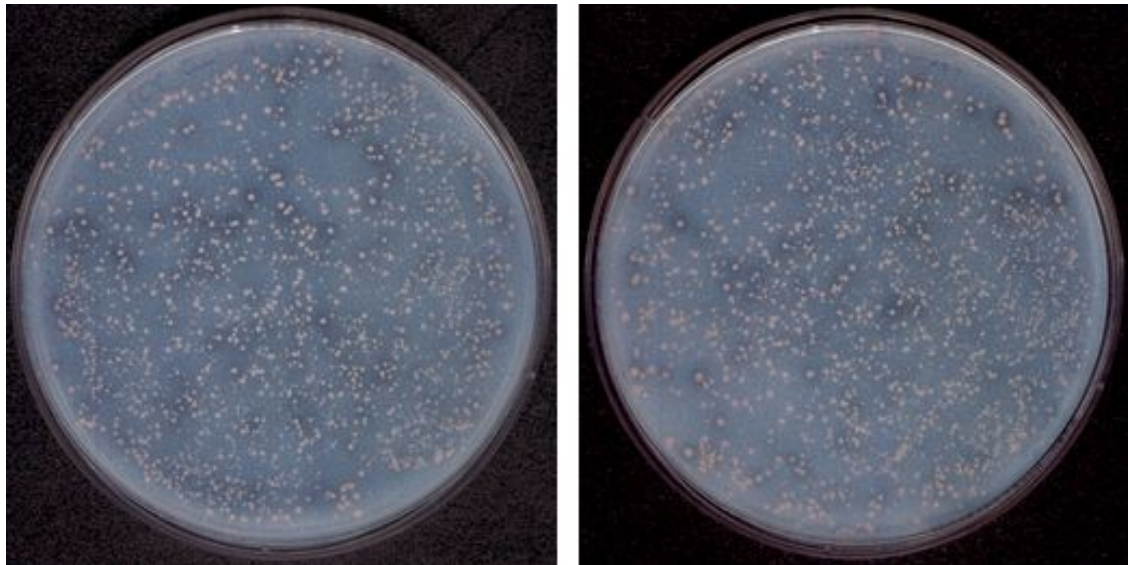


그림 27. evolution된 endo-chitinase screening.

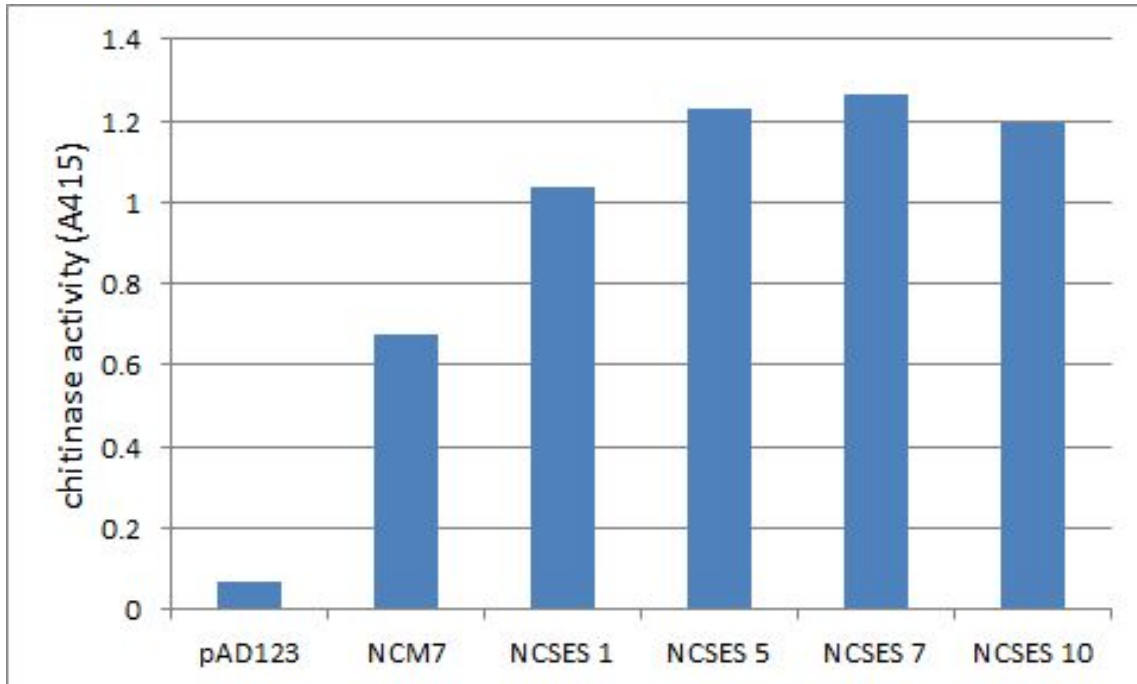


그림 28. 효소유전자를 포함하지 않은 벡터 (pAD123), shuffling 하기 전 효소유전자 (NCM7) 및 shuffling된 변이체 유전자를 포함한 균주의 배양상등액의 chitinase 활성 측정.

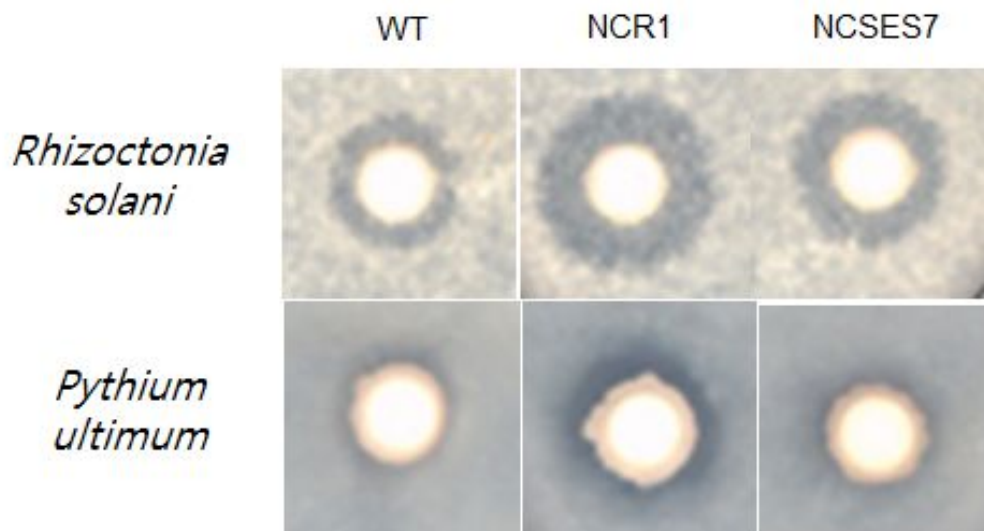


그림 29. *Rhizoctonia solani* 및 *Pythium ultimum*을 대상으로 Bt chitinase가 과발현된 *Bacillus* 균주의 항진균 활성검정.

Glucanase와
synergistic effect
(*Fusarium solani*)

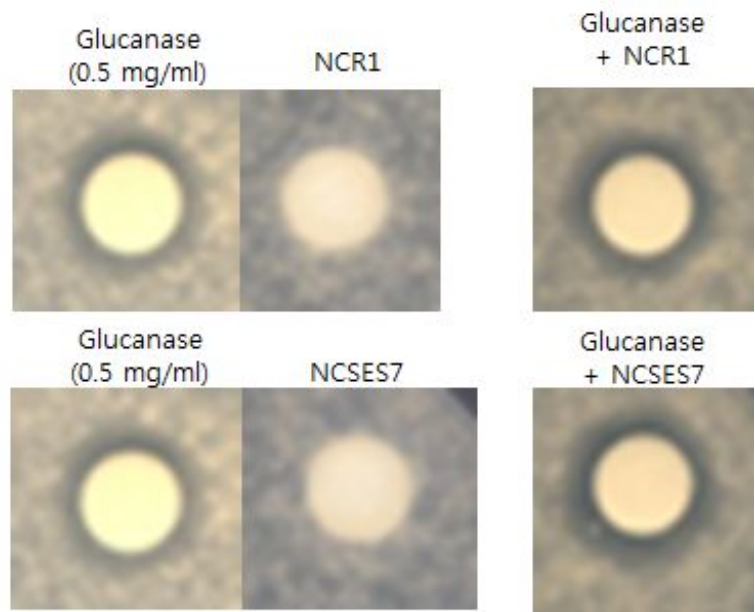


그림 30. *Fusarium solani*에 대해 Glucanase와 Bt chitinase의 항진균 활성의 시너지 효과.

⌘ 4. Recognized families of pathogenesis-related proteins

Family	Type member	Properties	Gene symbols
PR-1	Tobacco PR-1a	Unknown	<i>Ypr1</i>
PR-2	Tobacco PR-2	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]
PR-3	Tobacco P, Q	Chitinase type I, II, IV, V, VI, VII	<i>Ypr3</i> , <i>Cbia</i>
PR-4	Tobacco 'R'	Chitinase type I, II	<i>Ypr4</i> , <i>Cbid</i>
PR-5	Tobacco S	Thaumatococin-like	<i>Ypr5</i>
PR-6	Tomato Inhibitor I	Proteinase-inhibitor	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pin</i> ')
PR-7	Tomato P ₆₉	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>
PR-8	Cucumber chitinase	Chitinase type III	<i>Ypr8</i> , <i>Cbib</i>
PR-9	Tobacco "lignin-forming peroxidase"	Peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>
PR-10	Parsley "PR1"	Ribonuclease-like	<i>Ypr10</i>
PR-11	Tobacco "class V" chitinase	Chitinase, type I	<i>Ypr11</i> , <i>Cbic</i>
PR-12	Radish Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>
PR-13	Arabidopsis THI2.1	Thionin	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>
PR-14	Barley LTP4	Lipid-transfer protein	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>
PR-15	Barley OxOa (germin)	Oxalate oxidase	<i>Ypr15</i>
PR-16	Barley OxOLP	Oxalate-oxidase-like	<i>Ypr16</i>
PR-17	Tobacco PRp27	Unknown	<i>Ypr17</i>

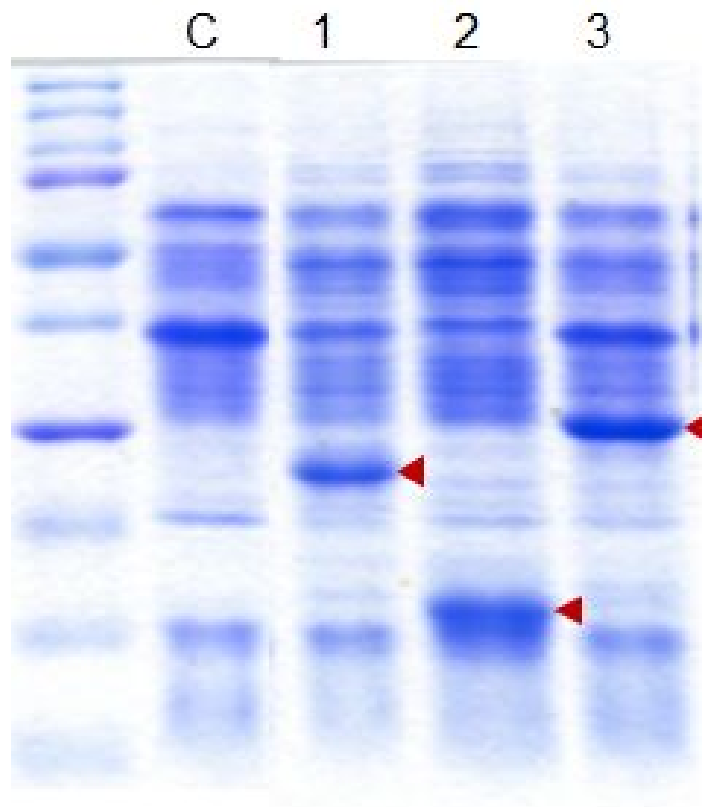


그림 31. *Bacillus*에서 tobacco 유래 PR proteins의 과발현을 SDS-PAGE를 이용하여 검정.
 C, control; 1, PR3; 2, PR4; 3, PR8.

- 과발현된 PR3 단백질은 온실가루이 (whitefly)를 대상으로 살충성 검정을 수행하였음. 대조구 (triton X-100 또는 PR-3 유전자를 가지고 있지 않은 벡터 만을 가진 균주)와 PR3를 과발현한 균주 배양액을 오이의 잎 뒷면에 처리한 후 4일에 걸쳐 잎에 붙어 있는 온실가루이의 개수를 측정하였음 (그림 32).
- 그 결과 PR3를 처리한 잎에서 온실가루이의 개수가 triton X-100만을 처리한 잎에 비해서는 약 5배 정도, 벡터만 가진 균주를 처리한 잎에 비해 약 3배 정도 줄어들어 있는 것으로 보아 PR3 단백질이 온실가루이에 대해 기피효과가 있는 것으로 사료됨 (그림 33).

나. Galectin-1

- Gall은 carbohydrate 특히 β -galctosides에 특이적으로 결합하는 mammalian sugar-binding protein으로 조류, 양서류, 어류, 선충류, 곰팡이 등의 고등동물에서 널리 발견되고 있으며 현재까지 14개의 family가 알려져 있음. 주로 뇌, 근육, 피부, 허파 등 분화가 활발한 세포의 cell-cell interaction에 관여하고 있으며 세포와 extracellular matrix 사이의 부착에도 관여하는 것으로 알려져 있음 (Camby, 2006).
- 또한 Gall은 키틴에도 잘 결합하는데 특히 곤충 중장의 peritrophic membrane (PM)에 결합하여 정상적인 PM 형성을 방해함. Gall을 처리한 곤충에서는 PM 층이 발견되지 않고 대신 다양한 미생물이 장에서 발견되는데 PM 의 보호막이 없어짐으로 인해 곤충의 장은 다양한 미생물이 내는 물질에 의해 쉽게 공격을 받아 결국 곤충이 죽게 됨 (Chen, 2009). 즉 Gall은 우수한 살충능력을 가지고 있음 (그림 34).
- 따라서 동물성 Gall은 (1) 고등동물에 대한 독성이 없고 (2) 단백질이므로 환경에서 일정시간 경과 후 분해가 일어나므로 잔류하지 않고 (3) 타겟인 키틴은 대부분의 곤충이 가지고 있으므로 살충 스펙트럼이 넓어 차세대 생물농약으로 유용하게 사용될 수 있으며 단독 또는 Bt제와 섞어서 사용할 수 있을 것임.
- 이와 같이 동물성 Gall은 차세대 생물농약으로서 여러 가지 장점에도 불구하고 대량생산이 어려우므로 상업화에 어려움이 있었음.
- 이러한 문제점을 극복하기 위하여 대량생산이 쉬운 바실러스 속주균을 이용하여 Gall을 대량생산하고자 하였음. 이를 위해 *gal1* 유전자를 바실러스 속주균에 맞추어 코오돈을 최적화하여 합성하였음. 합성된 유전자는 기 개발된 바실러스 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 *B. subtilis*에서 과발현에 성공하였음 (그림 35).
- 과발현된 Gall은 온실가루이 (whitefly)를 대상으로 살충성 검정을 수행하였음. 대조구 (triton X-100 또는 *gal1* 유전자를 가지고 있지 않은 벡터 (pAD123) 만을 가진 균주)와 Gall을 과발현한 균주 배양액을 오이의 잎 뒷면에 처리한 후 4일에 걸쳐 잎에 붙어 있는 온실가루이의 개수를 측정하였음 (그림 36).
- 그 결과 Gall을 처리한 잎에서 온실가루이의 개수가 triton X-100만을 처리한 잎에 비해서는 약 7배 정도, 벡터만 가진 균주를 처리한 잎에 비해 약 4배 정도 줄어들어 있는 것으로 보아 Gall이 온실가루이에 대해 기피효과가 있는 것으로 사료됨 (그림 37).

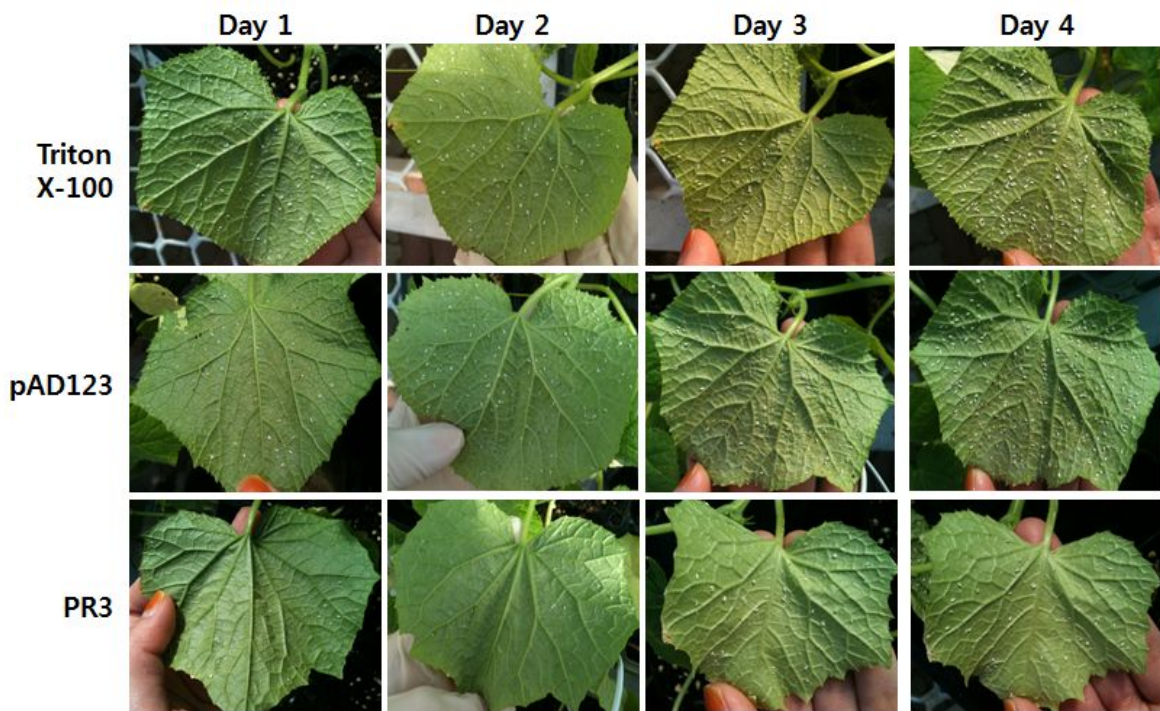


그림 32. PR3 단백질의 온실가루이에 대한 살충성검정. triton X-100, triton X-100만을 처리; control, 벡터 (pAD123)를 포함한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리; PR3, PR3 단백질을 과발현한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리.

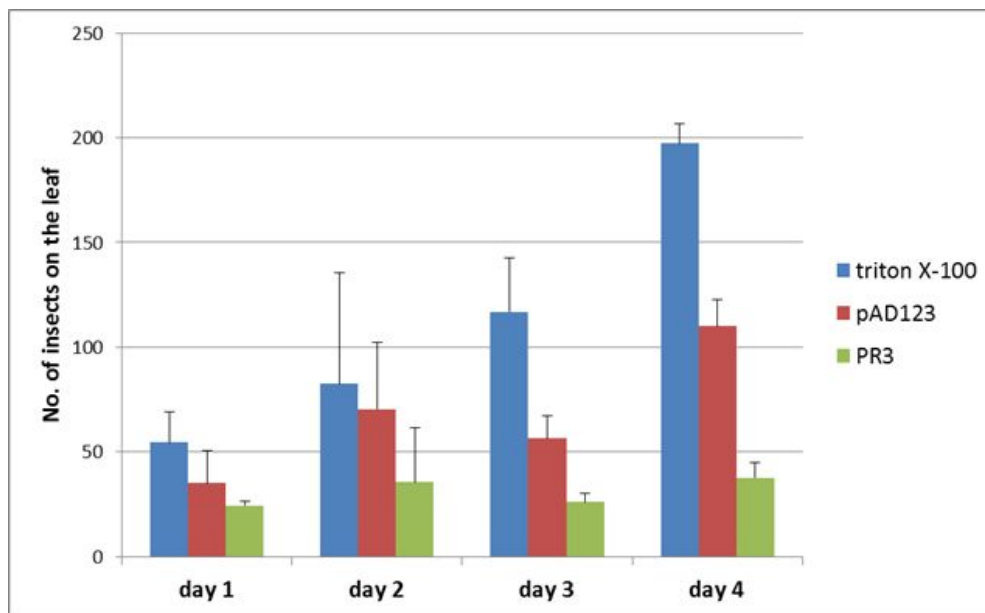


그림 33. PR3 단백질의 온실가루이에 대한 살충성검정. triton X-100, triton X-100만을 처리; control, 벡터 (pAD123)를 포함한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리; PR3, PR3 단백질을 과발현한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리.

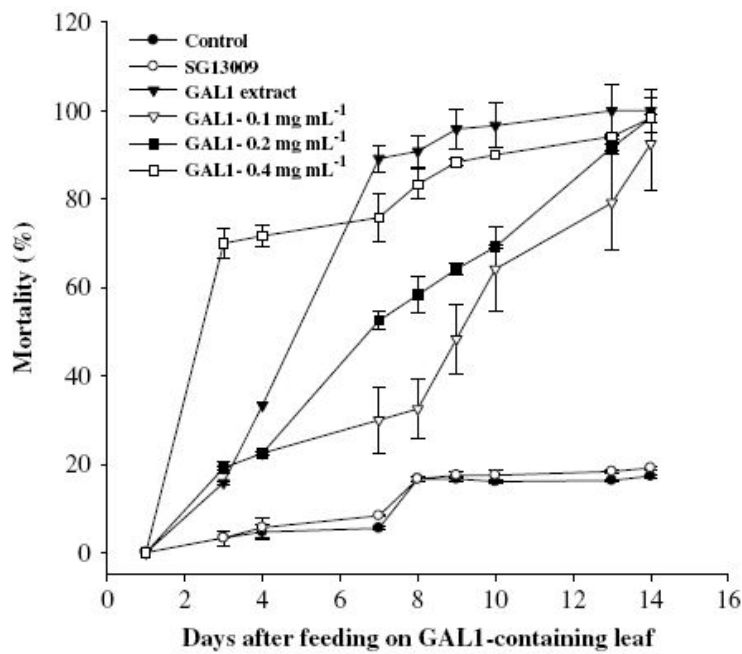


Figure 1. Effects of GAL1 on the survival of *Plutella xylostella* larvae. Third- to fourth-instar larvae were fed diets of cabbage drenched with various concentrations of GAL1 protein. Mortality was calculated daily. The results are presented as the means of three independent measurements; mortalities for control insects and GAL1-treated insects are significantly different at $P < 0.0001$ according to repeated-measures ANOVA.

그림 34. Gal1의 배추좀나방에 대한 살충성 검정. (Chen, 2009)

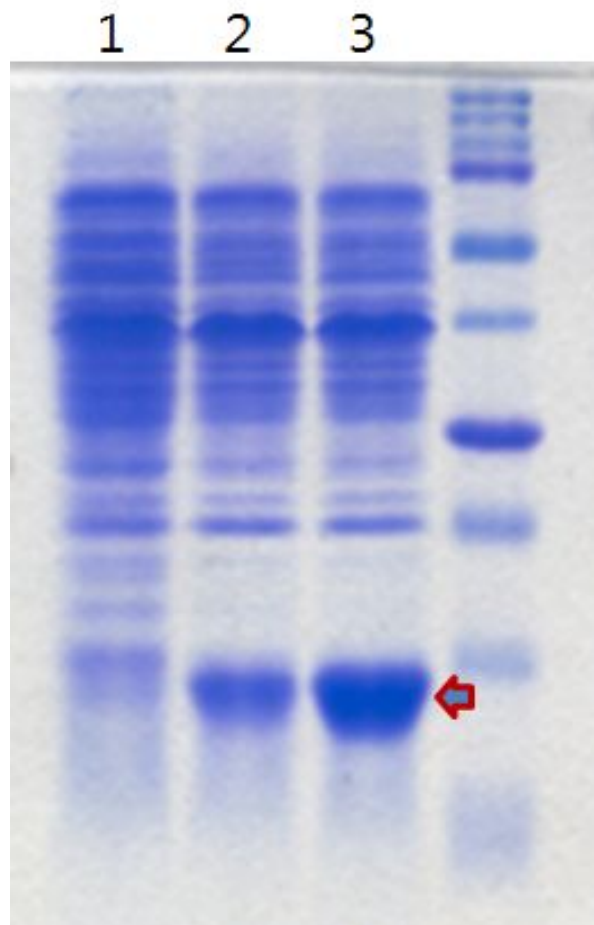


그림 35. *B. subtilis*에서 *gal1* 발현. 화살표, 발현된 Gal1. lane 1, control; 2, codon optimization 하지 않은 *gal1*; 3, codon optimization 한 *gal1*.

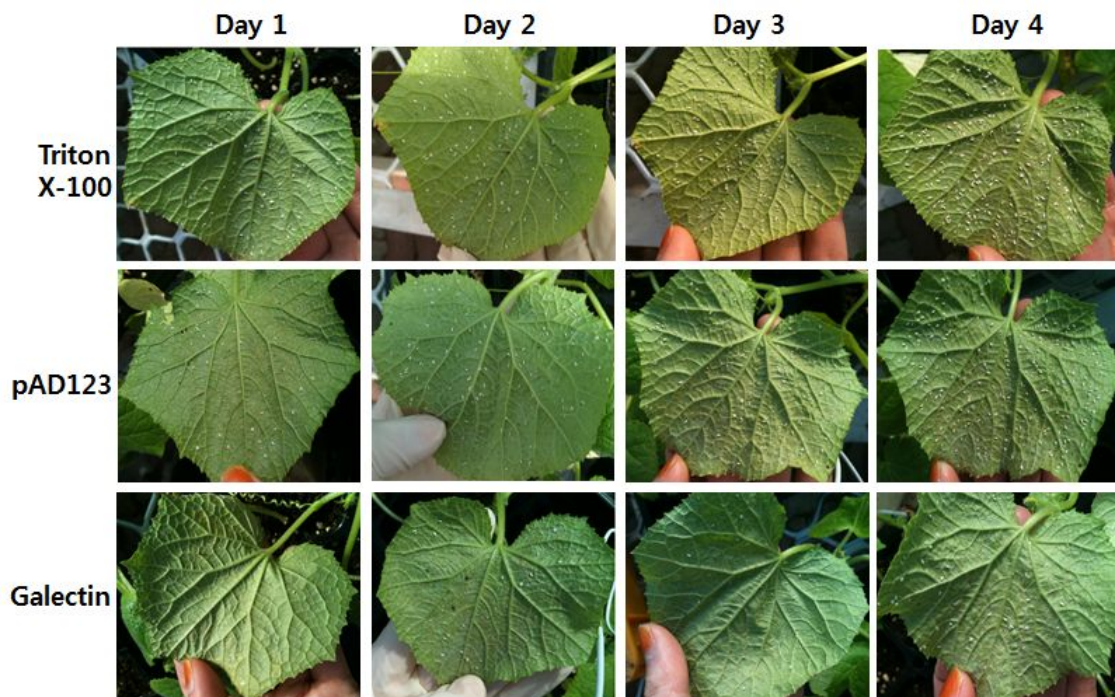


그림 36. Gall의 온실가루이에 대한 살충성검정. triton X-100, triton X-100만을 처리; control, 벡터 (pAD123)를 포함한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리; Galectin, Gall을 과발현한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리.

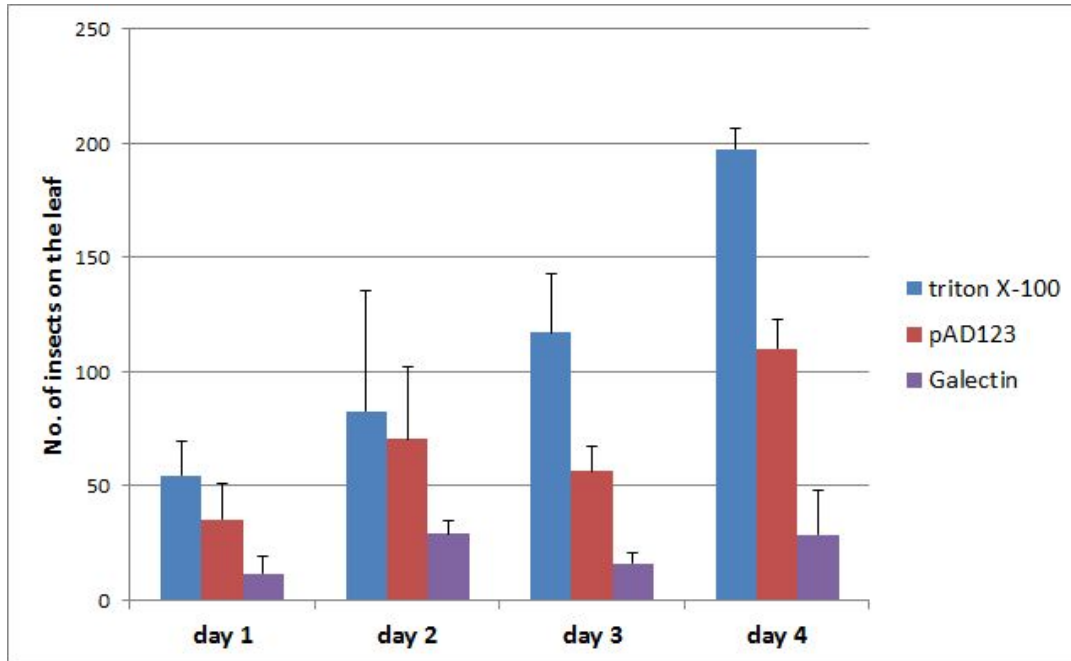


그림 37. Gall의 온실가루이에 대한 살충성검정. triton X-100, triton X-100만을 처리; control, 벡터 (pAD123)를 포함한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리; Galectin, Gall을 과발현한 *B. subtilis* 균주의 배양액 처리.

- GalI이 가장 널리 사용되는 생물농약인 Bt toxin의 활성을 증대시키는지 알아보기 위하여 배추좀나방을 대상으로 살충성검정을 수행하였음.
- 이를 위해 Bt HD1 균주 배양물을 여러 농도별로 희석하고 여기에 GalI을 과발현한 균주 배양액을 혼합하고 다시 최종농도 0.1%의 Triton과 혼합한 다음, 직경 4cm 케일 잎에 처리하였음. 이어, 상기 처리된 케일 잎에 3령기의 배추좀나방 유충 10마리를 접종하고, 72시간이 경과한 후, 죽은 유충을 계수하였음. 그 결과 GalI은 Bt의 살충활성을 약 4.6배 증가시킴을 확인하였음 (그림 38).

다. Lectin

- Lectin은 carbohydrate에 결합하는 성질을 가진 단백질로써 생명체에 널리 존재하고 있음. 특히 식물에 존재하는 lectin은 곤충, 곰팡이, 새 또는 초식동물 등으로부터 식물을 방어하는 역할을 수행하고 있음. 이러한 방어작용은 lectin이 포식자의 장 특히 PM에 결합하여 활성을 나타내는데 곤충의 경우 살충활성이 있음 (Hirabayashi, 2009).
- 이러한 lectin 역시 유망한 차세대 생물농약 후보이지만 저렴한 비용으로 대량생산이 어려우므로 상업화에 어려움이 있었음.
- 이러한 문제점을 극복하기 위하여 대량생산이 쉬운 바실러스 속주균을 이용하여 lectin을 대량생산하고자 하였음. 이를 위해 lectin 유전자를 바실러스 속주균에 맞추어 코오돈을 최적화하여 합성하였음. 합성된 유전자는 기 개발된 바실러스 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 *B. subtilis*에서 과발현이 되지 않았음.
- Gal은 다른 단백질의 폴딩을 도와주는 fusion partner로 사용될 수 있다는 보고가 있기 때문에 (Pasek, 2010) Lectin의 과발현을 돕기 위해 Gal과 lectin을 fusion 시켜 gal-lec 융합유전자를 제작하였고 이를 바실러스 발현시스템을 이용하여 발현한 결과 과발현에 성공하였음 (그림 39).

5. 실용화 연구

- 곤충 중장의 PM을 타겟으로 하는 효소 및 단백질의 경우 곤충이 섭식하여 PM에 잘 도달하기 위해서는 free한 단백질의 형태보다는 Bt 독소 크리스탈처럼 크리스탈 형태가 유리함.
- 일반적으로 대장균에서 단백질을 과발현하면 inclusion body (IB)를 형성하는데 이 IB는 misfolding 단백질의 결합체로써 활성이 없는 것이 일반적인 견해임.
- 그러나 최근 몇몇 보고에서 IB가 활성을 가진다는 사실이 밝혀졌음 (Garcia-Fruitos, 2012).
- 많은 세포에서 포도당이 과량으로 존재하면 central metabolic pathway를 통해 acetate를 분비함. acetate는 acetyl-CoA로부터 AckA 및 Pta 효소에 의해 생성되거나 pyruvate로부터 PoxB 효소에 의해 바로 생성되는 기작이 있음 (Wolfe, 2005).
- *Paenibacillus polymyxa* PoxB를 대장균에서 과발현하면 IB를 형성함 (그림 40).
- 이 IB를 분리하여 PoxB 효소활성을 측정한 결과 IB에 PoxB 활성이 있었음 (그림 41). 이는 PoxB IB가 active IB임을 의미함.
- PoxB를 이용하여 다른 단백질의 active IB 형성이 가능한 지 알아보기 위하여 PoxB의 C 말단에 Gfp 또는 *B. subtilis* AmyE를 fusion 하였음. 이 fusion construct를 대장균에서 과발현시키면 IB가 형성됨을 확인하였음.

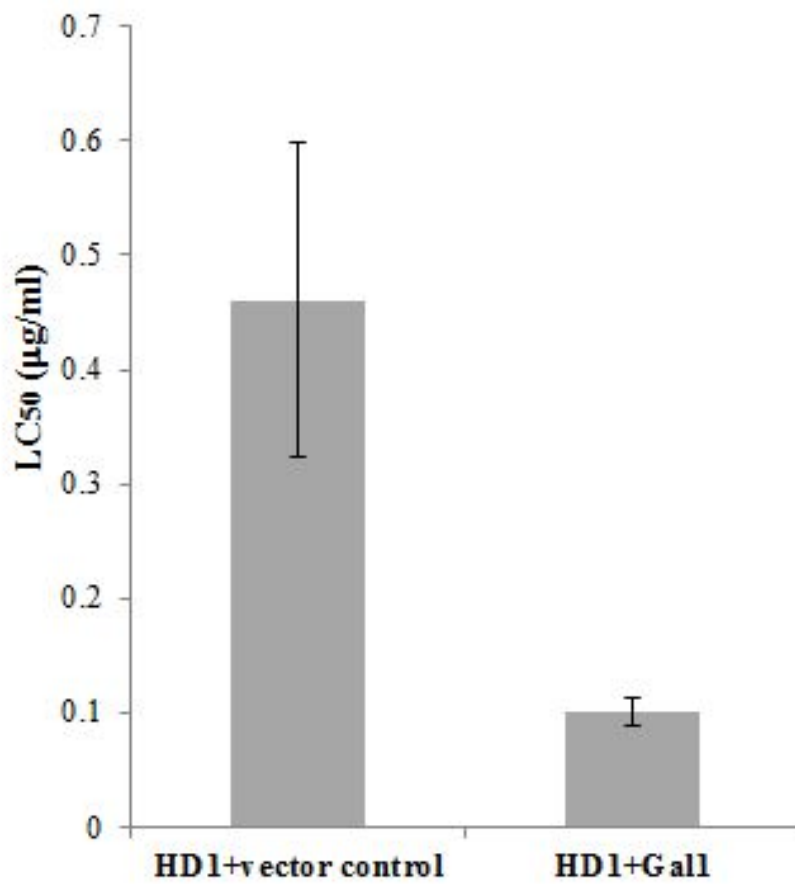


그림 38. Galectin의 Bt 살충활성 증가 검정.

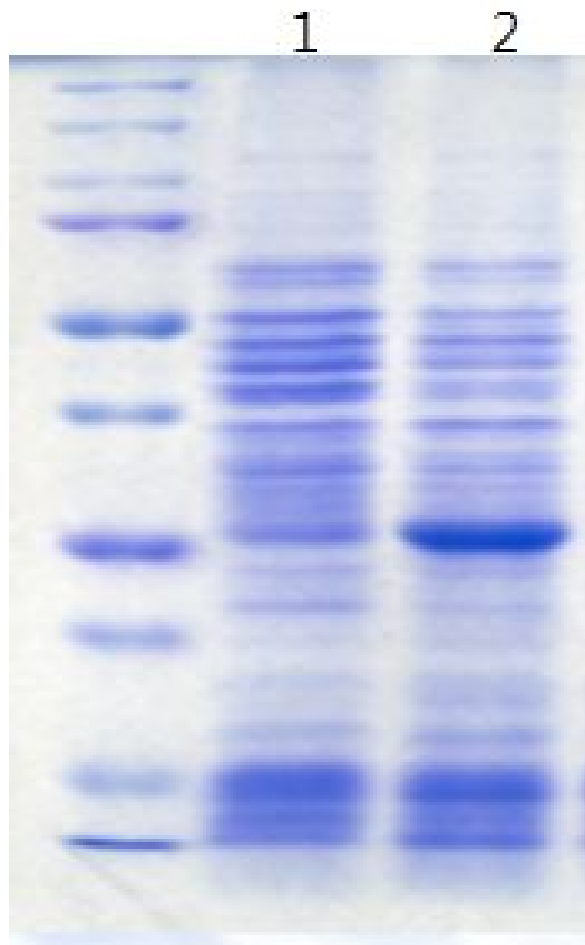


그림 39. *Bacillus*에서 식물성 Lectin의 과발현. lane 1, Lectin; 2, Galectin-Lectin fusion protein.

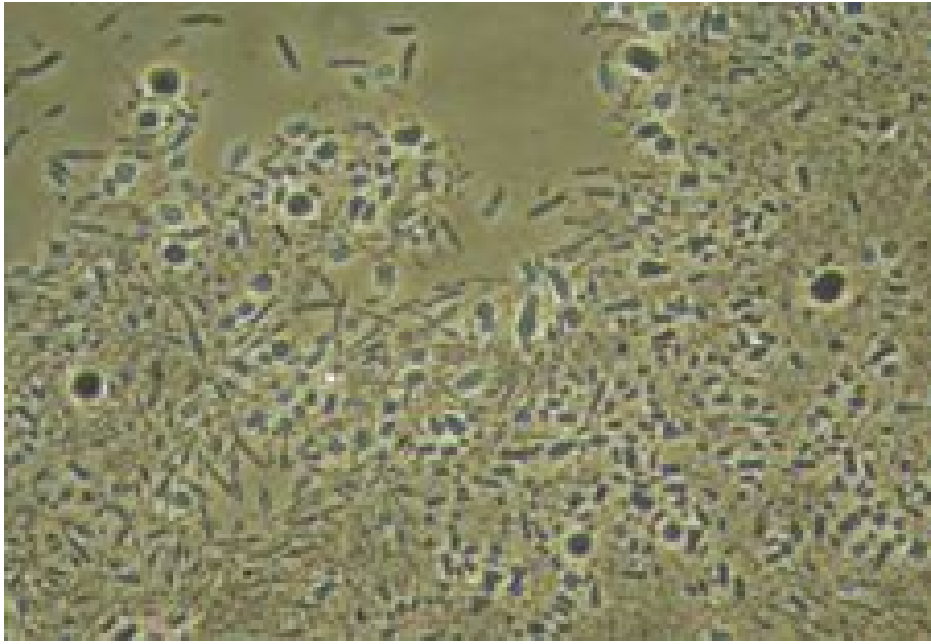


그림 40. *Paenibacillus polymyxa*의 poxB가 대장균에서 과발현되어 IB를 형성한 현미경 사진.

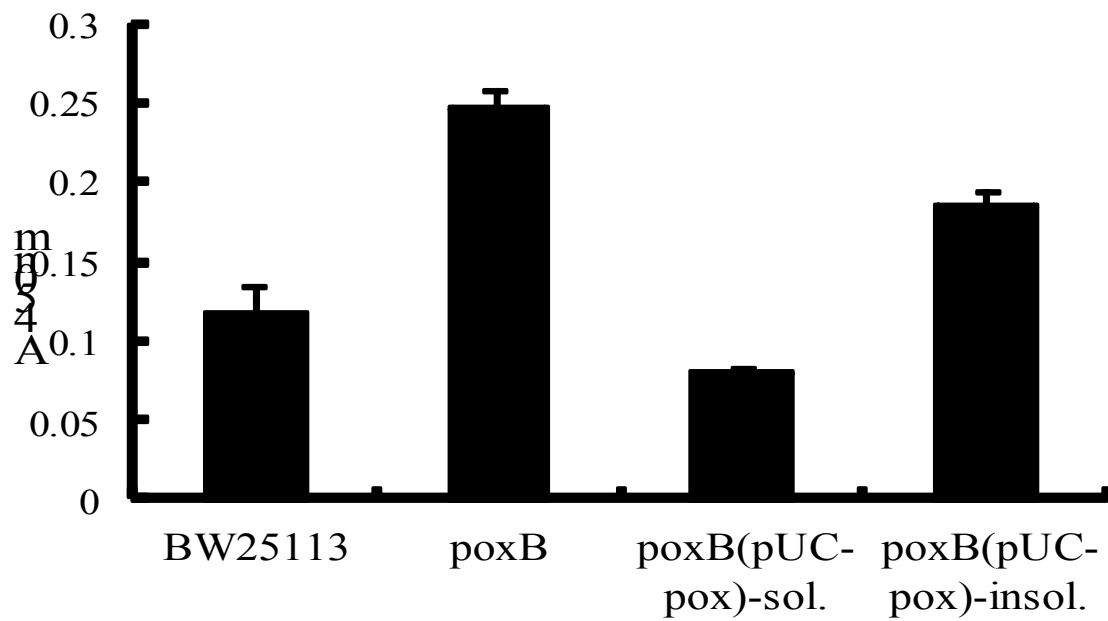


그림 41. 야생형 대장균(BW25113), *E. coli poxB* 결손 변이주(*poxB*), *P. polymyxa poxB*를 도입한 후의 상등액(*poxB*(pUC-ppox)-sol), 및 침전물(*poxB*(pUC-ppox)-insol)에서의 PoxB 효소 활성을 측정된 그래프.

- PoxB-Gfp IB를 형광현미경으로 관찰한 결과 형광을 나타내었음 (그림 42). 이는 이 Gfp가 IB 안에서 제대로 folding이 된 active IB임을 의미함.
- PoxB-AmyE IB를 순수분리한 후 amylase 효소활성을 측정한 결과 효소활성이 관찰되었음 (그림 43). 따라서 PoxB-AmyE IB 역시 active IB임을 알 수 있음.
- 이 PoxB에 GalI 또는 Bt chitinase를 fusion시켰음. 이 fusion construct를 대장균에서 과발현시키면 IB를 형성함 (그림 44).
- 이중 PoxB-chitinase IB를 순수분리한 후 효소활성을 측정한 결과 chitinase 활성을 측정되었음 (그림 45). 따라서 active IB임을 확인하였음.
- *Bacillus* 포자는 열, 온도 건조 유기용매 등 외부 스트레스에 잘 견디는 매우 안정한 물질이므로 보관과 운반에 매우 유리함. 이러한 성질은 *Bacillus* 포자를 기반으로 한 제품의 상업화를 용이하게 함.
- *Bacillus* 포자를 PM 타겟 단백질의 운반수단으로 이용하기 위해서는 PM 타겟 단백질을 포자표면에 display하는 것이 유리함.
- Galectin을 포자표면에 display한 후 display 여부를 쉽게 검정하기 위하여 Gfp를 fusion시켰음.
- fusion construct를 *Bacillus*에서 과발현 시킨 후 포자를 분리하여 Flow cytometer로 분석한 결과 Gal-Gfp가 성공적으로 포자표면에 display 되었음을 확인하였음 (그림 46).
- PM 타겟 단백질을 식물생장 효과가 있는 미생물에서 과발현을 시도하였음.
- 이를 위해 보유 중인 서로 다른 85종의 *Bacillus* 균의 휘발성 물질이 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 생장에 미치는 영향을 조사하였음.
- 그 결과 24 종의 미생물이 식물생장 효과가 있음을 확인하였음 (그림 47).
- 상기 85종 미생물 휘발성 물질의 ISR 효과 검정을 위해 식물병원균 *Erwinia cartovora*에 대한 병저항성을 측정하였음.
- 그 결과 50 종의 균주가 ISR 효과를 보임을 확인하였음 (그림 48).
- 식물생장 및 ISR 효과가 우수한 *Bacillus* 균주 중 *Bacillus* strain #11 균주에 Bt chitinase 유전자를 도입한 후 과발현을 시도하였는데 SDS-PAGE (그림 49)와 키틴 아가 배지에서의 활성검정 (그림 50)으로 chitinase가 과발현되었음을 알 수 있었음.
- Bt chitinase가 과발현된 *Bacillus* 균주를 *Botrytis cinerea*를 대상으로 항진균 활성을 검정한 결과 원 균주 보다 항진균활성이 증가했음을 확인하였음 (그림 51).

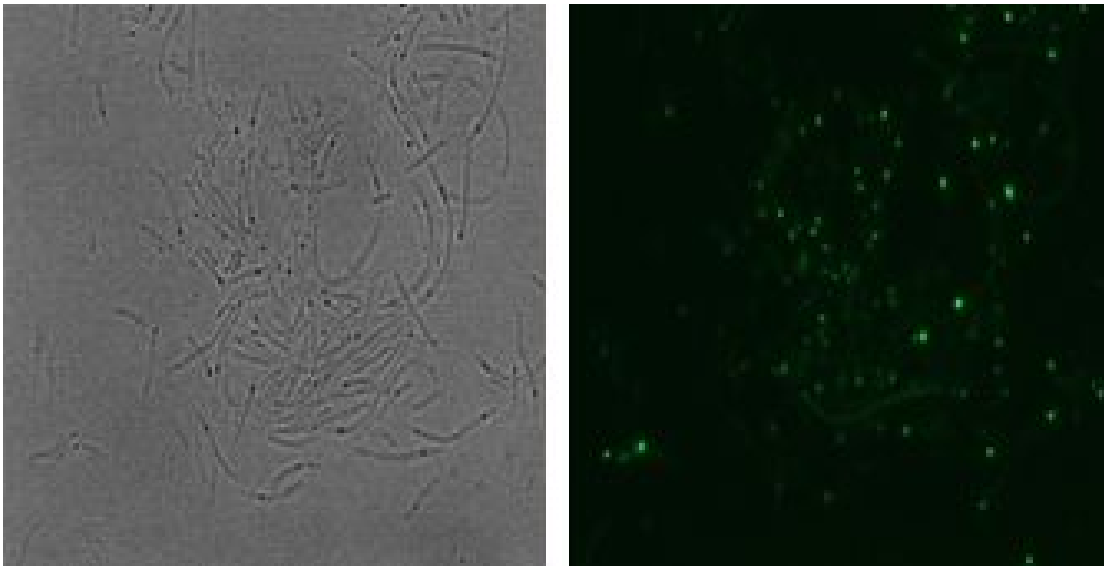


그림 42. *poxB-gfp* 융합 유전자가 도입된 대장균에 대한 광학현미경 및 형광현미경 사진.

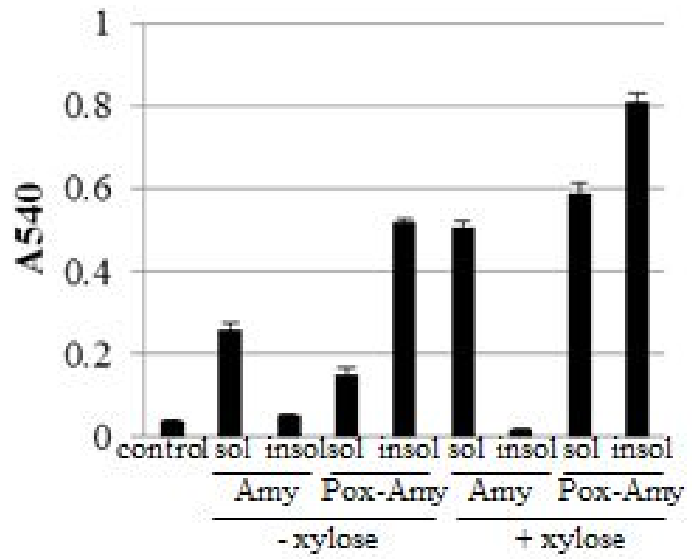
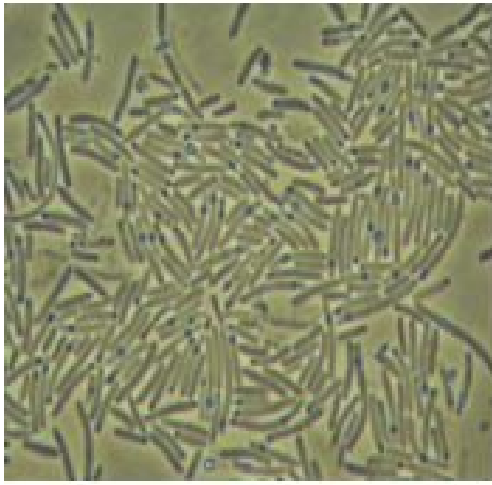


그림 43. *poxB-amyE* 융합 유전자가 도입된 대장균에 대한 광학현미경 사진(A) 및 아밀라아제 효소 활성을 측정한 그래프이다(B). sol: 상등액; insol: 침전물, Amy: AmyE 단백질; Pox-Amy: PoxB-AmyE 융합 단백질; -xylose: 자일로오스 부재, +xylose: 자일로오스 존재.

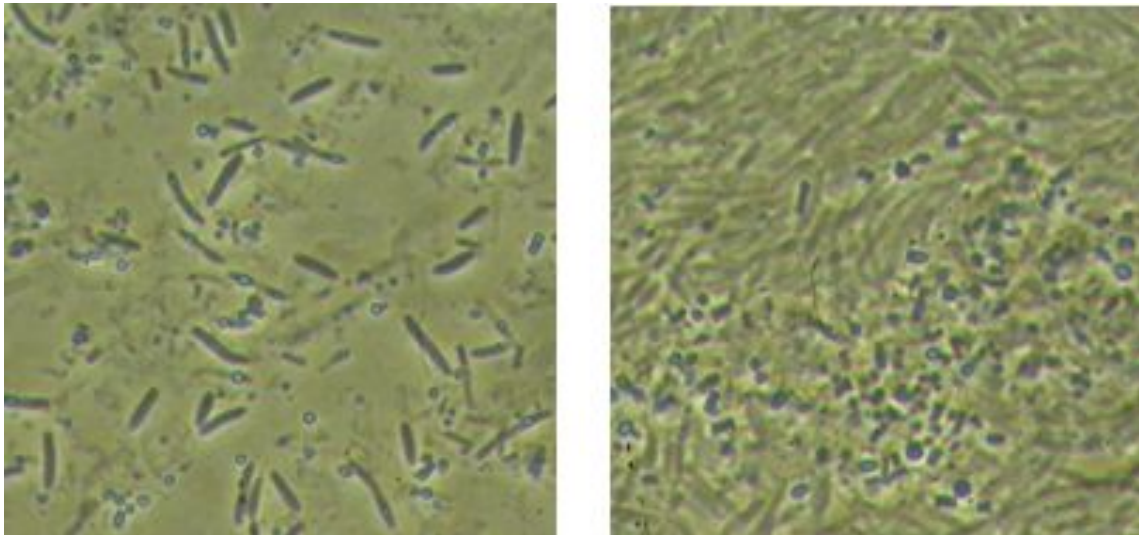


그림 44. 대장균에서 PoxB-Gal1 및 PoxB-chitinase fusion protein이 과발현되어 인클루전 바디를 형성한 현미경 사진.

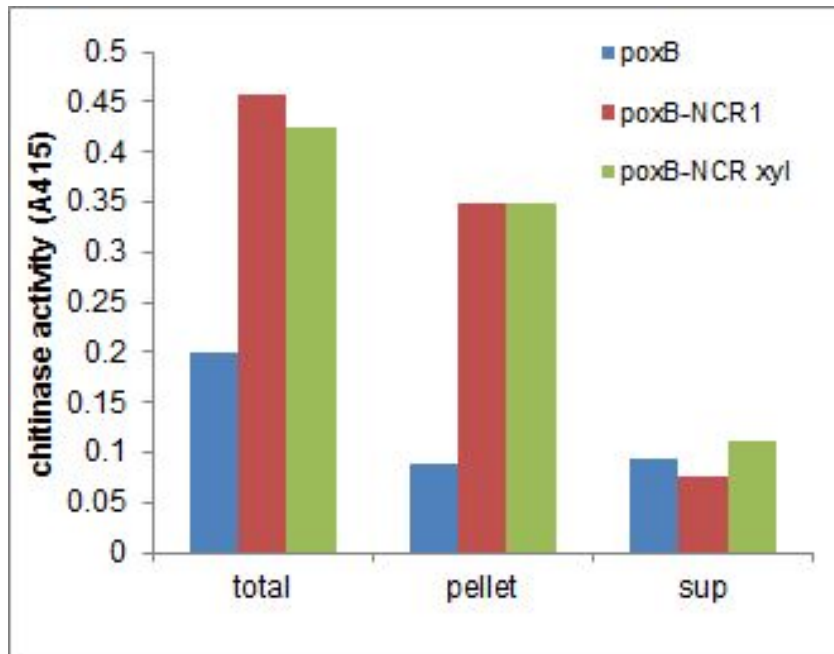


그림 45. PoxB-chitinase IBs를 만든 대장균을 완전히 파쇄한 후 pellet과 상등액을 대상으로 chitinase 활성을 검정한 그래프. poxB-NCR1, PoxB-chitinase fusion; poxB-NCR1 xyl, poxB-chitinase fusion construct를 포함한 대장균에서 IB를 만들기 위해 1% xylose 처리.

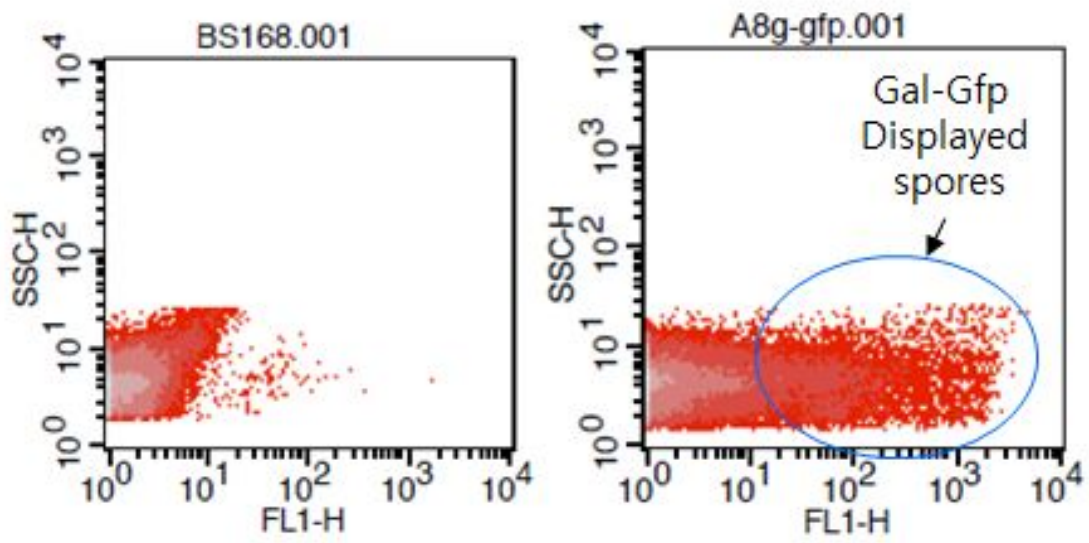


그림 46. Gal-Gfp의 포자 표면발현을 Flow cytometer로 분석한 그림.

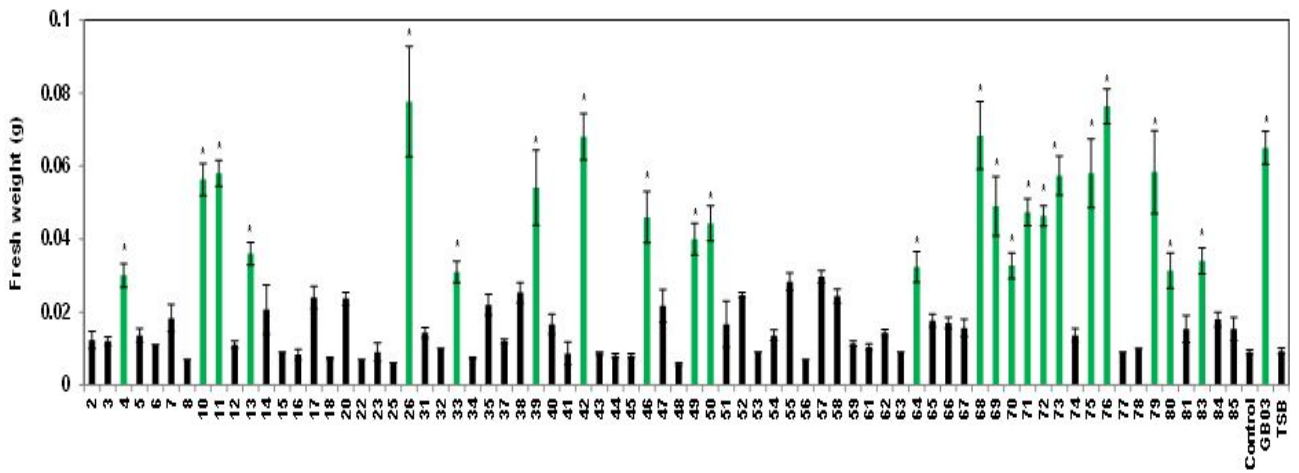


그림 47. *Bacillus* 균의 휘발성 물질에 의한 애기장대의 성장촉진효과.

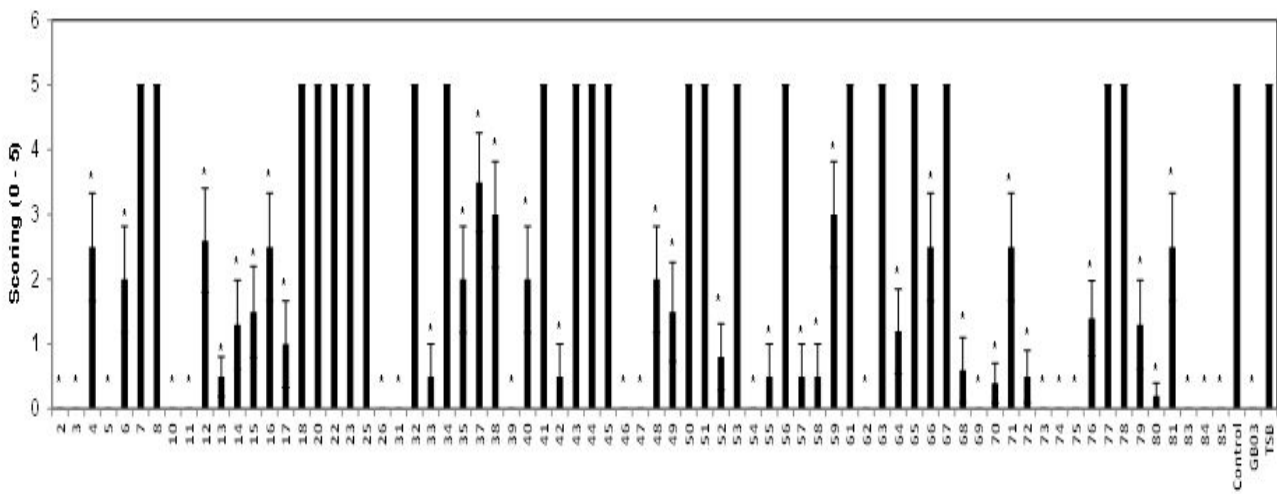


그림 48. *Bacillus* 균의 휘발성 물질에 의한 *Erwinia cartovora* 병저항성 유도 검정.

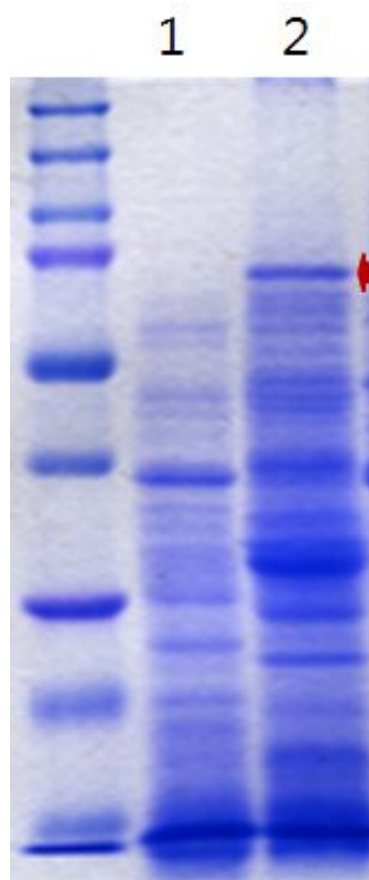


그림 49. 식물생장 효과가 우수한 *Bacillus* #11 균주에서 Bt chitinase의 과발현을 SDS-PAGE로 분석한 그림.

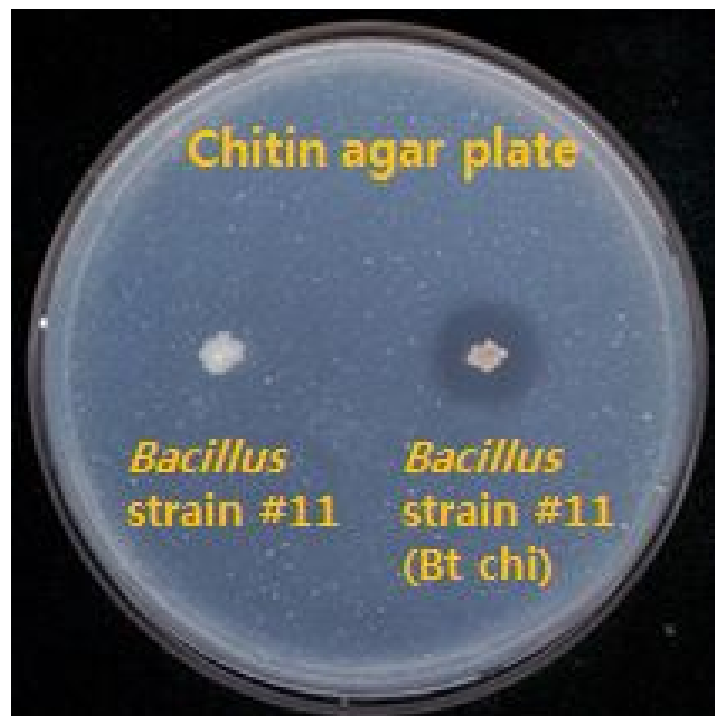


그림 50. 식물생장 효과가 우수한 *Bacillus* #11 균주에서 Bt chitinase의 과발현을 키턴 아가 배지에서 측정한 그림.

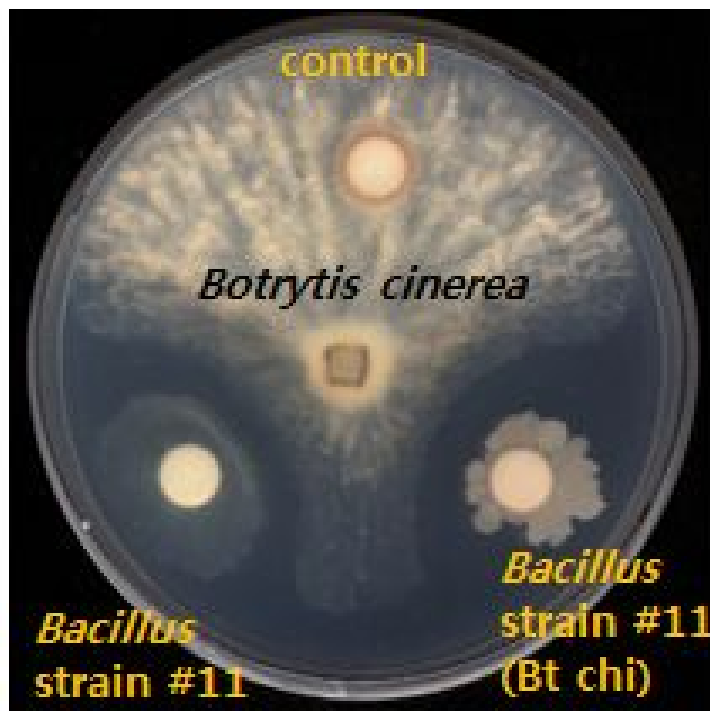


그림 51. Bt chitinase가 도입된 *Bacillus* strain #11의 항진균활성 검증.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용 및 관련분야에의 기여도
키틴 분해효소 확보 및 대량발현	100	<ul style="list-style-type: none"> - 서로 다른 62종의 Bt 균주로부터 degenerate primer를 사용하여 총 119종의 키틴분해효소 클로닝 및 염기서열 비교 분석 - 키틴분해효소 대량발현을 위해 Bt <i>cry</i> 프로모터를 이용한 맞춤형 바실러스 발현시스템 개발 - 개발된 발현시스템을 이용하여 <i>Bacillus subtilis</i>에서 키틴분해효소 대량발현 및 항진균활성 확인 - 기존 항진균 활성 균주의 성능향상 기대 - 곰팡이 유래 3종의 chitinase 클로닝 및 염기서열 분석 - 3종의 chitinase 과발현을 위한 발현벡터 제작 및 <i>Aspergillus niger</i>를 숙주균으로 대량 발현 성공 및 Chitinase 상품화
분자진화기술을 이용한 키틴 분해효소 개량	100	<ul style="list-style-type: none"> - 확보된 키틴분해효소 유전자 중 우수한 효소활성을 보이는 14개 유전자를 선정하여 이들을 대상으로 family shuffling 수행 - 키틴분해 활성이 증가된 변이체 다수 확보
신규 생물농약 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 광범위한 곤충에 대해 우수한 살충활성을 가지며 고등생물에 대한 독성이 없어 친환경적이지만 대량생산이 어려운 Galectin 기반 신규 생물농약 개발을 위해 합성생물학을 이용한 Galectin 유전자 생합성 - 바실러스 발현시스템을 이용한 Galectin 대량발현 성공 - 병해충의 공격에 대항하여 식물에서 생산되는 pathogenesis-related protein 중 PR3, PR4 및 PR8 chitinase 유전자를 합성생물학을 이용하여 생합성하고 바실러스 발현시스템을 이용하여 대량발현 - 식물성 Lectin 유전자 생합성 및 대량발현 - Galectin 및 PR3 chitinase의 온실가루이에 대한 활성 확인 - Galectin의 Bt 생물농약 성능향상 효과 확인 - 곤충 증장의 PM을 타겟으로 하는 새로운 개념의 생물농약 개발
실용화 연구	100	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Paenibacillus polymyxa</i> PoxB를 fusion 파트너로 이용하여 Gal과 Bt chitinase의 active inclusion body 형성, 효소 안정화 기대 - Gal1의 <i>B. subtilis</i> 포자 표면 display - 보유중인 서로 다른 85종의 <i>Bacillus</i> 균이 내는 휘발성물질의 식물 성장 및 ISR 효과 조사 - 우수한 식물성장 촉진 효과 및 ISR 효과를 보이는 균에 Bt chitinase를 도입하여 과발현 및 항진균 활성 증가 확인 - 식물생장과 시너지 효과 기대

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 2011년 Chitizyme이라는 상품명으로 항균/항충효과가 입증된 키틴분해효소를 제품화하였음.
- 생물농약 제조업체에 효소 원제를 공급하여 살균/살충, 항균/항충 효과 생물농약 제조에 이용하도록 함.
- 2012년 1월 31일 참여기업 연구원을 대상으로 단백질 발현 기본 원리 및 대량발현 방법 교육하였고 이는 효율적인 단백질 생산에 활용될 수 있을 것임.
- 다음과 같은 4편의 특허를 국내에 출원하였음.
 - 제목: 프로모터 변이체 및 이를 이용한 단백질 생산방법, 출원번호: 10-2010-0010044, 출원국: 대한민국, 출원일: 2010-02-03.
 - 제목: 단백질 발현 미세 조절방법, 출원번호: 10-2011-0121250, 출원국: 대한민국, 출원일: 2011-11-18.
 - 제목: 갈락틴을 포함하는 생물농약 조성물, 출원번호: 10-2011-0121248, 출원국: 대한민국, 출원일: 2011-11-18.
 - 제목: PoxB 유전자를 이용한 활성 인클루전 바디 생산방법, 출원번호: 10-2011-0121249, 출원국: 대한민국, 출원일: 2011-11-18.
- 다음과 같은 2편의 논문을 발표하였음.
 - Park SY, Park SH, Choi SK. 2012. Characterization of sporulation histidine kinases of *Paenibacillus polymyxa*. *Res. Microbiol.* In press.
 - Park SY, Park SH, Choi SK. 2012. Active inclusion body formation using *Paenibacillus polymyxa* PoxB as a fusion partner in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* In press.
- 국내 및 국제 학술대회 성과는 다음과 같음.
 - 학술대회 명칭: 2010 한국미생물생명공학회 정기학술대회 및 국제심포지움, 장소: 서울교육문화회관, 일시: 2010-06-24, 발표논문 제목: High-level expression of alkaline serine proteases in *Bacillus subtilis*, 발표자: Da-Eun Jeong, Seung-Hwan Park, and Soo-Keun Choi.
 - 학술대회 명칭: 2010 한국미생물생명공학회 정기학술대회 및 국제심포지움, 장소: 서울교육문화회관, 일시: 2010-06-25, 발표논문 제목: Cloning and nucleotide sequence analysis of *Bacillus thuringiensis* chitinases, 발표자: Soo-Keun Choi, Su-Jin Lee and Seung-Hwan Park.
 - 학술대회 명칭: Society for Industrial Microbiology 60th Annual Meeting, 장소: Hyatt Regency Embarcadero Hotel, San Francisco, CA, USA, 일시: 2010-08-02, 발표논문 제목: A Cry3 expression system for the high-level protein expression in *Bacillus subtilis*, 발표자: Soo-Keun Choi, Su-Jin Lee, Jae-Gu Pan, Seung-Hwan Park and Eui-Joong Kim.

- 학술대회 명칭: 한국미생물생명공학회 2011 국제학술대회 및 정기학술대회, 장소: 서울 교육문화회관, 일시: 2011-06-22, 발표논문 제목: Characterization of Sporulation Histidine Kinases of *Paenibacillus polymyxa*, 발표자: Soo-Young Park, Seung-Hwan Park, Soo-Keun Choi.
- 학술대회 명칭: 한국미생물생명공학회 2011 국제학술대회 및 정기학술대회, 장소: 서울 교육문화회관, 일시: 2011-06-22, 발표논문 제목: Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in *Bacillus subtilis*, 발표자: 정다운, 박승환, 김의중, 최수근.
- 학술대회 명칭: 112th ASM general meeting, 장소: Moscone North and South (Convention Center), San Francisco, CA, USA, 일시: 2012-06-15 ~ 2012-06-19, 발표 논문 제목: Characterization of Sporulation Histidine Kinases of *Paenibacillus polymyxa*, 발표자: Soo-Young Park, Seung-Hwan Park, Soo-Keun Choi.
- 전시회 참여 실적은 다음과 같음
 - 행사명칭: BIOKOREA 2011, 장소: COEX 3층 Hall C, 일자: 2011-09-28 ~ 2011-09-30, 참가자: 김의중 외 제노포커스, 참여품목: chitinase 외 효소.
 - 행사명칭: 2012 범부처 녹색기술 포럼, 장소: 서울교육문화회관, 일자: 2012-04-03 ~ 2012-04-05, 참석형태: 구두발표, 발표제목: 맞춤형 효소를 이용한 생물농약 성능 향상 기술 개발.
- 연구인력양성성과: 참여연구원 박사학위과정 지원 (2인 수료)
- 본 연구의 효소 및 단백질은 추후 필드테스트 및 발효 스케일업 등의 후속연구를 수행한 후 참여기업을 통해 사업화할 예정임.
- 시제품으로 제작된 키틴분해효소는 기존 생물농약과 함께 사용할 수 있는 효소제제로 상품 화할 예정임.
- 또한 개발된 효소와 생물농약 제제가 혼합된 복합제제의 형태로 제품화 할 수 있을 것임.
- 생물농약 전문기업과 기술, 생산, 마케팅 제휴

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

생물농약의 경우에는 대기업보다는 주로 벤처기업이나 중소기업들이 주도적으로 시장을 선도하고 있음. 전세계적으로 약 110여개의 회사들이 생물농약을 주요 사업으로 펼치고 있는 것으로 알려져 있음. 이들 중에서 연간 3천만불 이상 매출의 비교적 큰 규모의 미생물농약 회사로는 Verdera OY사(미생물농약 시장의 5%), Certis USA사(미생물농약 시장의 6%), AgraQuest사(미생물농약 시장의 6%) 등이 있고, 작지만 성공적인 회사로 평가받고 있는 회사로는 BioWorks사와 E-nema사가 있으며, 혁신적인 기술로서 이제 막 시작하는 회사로는 Pasteuria BioSciences사와 Exosect사 등이 알려져 있음 (생물농약의 연구개발 동향-바이오인, 2009년 10호). 전 세계 바이오농약 시장은 2001년 현재 세계 농약 시장의 약 2%인 5.8억 달러이었으나, 2005년 전체 농약 시장의 2.5% 점유율을 보이고 있으며, 2010년에는 4.3%의 시장 점유율로 10억 7,500만 달러의 시장이 형성될 것으로 추정되는데, 바이오농약 시장은 Bt제와 기타 미생물제제가 4 : 6의 비율로 형성될 것으로 예상되고 있다. 최근에는 OECD 국가를 중심으로 한 친환경농업정책으로 인하여 그 시장규모가 2013년에는 세계 농약시장의 약 15%인 45억 달러에 달할 것으로 추정되고 있다 (한국바이오협회 보고서 2010).

미국의 바이오농약 시장을 이끌고 있는 중소기업 Certis-USA사·AgraQuest사 등은 각각 대표 살충·살균제들을 보유하여 글로벌 사업을 진행하고 있고, 미국뿐만 아니라 전 세계의 distributors들을 이용하여 글로벌 사업을 진행하고 있다 최근 새로운 개념의 바이오작물보호제의 기전으로 이해되는 식물전신유도 저항성 유도에 대한 연구분야에서는 세균에 의한 ISR의 식물반응과 세균의 유도저항성 결정인자에 대한 연구에 주력하고 있지만 정확한 기작이 알려져 있지 않고, 유도저항성을 이용한 상품화된 미생물유래 제품은 미국 Bayer사에서 개발한 Yield Shield가 유일하게 출시되어 앞으로 경쟁이 치열할 것으로 판단된다 비슷한 개념에서 최근에 발표된 세균의 휘발성 물질에 의한 ISR은 동일한 물질(2,3-butanediol, acetoin)이 유도저항성뿐만 아니라 식물의 생장을 촉진시키는 작용을 한다는 것이 보고되면서 미생물 유래의 ISR 물질이 기존의 BTH가 가진 문제를 극복할 수 있는 대안이 될 수 있는 가능성을 보이고 있다. 유럽의 경우 독자적인 개발 기업들보다는 바이오농약을 유통 판매하는 기업들이 많으며, 이들은 Biological industry meeting을 매년 스위스에서 진행하면서 다양한 정보들을 교환하고 있다 특히, 유럽은 전 세계 어느 지역보다 바이오농약 개발에 많은 시간과 비용이 소요되는 지역으로 보통 6년~8년이 소요된다고 볼 수 있으며, 최근에는 독성에 대한 자료제출의 요구수준이 높아지고 있는 추세이다. 일본의 바이오농약 개발기업으로는 가켄사(기존 의약품생산시스템 구축)·아그로 가네쇼사·SDS사 등이 있으며, 가시적인 성과들을 만들고 있다. 특히, 가켄사의 경우 기존 항생제 생산 시스템에 대한 노하우로 인하여 성공적인 바이오농약 개발 모델을 만들고 있는 것으로 알려지고 있다. 또한, 일본은 바이오농약 규정에 따라 천적곤충에 대한 등록수가 많으며, 시장도 마찬가지로 이러한 맥락에서 증가하고 있는 것으로 알려져 있다. 중국의 경우 1996년부터 기존의 각성과 농민중심의 바이오농약 사용이 2001년부터 시작된 국가발전개혁위원회의 생물기술 산업화프로젝트 가운데 생물농약 산업화개발이 포함되어 있었다. 제1 생물농약 산업화 세부항목으로 진균제제 산업화가 채택되었으며, 지원액은 8,760만 위안이며, 길림연변춘뢰생물제품유한공사에서 담당하여 진행해 왔다. 생물농약산업화제품(연간 생산 1,000만 위안 이상)은 2001년에 13개가 되었다. (바이오농약-한국바이오협회 2010)

제 7 장 참고문헌

- Bravo A, Gill SS, Soberón M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
- Rees JS, Jarrett P, Ellar DJ. 2009. Peritrophic membrane contribution to Bt Cry delta-endotoxin susceptibility in Lepidoptera and the effect of Calcofluor. *J Invertebr Pathol* 100:139-146.
- Ding X, Luo Z, Xia L, Gao B, Sun Y, Zhang Y. 2008. Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. *Curr Microbiol.* 56: 442-446.
- Cai Y, Yan J, Hu X, Han B, Yuan Z. 2007. Improving the insecticidal activity against resistant *Culex quinquefasciatus* mosquitoes by expression of chitinase gene chiAC in *Bacillus sphaericus*. *Appl Environ Microbiol.* 73: 7744-7746.
- Thamthiankul S, Moar WJ, Miller ME, Panbangred W. 2004. Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65: 183-192.
- Lertcanawanichakul M, Wiwat C, Bhumiratana A, Dean DH. 2004. Expression of chitinase-encoding genes in *Bacillus thuringiensis* and toxicity of engineered *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* toward *Lymantria dispar* larvae. *Curr Microbiol.* 48: 175-181.
- Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, Bhatnagar RK. 2003. A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 307: 620-625.
- Hu SB, Liu P, Ding XZ, Yan L, Sun YJ, Zhang YM, Li WP, Xia LQ. 2009. Efficient constitutive expression of chitinase in the mother cell of *Bacillus thuringiensis* and its potential to enhance the toxicity of Cry1Ac protoxin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 82: 1157-1167.
- Chen SJ, Chen NT, Wang SH, Hsu JC, Ding WH, Kuo-Huang LL, Huang RN 2009. Insecticidal action of mammalian galectin-1 against diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Pest Manag Sci* 65: 923-930.
- Ohizumi Y, Gaidamashvili M, Ohwada S, Matsuda K, Kominami J, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J, Naganuma T, Ogawa T, Muramoto K. 2009. Mannose-Binding Lectin from Yam (*Dioscorea batatas*) Tubers with Insecticidal Properties against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Agric Food Chem.* 57: 2896-2902.
- Schumann W, 2007. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv Appl Microbiol* 62: 137-189.
- Agaisse H, Lereclus D, 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032.
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 44: 135-162.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R. 2006. Galectin-1: a small protein with major

functions. *Glycobiology* 16: 137R-157R.

- Pasek M, Boeggeman E, Ramakrishnan B, Qasba PK. 2010. Galectin-1 as a fusion partner for the production of soluble and folded human beta-1,4-galactosyltransferase-T7 in *E. coli*. *Biochem Biophys Res Commun.* 394: 679-684.
- Garcia-Fruitos E, Vazquez E, Diez-Gil C, Corchero JL, Seras-Franzoso J, Ratera I, Veciana J, Villaverde A. 2012 Bacterial inclusion bodies: making gold from waste. *Trends Biotechnol.* 30: 65-70.
- Wolfe AJ. 2005. The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69: 12-50.
- 그린바이오텍. 2007. 국내 미생물농약의 개발 동향.
- 한국바이오협회 보고서 - 바이오농약. 2010.

주 의

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