

극지유래 저온활성 Chitinase 생산균주의 스크리닝과 Chitinase 유전자 클로닝

박유경 · 김정은 · 이형석 · 김지현 · 박하주 · 김덕규 · 박미라 · 임정한 · 김일찬*

극지연구소 생명과학연구부

Characterization of a Chitinase Gene and Screening of Cold Active Chitinase from Polar Microorganisms

Yu Kyung Park, Jung Eun Kim, Hyoungseok Lee, Ji Hyun Kim, Ha Ju Park, Dockyu Kim,
Mira Park, Joung Han Yim, and Il-Chan Kim*

Division of Life Sciences, Korea Polar Research Institute (KOPRI), Songdo Techno Park, Incheon 406-840, Republic of Korea

(Received July 27, 2012 / Accepted November 5, 2012)

Of the 169 strains of microorganisms stored in Polar and Alpine Microbial Collection of Korea Polar Research Institute, 27 strains were selected for their chitinase activity on ZoBell plates supplemented with 0.4% colloidal chitin. Among them, PAMC 21693 strain have shown the highest chitinolytic enzyme activity toward pNP-(GlcNAc)₁ at low temperature and the highest growth rate at 4°C. We cloned a full-length chitinase gene of 2,857 bp which contains an open reading frame of 2,169 bp encoding 872-amino acid polypeptide. Recombinant chitinase protein was expressed in *E. coli* and its molecular weight was confirmed 96 kDa. In this paper, we suggest the potential use of cold-active chitinase from polar microorganisms in the field of biotechnology.

Keywords: chitinase, cold-active chitinase, iPCR, polar microorganisms, screening

Chitin은 N-acetylglucosamine (GlcNAc)의 β-1,4 결합의 polymer로 자연계에 풍부하게 존재하는 다당류(polysaccharide) 중 하나이다(Dutta *et al.*, 2004; El-Hamshary *et al.*, 2008). 이러한 chitin은 각종 갑각류의 외피, 곰팡이 등의 세포벽을 구성하는 성분이며, chitinase는 chitin을 가수분해하는 효소로서 박테리아나 곰팡이와 같은 생물에서 많이 발견되고 있는데, chitinase 생산 미생물들은 생물방제제로서의 활용가치가 높아 산업적으로 많이 이용되고 있다(Howard *et al.*, 2003).

Chitinase는 N-acetyl-1,4-glucosamine을 가수분해하여 chitooligosaccharide를 생산해내는 endochitinase (EC 3.2.1.14)와 chitin의 비환원성 말단으로부터 GlcNAc와 chitobiose를 생산해내는 exochitinase 등 두가지 형태가 존재하는 것으로 알려져 있다(Chernin *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001).

극한의 환경에서 적응, 진화해온 극지 생물들은 산업적·의학적 활용을 위해 신기능성 유전자원의 탐색을 위한 유용한 생물 소재로 각광받고 있다(Nichols *et al.*, 1999; Antranikian and Egorova, 2007; Huston, 2008). 본 연구에서는 극지연구소에서

보관중인 극지의 다양한 환경(토양, 해양, 담수 등) 유래의 시료에서 분리한 미생물들을 대상으로 다양한 스크리닝 방법을 통해 저온활성을 가진 chitinase 유전자를 생산하는 균주를 탐색하고 생육 적정온도를 확인, iPCR을 이용한 chitinase 유전자의 분리를 통해 유전적 다양성의 확보와 재조합 단백질을 통한 산업적 이용가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

Chitinase 생산 균주의 선별

Chitinase 생산균주의 배양을 위해 marine agar와 ZoBell (1 g yeast extract, 5 g/L peptone, 0.01 g/L FePO₄, 15 g agar, 750 ml sea water, 250 ml distilled water per L) 배지를 사용하였고, chitinase 활성 측정을 위해 0.4% colloidal chitin을 첨가하였다. 균주의 선별은 PAMC (Polar and Alpine Microbial Collection)에 기탁된 균주를 대상으로 chitin 첨가 배지에 배양하여 투명 환이 관찰되는 균주를 1차 분리하였다. 1차 선별을 위해 일정량의 세포 균체를 액체배지에 현탁하여 96 well microplate에 분주시켜 96-pin replicator (VP-408B, V&P scientific, USA)를 이용해 고체배지에 접종 후 7일간 관찰하였고, chitin 분해능은 콜로니

*For correspondence. E-mail: ickim@kopri.re.kr; Tel.: +82-32-260-6320; Fax: +82-32-260-6301

직경과 분해한 직경의 대비 값을 기준으로 평가하였다(Fig. 1). 고체배지상에서 선별된 균주는 효소활성 측정방법을 통해 2차 선별하였다. Chitinase의 활성측정은 p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (pNP-GlcNAc)을 이용한 측정법을 사용하였다. pNP-GlcNAc은 최종농도 0.1 mM이 되도록 사용하였고, 효소의 활성은 흡광도 400 nm에서 측정되었다(Park et al., 2009).

Chitinase 유전자 분리

균주의 chitinase 유전자는 iPCR (inverse PCR) 방법을 이용해 분리하였다(Ochman et al., 1988). Genomic DNA kit (Bioneer)를 이용한 DNA 추출 후, *Serratia marcescens*, *Alteromonas* sp., *Bacillus circulans*, *Aeromonas caviae*의 chi A 염기서열내에 보존된 프라이머(universal primer)인 CHI1-F와 CHI1-R을 이용해 chitinase 유전자의 일부 염기서열을 확보하였다(Ramaiah et al., 2000). 유전자 증폭을 위한 조건은 TaKaRa LA TagTM의 tag polymerase를 이용해 95°C 5분, 95°C 1분, 53°C 40초, 72°C 1분, 30 cycle로 수행되었다. Genomic DNA를 *Pst*I, *Hae*III, *Hha*I, *Nco*I, *Eco*RI를 사용하여 제한효소 처리 후 self-ligation을 거친 후 확보한 일부 염기서열을 바탕으로 내부의 프라이머를 제작 (Table 1), iPCR을 위한 primer를 이용해 stop codon을 포함한 full length chitinase 유전자를 분리하였다.

Chitinase 재조합 단백질 발현

단백질 발현을 위한 vector는 pEXP5-CT TOPO (Invitrogen)를 사용하였고, PCR 결과로 얻어진 정제된 2,619 bp 단편은 vector에 ligation된 후 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환되었다. 대장균으로 chitinase 유전자의 도입여부는 ampicillin 50 μ g/ml 첨가된 LB 배지에서 확인되었고, 형성된 클론들은 염기서열 분석 후 사용되었다. Chitinase 유전자가 들어간 클론은 단백질 발현을 위한 배양으로 ampicillin 50 μ g/ml이 첨가된 LB 액체 배지를 사용, 37°C에서 200 rpm으로 overnight culture 후 새로운 50 μ g/ml ampicillin이 첨가된 LB 액체 배지 50 ml에 1/100 양으로 접종해 OD 600 nm에서 0.7-0.8일 때 isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) 0.5와 1 mM을 각각 첨가하여 발현을 유도하였다. 재조합 단백질의 발현은 Western blot을 통해 확인되었다. 10% SDS polyacrylamide gel을 이용해 전기영동 시킨 단백질을 PVDF 막에 옮긴 후 5% skim milk로 blocking 시키고, Anti-His6 (1:1000, ab cam)와 Anti-Chicken IgG를 이용해 immunoblotting 시킨 후 LAS-3000 (Fuji, Japan)을 이용해 이미지를 확인하였다.

재조합 chitinase의 기질활성 측정

PAMC 21693 재조합 chitinase와 대조군으로 사용될 pEXP5-CT vector를 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환하여 콜로니를 확인하였다. 콜로니를 LB broth (ampicillin 50 μ g/ml)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양 후, 동일배지 500 ml에 배양액이 1%가 되도록 집중하고 흡광도 OD 600에서 0.6이 될 때까지 200 rpm으로 배양하였다. IPTG를 0.5 mM이 되도록 첨가하여 25°C, 200 rpm으로 12시간 배양하고, 배양액을 원심분리하여 얻은 배양균체를 초음파 파쇄 후, 다시 원심분리하여 상등액을 chitinolytic

Table 1. PCR primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Position
CHI1-F	GATATCGACTGGGAGTTCCC	1096-1115
CHI1-R	CATAGAAGTCGTAGGTCATC	1329-1348
K21693-F1	CTACGCGCTATGCTTGAT	1192-1209
K21693-R1	ATCGCCAATGTCAGGATT	1132-1149
K21693-F2	AAGCCGCAAGCCAGTAT	1285-1301
K21693-R2	TGGGCCATCGTTGATT	1152-1167
K21693-F3	ACTGGGAATTCACAGGT	1103-1119
K21693-R3	AACGTCCAACCACCTACA	978-995
K21693-F4	TAGTAAATGAAGGCACGCT	428-446
K21693-R4	ACCACTCCATGCACTCCA	370-387
K21693-F5	CTGGCTAAGGGTGCATATGT	1821-1840
K21693-R5	TCCCTCGTAATAGCCGTTAACA	2869-2890
K21693-R6	TCATCTGTAGTTGTGTTGTTT	2646-2667
K21693-R8	CCATACATCGGTTGAACCAG	2777-2796
K21693-full	ATGAATATTAATAAACCGCAG	181-205

activity 측정에 사용하였다. Vector control과 세포배양 상등액을 대조군으로 사용하였다. Enzyme solution 400 μ l (8.5 mg/ml), 기질 pNP-n (n=1,2,3) 0.1 mM, 50 mM sodium phosphate buffer를 혼합하여 총 1 ml에서 반응하였다. 25°C, 2시간 반응 후, 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Chitinase 생산 균주의 선별을 위해, PAMC에 보관중인 169개 균주들을 대상으로 chitin 분해능을 확인하였다. 0.4% colloidal chitin이 첨가된 고체 배지에 일정한 균체량을 접종 후 25°C에서 7일간 배양해 투명 환이 형성되는 정도를 관찰하여 콜로니 대비

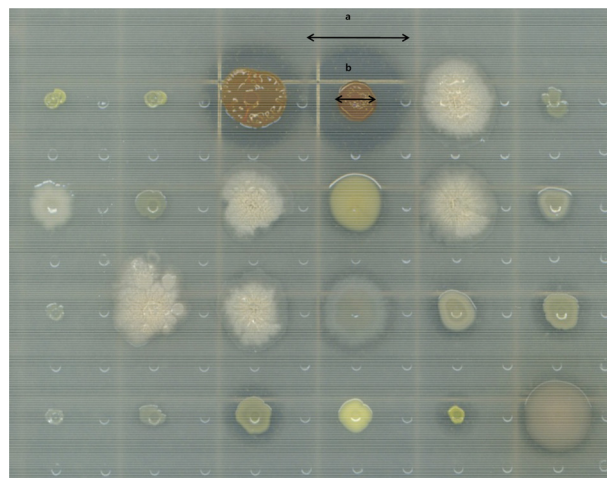


Fig. 1. The shape of a hydrolytic clear zone on a 0.4% colloidal chitin plate. The 0.1 \times ZoBell agar plate supplemented with 0.4% colloidal chitin was incubated at 25°C for 120 h. The figure shows a standard of chitinase activity percentage (a - b/a x 100) in chitin plate.

Table 2. Selection of chitinase-producing bacteria. Chitinolytic activity was selected for the colloidal chitin plate and pNP-GlcNAc

PAMC No.	Identification	Activity at colloidal chitin plate (%)	Activity by using substrate (30°C, U/mg protein)	Relative activity (4°C, %)
21693	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	52.63	0.64	92
22688	<i>Paenibacillus</i> sp.	36.36	0.03	N.D.
22701	<i>Paenibacillus</i> sp.	45.46	0.03	N.D.
22718	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>	38.46	21.8	20
22723	<i>Bacillus thuringiensis</i>	30.77	1.01	0.7
24812	<i>Actinotalea fermentans</i>	58.82	0.02	N.D.

Colloidal chitin plate – (halo diameter – colony diameter)/ halo diameter × 100, N.D., Not determined

Table 3. Chitinolytic activities of recombinant chitinase from *Pseudoalteromonas* sp. PAMC 21693

Substrate	Control	PAMC 21693	Culture soup
pNP-GlcNAc	7.97 ± 0.07	11.94 ± 0.03	N.D.
pNP-(GlcNAc) ₂	0.16 ± 0.14	10.72 ± 0.22	N.D.
pNP-(GlcNAc) ₃	0.01 ± 0.01	56.96 ± 0.25	N.D.

pNP-GlcNAc, 4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glycosaminide; pNP-(GlcNAc)₂, 4-nitrophenyl N, N''-diacetyl-β-D-chitobioside; pNP-(GlcNAc)₃, 4-nitrophenyl-β-D-N, N''-triacetylchitotriose; Control, vector pEXP5-CT.

환의 직경을 측정해 백분율로 나타낸 수치를 비교하여 30% 이상의 활성도를 보인 27개의 균주를 1차 선별하였다(Fig. 1). 27개의 균주는 pNP-(GlcNAc)₁을 이용하여 기질활성이 측정되었고, 활성을 보인 균주 6개를 선별하였다. 6개 균주는 저온 chitinase 활성 균주를 선별하기 위해 4°C와 30°C에서 각각 pNP-(GlcNAc)₁를 이용하여 기질활성을 확인, 30°C에서의 활성측정과 비교해 4°C에서의 활성을 백분율로 나타내었다. 온도에 따른 균주의 활성을 비교한 결과 PAMC 21693, PAMC 22718, PAMC 22723이 4°C 저온에서 활성을 보였다. 이 중 PAMC 21693이 92%의 가장 높은 활성을 보여 저온활성 균주로 선별되었다(Table 2).

최종 선별 균주 PAMC 21693의 최적성장 온도를 확인하기 위해 다양한 온도(4°C, 15°C, 25°C, 37°C)에 따라 8일간 생장의

차이를 측정 후 비교하였다. 두 번의 반복실험을 통해 배양 2일째에 4–25°C에서의 생장의 차이를 보이기 시작해 3일째 두드러진 차이를 보이는 것을 확인하였다(Fig. 2). 배양 초기 2일째까지는, 15°C, 25°C와 비교하여 4°C에서의 성장속도가 다소 느렸지만, 배양시간이 경과함에 따라, 시간당 PAMC 21693의 성장률은 실험된 온도 중 4°C에서 가장 높게 나타났다. 37°C에서는 균주가 거의 자라지 않았다.

저온적응성 PAMC 21693 균주의 chitinase 유전자는 iPCR 방법에 의해 15개의 프라이머를 이용하여 5' UTR의 180개, 3' UTR의 58개와 ORF 2,619 bp를 포함해 총 2,857 bp의 염기서열을 확인하였다(Fig. 3). NCBI의 Blast X를 통한 분석 결과 PAMC 21693 chitinase 유전자는 *Pseudoalteromonas* sp. (SM9913)에 속하는 chitinase C와 95% 유사성을 보였다. PAMC 21693 chitinase 유전자 서열은 GenBank (accession number KC020711)에 등록하였다.

Chitinase 재조합 단백질 발현을 위해 pEXP5-CT TOPO vector에 클로닝 후 대장균 BL21 (DE3)에 형질 전환시켰다. Chitinase 재조합 단백질 발현을 위한 적정 IPTG 농도는 0.5 mM이었다. 발현된 단백질 발현은 Western blotting을 통해 확인한 결과 약 96 kDa에서 단백질이 발현되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 단백질 크기는 이미 보고된 다른 종들과 비교했을 때 발현된 단백질 사이의 크기에는 큰 차이를 보이지 않았다(Techkarnjanaruk and Goodman, 1999).

재조합 chitinase의 기질에 대한 활성 측정 결과, pNP-GlcNAc에 대해서는, 대조군(vector control)에 비해 낮은 기질활성을 보인 반면, pNP-(GlcNAc)₃에 대해 가장 높은 활성을 나타냈다(Table 3). 세포 상등액에서는 각 기질에 대해 모두 활성을 보이지 않았다.

극지연구소에서는 극지의 토양, 해수, 담수 등의 환경 시료로부터 곰팡이, 지의류, 박테리아 등을 분리하여 극지 생물의 생명 현상 규명과 유용생물 소재 탐색을 목적으로 하는 생물학적 연

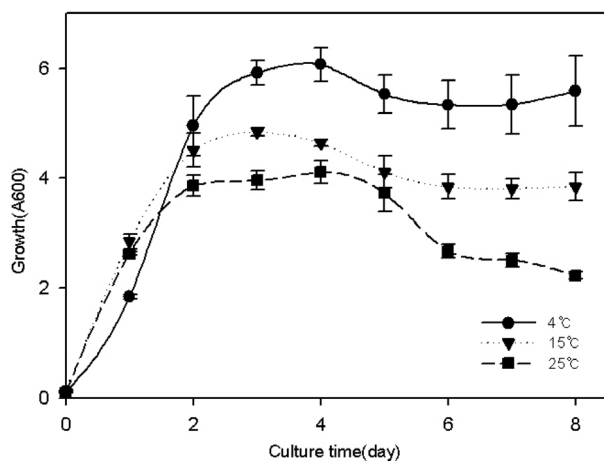


Fig. 2. Effects of temperatures on PAMC 21693 growth. At appropriate time intervals during 8 days culture, the growth was determined by measuring the OD_{660 nm} value at various temperatures.

구를 위한 기반으로 culture collection (PAMC)을 운영해 데이터베이스를 구축·활용하고 있다. 본 연구의 목적은 유용한 미생물의 탐색과 유용 유전자의 확보를 위해 새로운 chitinase를 생산해내는 균주와 유전자를 확보하고자 하는 것이다. 사용된 균주

```

GGGGGGCGGAATGGGGCCCTTAGATGCATGCTCGAGCGGGCCGAGTGTGGATATC 60
TGCAGAAATTCGCCCTTAAGCCGCAAGCCAGTATGGAAAAACAGTAACTAAAAGCCTAAG 120
TTTGTAGTCAAACCTTAAACCAAATAATGACATTAATAATAGATAAGAGAGAAAT 180
ATGAATATTAATAAATTAACCGCAGCTATGGGTGTTGCACTATTTGCTGGTTCAATCG 240
M N I K K L T A A M G V A L F A G S V S
CGAGCGCCCTCTACACCAAGCATTAATGGGAACACAGCAATATTCGTTCTGTTAGATG 300
A A P S T P S I N W E P Q Q Y S F V E V
GATCTTGAGGGAAACGGCTCTTAAAGCAGTATGTTACCCGTTGAGCAAGTTAATAC 360
D L E G N G S Y K Q L V T R V E Q V N I
AACATTGAGTGGAGTGCATGGAGTGGTGGTGGCGATAGCTACAAAGTTACTTTGAT 420
N I E W S A W S G D G G D S Y K V Y F D
GACATGCTAGTAAATGAAGCAGCGTTCGTCAGGTTCTAAAGGTGGCACTATTTCATT 480
D M L V N E G T L A A G S K G G T I S F
CCTATGACAAAGCGGGCCCAATACAATGATGTTGAGCTATGTAAGCGGCGACA 540
P Y D K A G R H T M Y V E L C E G G T T
TGTGACCGAGCCGAGCAACCGATGTTATGCTGACACCGGCGGACACCTAGCA 600
C A R S A G K P I V I A D T D G G H L A
CCATTACCTATGGATGTTGACCCAAATAACCGTATATGGTATTAAGCAAGGTTAGTA 660
P L P M D V D P N N R D I G I K Q G L V
ACAGCGCTTACTTTGTTGATGGGATTTATGGTCTGATACGATTAACATATG 720
T G A ☐ F V E W G I Y G R D Y D V N T M
CCAGCAAAAACCTGAGTCATATTTTCTGATGCTTTATCCAATTTGTTGTAAGAACGG 780
P A Q N L S H I L Y G ☐ I P I C G E N A
TCGTTATCGGGTGGCTTAAACGTCAGCTTGAACCGGCTTGCGCCGCTCTGCTGATTAC 840
S L S G G P K R L L E T A C A G S A D Y
GAAGTGGTATTCACGCCCATGGCCGCGGTGCAAAAAGCACTGCGAGGGGTTGATGCA 900
E V V I H D P W A A V Q K A L P F V D A
AAAGCCCATCCGCGGTAATCTCTACAGCTATGCGCCCTTAACAGCGTTACCCAGAT 960
K D P I R G T Y T S Q L M A L K Q R Y P
ATTAATAATTTACCATCTGAGTGGTGGGAGCTTACAGACCCATTGGTGGCTTTACC 1020
I K I L P S V G G W T L S D P F G G F T
AATAAAGCTAACCGCGACACCTTTGTAGCTTCAATGGAAGATTTTAAAGAACATGGAAA 1080
N K A N R D T F V A S M E E F L R T W K
TTCTATGACCGTGTAGATATTGACTGGGAATCCAGGTGGTACGCGCCCAATCCCTGAC 1140
F Y D G V ☐ I ☐ W ☐ F P G G D G P N P D
ATTGGCGATCCAATCAACGATGGCCAGCCTATGTTGATTAAGCAAGCACTGCGCCG 1200
I G D P I N D G P A Y V A L M Q E L R A
ATGCTTGATAAACCCTGAAGCAGAAACCGGTCGTACTTACGAGTTAAGCTCAGCTATAG 1260
M L D K L E A E T G R T Y E L S S A I G
CGAGTTACGATAAATGAAGATGTAGATTACCAAGCCGCAAGCCAGTATATGATATC 1320
A G Y K A M E G A A Y Q T G I N Q F M D V
ATTTTGGCCATGACCTTACTTTTATCGCCATGAGTAAAGTAAAGCGGACCAAAACA 1380
I F A ☐ T ☐ F Y G A W S N V T G H W T
GCATTTACTTGGCGAATATGAGTGTGGTCAATGTAATGGTACCGGGCTTGGATGAA 1440
A L Y C G E H M S V G C N G T G L D E
AATGGTAACCTCGTAAAGCCCTGCTTATACCAGCATAATGCAAGTGCAGTGTACTT 1500
N G E P R K G P A Y T T D N A V Q L L H
CGCAAAATGACCAATCGAAAAAATCGTCTGGGACAGCTATGTAAGCGGCTGGTGG 1560
A Q N V P S K K I I V V G T A M Y G R G W
GAAGTGTCTACCCGCAAAATGACGCAATGATGGTAAACCAATGACCCGCGCTGTAAT 1620
E G V Y P Q N A A I D G N P M T A P G N
GGCCCAATAAAGGCTCTACCGCACAAGGAGTATGGGAAGTGGTGTATTGATTAACA 1680
G P L K G S T A C G G V W E D G V I D ☐ K
GGCTTAAAGCAAAATGATGTTGTCGGCGGGCAGCGGTTAATAGTTTGAAGTGGGT 1740
G V K T K T E D V D T V T V A N Q F M D V
TATGATGAGCAAGCGCAAGCGCTTATGATAGTATGCTGCTCAACCGGTAACATTAAT 1800
Y D E Q A Q A A A V V W N R S T G K L I T
TATGATAGCCGTAAGTCAAGTACCTGAGTAAAGGTCGCTGATTAATCAGTATAATTTAG 1860
Y D S R K S V L A K G A Y V N Q Y N L G
GGTTATTTGATGCGGAAATAGCTGATGATGTTTAAATGCTATGATGATGATGATG 1920
G L F A ☐ E I D A D N G D I L N A M H D
GGTTAGAGGGGGGAGTTCCTCCGCCAACAAATAAAAGCCAGTGTGTTTCAGTACTGCA 1980
G L G G G V A A P P T N K K P V V S V S A
TCTGATCTGTTAATTCAGCGAGAGTATCACATGACACGCTTCTGCAACCGATGACAG 2040
S V S V N S G E S I T V T A S A T D A T
AACGATCCACTTAGCTTTCAGTGGAGTGTGATAACGCACTGGTAGTATCTGGACAAA 2100
N D P L S F S F S S A D N A L V S G Q N
AGCGCATCATGATATTCAGCGCCACAGCTACTGCGATACAGTATGTTGGCAACC 2160
P A S L V I T A P V T A R D T Q Y V A T
GTTGGGATCCGAGCGTCAAGCAACCGTATACGCGATGTTGTTTAAATGTTATGGC 2220
V A V S D G Q A T V N R D V V N V N V I A
CCAGCATCAGTGGTAAACACAGCAGCAAGCGTGTGCTATCGCTAATATATAGCGTT 2280
P A S G E N T A P S V D A I A N I S V
GAAGAAGTGCATCAGCAAGTGTGCTGTAGTACCAATGATGCTCAAACAGATGCTT 2340
E E G A S A S A V A V A N D A Q N D M L
ACATATACGTGGACAGTACCAGTGGCTTAACTATGATGAGCAGCGGTGCAATGTA 2400
T Y T W T V P A G I L T L V S S G A N V T
TTTGAGCGCGGCTGTAGATGCGGATACAACTTCAAGTGTCTGTTGCAAGTATGAT 2460
F E A G A V D A D T N F T V S V A V S D
GGTGCATTAACCAACAGCAAGCTTTAGCGTAAACAGTTACAAACCTGTATACCAACT 2520
G A L T T A G T S F S V T T V T T
GAGCCTACAGAGGTTGGATGAGAGTGTGCTACAGTGTGATGTTGATGATGATTA 2580
E P T D E S V A V D G D Q Y V V T
AAAGCGGTTGAATATAAAGCAAAAGTGGTGGACTCAGGCGAAGCTGCTGATTAGTAGT 2640
N G V E Y K A K W W T Q G E R P D L G S
ECATGGGAAACAACCAACCTACAGATGACACAGCGGCTGCAAGTATGGCAGCCATCGCA 2700
A W E T T Q P T D D T G A A V W Q P S A
ATTTATAAGCTGGTGTGAAGTCTCTTATCAAGGTAATAAATATCAAGCTAAATGG 2760
I Y N S G D E V S Y Q G N K Y Q A K W W
ACTCAAGGAAACGAGCGTGGTCAACCGATGATGGTAGCACTTTAATGTAACCTGAT 2820
T Q G N E P G S T D V W
ATTGGTTTTACAAAATGTTAATGCAAAAGCAGCT 2857
    
```

Fig. 3. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the 96 kDa protein from PAMC 21693. The start codon and stop codon are marked bold. Chitinase N-terminus domain is underlined. The GH18 (glycosyl hydrolases, family 18) type II chitinases are shown in a gray box. Chitin/cellulose binding domain is marked box.

들은 킹조지섬에 위치한 남극 세종기지 주변의 Barton Peninsula와 Weaver Peninsula 일대, 북극해에 위치한 바렌츠해와 카라해 등지에서 채취된 모래 및 바닷물 시료에서 분리되었다. 그 결과 1차적으로 PAMC에 보관중인 169개의 균주를 이용, 27개의 균주를 선별하였다. 27개의 균주 중 기질에 대한 반응성이 우수한 6개의 균주를 2차 선별하였고, 이 중 저온에서 높은 활성을 보이는 균주로 PAMC 21693을 최종 선별하였다. PAMC 21693의 생육 최적온도를 확인한 결과 37°C에서는 균주의 성장이 거의 이루어지지 않았고, 측정된 온도 중 가장 낮은 온도인 4°C에서 최고의 성장률을 보였다.

PAMC 21693으로부터 분리된 chitinase 유전자의 ORF는 약 2,619 bp였다. Chitinase는 아미노산 서열에 따라 두 개의 family (family 18과 family 19)로 나눌 수 있다. 염기서열 상에 catalytic domain을 가지는 family 18과 bilobal structure와 alpha-helice를 가지는 family 19로 구분된다(Kaomek et al., 2003; Seidl et al., 2005). PAMC 21693은 chitinase 활성을 위해 필수적인 부분으로 알려진 catalytic domain을 아미노산 서열상의 306-310번째에 갖고 있는 family 18에 속하는 것으로 추정된다(Techkarnjanaruk and Goodman, 1999). Watanabe 등 (1993)은 *Bacillus circulans* WL-12 균주를 이용해 catalytic domain의 Asp-200과 Glu-204 부분에 돌연변이를 유발하여 이러한 아미노산 부분이 chitinase 발현에 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 chitinase 유전자 발현에 있어 Glu와 Asp는 중요한 역할을 담당하고 있고, 특히 Glu는 필수적인 요소였다. 이러한 Asp와 Glu는 prokaryotic chitinase 뿐만 아니라 식물이나 효모에서도 중요한 부분으로 알려져 있다 (Watanabe et al., 1993) (Fig. 4). N-terminal 부분의 chitin binding domain은 catalytic domain과 달리 한 생물체 내에서 만들어지는 chitinase 발현유전자의 염기서열 사이에는 유사성을 보이지만 종간에는 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(Svitil and Kirchman, 1998). PAMC 21693에서 분리된 chitinase 유전자를 이용한 재조합 단백질 발현 결과 약 96 kDa의 단백질을 확인할 수 있었다. PAMC 21693은 저온에서 생육이 크게 이루어지는 균주로 분리된 chitinase 발현유전자와 발현단백질, 저온활성 chitinase의 다양한 연구는 앞으로도 계속적으로 이루어져야 할 과제이다.

본 연구는 극지의 저온 환경에서 적응해 살아가는 미생물들을, 저온 활성의 효소를 탐색하고 다양한 유전자원을 확보함으로써 생물공학 분야에서의 활용가능성을 제시하고자 하였다. 또한 추가적으로 잠재 가능성이 있는 다양한 유전자원을 발굴, 이용하는 데 있어서 하나의 가능성을 제시하는데 그 의의가 있다.

적 요

극지의 다양한 환경으로부터 분리되어 극지연구소 PAMC (Polar and Alpine Microbial Collection)에 보관중인 169개 균주들을 0.4% colloidal chitin이 첨가된 ZoBell 고체배지에서 배양하여 chitinase 활성을 균주 27개를 선별하였다. 그 중 PAMC 21693 균주는 저온에서 pNP-(GlcNAc)₁를 기질로 사용했을 때 가장 큰 활성을 보였고, 4-37°C의 온도 범위 중 4°C에서 가장 높은 개체수 증가율을 보였다. PAMC 21693의 chitinase 유전자를

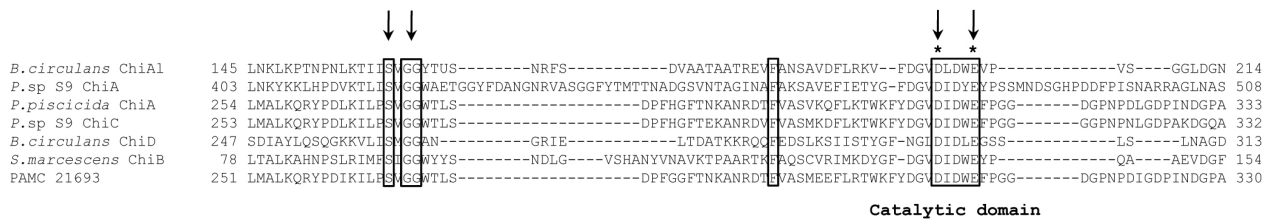


Fig. 4. Comparison of putative catalytic domains in bacteria. Alignment of family 18 catalytic domains of PAMC 21693, *B. circulans* chiA1 (AAA81528), *Pseudoalteromonas* sp. S9 chiA (AAC79665), *P. piscicida* chiA (BAB79620), *Pseudoalteromonas* sp. S9 chiC (AAC79667), *B. circulans* chiD (BAA34114), *S. marcescens* chiB (P11797). Arrows indicate the four residues as being conserved region; *, residue necessary for activity.

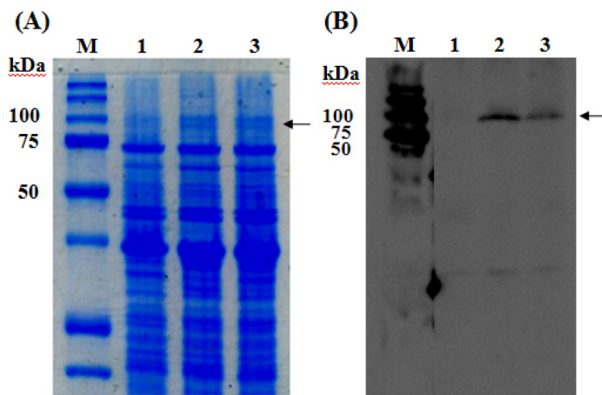


Fig. 5. Localization of the recombinant chitinase gene protein. (A) SDS-PAGE of purified recombinant *P. translucida* chitinase protein (staining, coomassie solution). (B) Immunoblot analysis of the recombinant protein. Lanes: M, protein molecular weight marker; 1, uninduced vector without recombinant protein; 2, chitinase extract induced with 0.5 mM IPTG; 3, chitinase extract induced with 1 mM IPTG.

클로닝한 결과 2,619 bp의 ORF를 포함하는 총 2,857 bp의 염기 서열을 확보하였다. 대장균에서 chitinase 유전자의 재조합 단백질을 발현한 결과 분자량 96 kDa의 재조합 단백질을 확인할 수 있었다. 본 논문에서는 극지 미생물 유래 저온활성 chitinase들의 생물공학 분야에서의 이용가능성을 제시하였다.

감사의 말

본 논문은 2012년 극지연구소 기본연구사업(PE12040) 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

Antranikian, G. and Egorova, K. 2007. Extremophiles, a unique resource of biocatalysts for industrial biotechnology, pp. 361–406. In Gerday, C. and Glansdorff, N. (eds.), Physiology and biochemistry of extremophiles. ASM Press, Washington, D.C., USA.

Chemin, L.S., Winson, M.K., Thompson, J.M., Haran, S., Bycroft, B.W., Chet, I., Williams, P., and Stewart, G.S.A.B. 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: a substrate analysis and regulation by quorum sensing. *J. Bacteriol.* **180**, 4435–4441.

Dutta, P.K., Dutta, J., and Tripathi, V.S. 2004. Chitin and chitosan:

Chemistry, properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* **63**, 20–31.

El-Hamshary, O.I.M., Salem, H.H., and Soliman, N.A. 2008. Molecular screening of chitinase gene in *Bacillus* sp. *Appl. Sci. Res.* **4**, 1118–1123.

Howard, M.B., Ekborg, N.A., Weiner, R.M., and Hutcheson, S.W. 2003. Detection and characterization of chitinases and other chitin-modifying enzymes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 627–635.

Huston, A.L. 2008. Biotechnological aspects of cold-adapted enzymes, pp. 347–363. In Margesin, R. (ed.), Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

Kaomek, M., Mizuno, K., Fujimura, T., Sriyotha, P., and Cairns, J.R. 2003. Cloning, expression, and characterization of an antifungal chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 667–676.

Nichols, D., Bowman, J., Sanderson, K., Nichols, C.M., Lewis, T., McMeekin, T., and Nichols, P.D. 1999. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 240–246.

Ochman, H., Gerber, A.S., and Hartl, D.L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621–623.

Park, H.J., Kim, D., Kim, I.H., Lee, C.E., Kim, I.C., Kim, J.Y., Kim, S.J., Lee, H.K., and Yim, J.H. 2009. Characteristics of cold-adaptive endochitinase from Antarctic bacterium *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702. *Enzyme Microbiol. Technol.* **45**, 391–396.

Ramaiah, N., Hill, R.T., Chun, J., Ravel, J., Matte, M.H., Straube, W.L., and Colwell, R.R. 2000. Use of a chiA probe for detection of chitinase genes in bacteria from the Chesapeake Bay. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**, 63–71.

Seidl, V., Huemer, B., Seiboth, B., and Kubicek, C.P. 2005. A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J.* **272**, 5923–5939.

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. *Microbiology* **144**(Pt 5), 1299–1308.

Techkarnjanaruk, S. and Goodman, A.E. 1999. Multiple genes involved in chitin degradation from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain S91. *Microbiology* **145**, 925–934.

Wang, S., Moyne, A., Thottappilly, G., Wu, S., Locy, R.D., and Singh, N.K. 2001. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme Microbiol. Technol.* **28**, 492–498.

Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M., and Tanaka, H. 1993. Identification of glutamic acid 204 and aspartic acid 200 in chitinase A1 of *Bacillus circulans* WL-12 as essential residues for chitinase activity. *J. Biol. Chem.* **268**, 18567–18572.