

해양세균 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 β -Agarase의 특성

¹김 봉 조 · 황 선 희 · 김 학 주 · ²강 양 순 · 하 순 득 · †공 재 열

¹부경대학교 해양식량자원개발 특성화사업단 박사후 연구원,

부경대학교 생물공학과, ²국립수산진흥원 동해연구소

(접수 : 1998. 11. 25., 게재승인 : 1999. 2. 25.)

Characteristics of β -Agarase Produced by Marine Bacterium *Bacillus cereus* ASK202

Bong-Jo Kim¹, Sun-Hee Hwang, Hak-Ju Kim, Yang-Soon Kang², Soon-Duck Ha, and Jai-Yul Kong[†]

¹Pukyong National University, Sea Food & Marine Bioresources Development Center

Dept. of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University

²NFRDI, East Sea Fisheries Research Institute

(Received : 1998. 11. 25., Accepted : 1999. 2. 25.)

Marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202 produced an extracellular agarase (E.C.3.2.1.81) which showed a high level of enzyme activity in the presence of agar and agarose. In the optimal culture conditions, the agarase production increased 7.7 folds compared with the one obtained from the basal medium. Agarase production reached upto 160 units/L after 24h of cultivation in a modified marine medium at 25°C. The degree of purification increased 31.5 folds with 27.8% yield through freeze drying, DEAE Sepharose CL-6B and Superose 6HR 10/30 column chromatography. The molecular weight of the purified agarase was determined to be 90,000 daltons by gel-permeation filtration. Optimal temperature and pH for the enzyme activity were 40°C and 7.8, respectively. The enzyme was stable up to 50°C and at a broad pH range of 5.0-10.0. The β -agarase was activated by Zn(NO₃)₂ and was inhibited by CuSO₄ and SnCl₂. The K_m and V_{max} values of this enzyme for agarose as a substrate was 2.4mg/ml and 13.6 mg/ml, respectively.

Key Words : agarase, gel-permeation filtration, modified marine medium

서 론

우리 나라 연안에는 다양한 종류의 해조류가 풍부하게 존재하고 있으며, 그 종류는 약 1천종이 넘는 것으로 추정되고 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면 남조류 50여종, 녹조류 80여종, 갈조류 130여종, 홍조류 355여종 등 약 620여종이 알려져 있으며, 그 생산량에 있어서는 국내 총수산물 생산량의 약 18%를 차지하고 있다(1). 그러나, 이들 해조류는 예로부터 식용, 사료, 비료 및 해조공업의 원료 등으로 널리 이용되고는 있으나, 그 채취에 많은 인력이 요구되고 용도 면에 있어서도 자연 채취상태 또는 단순가공을 거친 후 값싼 원료상태로 판매되고 있기 때문에 그 부가가치가 매우 낮은 실정이다. 특히, 최근 들어 급속히 진행되고 있는 해양오염 및 이로 인한 생태

계의 파괴 등은 지금까지의 해조류에 대한 이용 한계성을 더욱 가속화시키고 있다. 이에 풍부한 국내 수산자원 입에도 불구하고 부가가치가 낮은 해조류에 대하여 이를 이용한 새로운 용도 및 부가가치 향상을 위한 연구개발이 크게 요구되고 있다(2, 3). 특히 해조류로부터 생산되는 올리고당의 경우 그 가능성이 조금씩 밝혀짐(4)에 따라 고부가가치 식품소재로서의 이용 및 새로운 제품개발이 크게 기대되고 있으며, 국내 해조류 생산량의 18%를 차지하는 한천에 대해서도 올리고당과 같은 기능성 소재개발에 관한 연구가 이루어진다면 국내 수산자원의 이용한계성을 극복하고, 고부가가치 창출은 물론이며 관련산업에 미치는 파급효과 등, 학문적으로나 산업적으로 큰 의의를 지닌다고 할 수 있을 것이다

따라서 한천을 이용하여 기능성 한천올리고당을 생산하기 위해서는 한천분해능을 지닌 한천분해효소(agarase)의 생산이 우선적으로 연구되어야하며 지금까지 보고된 한천분해효소는 미생물을 중심으로 한천분해효소의 생산에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다(5). Morrice 등은 *Pseudomonas atlantica*로부터 2종류의 agarase를 발견하였고(6), Aoki 등은 *Vibrio* sp. AP-2로부터 neoagarbiose를 생산하는 agarase를 발견하는 등

† Corresponding Author ; Dept. of Biotech & Bioeng., Pukyong National University, 599-1, Deayeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea
Tel & Fax : +82-51-620-6181
e-mail : kongjy@dolphin.pknu.ac.kr

(7), 현재까지 한천을 분해하는 효소는 bacteria, actinomycetes(8) 등에서 많이 연구되었으며, 특히 *Pseudomonas* sp.를 대상으로 많은 연구가 수행되어져 왔다(2, 3, 6).

본 연구진은 이미 지금까지 보고되어지지 않은 우수한 한천분해능을 지닌 해양미생물 *Bacillus cereus* ASK202를 분리·동정한 바 있으며(9), 본 연구에서는 이 균주가 생산하는 β -agarase를 분리·정제하여 그 특성을 연구하고자 한다

재료 및 방법

실험재료

한천분해효소의 분리·정제에 사용된 Sepharose CL-6B와 Sephadex G-100 matrix 그리고 Superose 6HR 10/30 column 은 Pharmacia Co.(Uppsala, Sweden)로부터 구입하였으며, 분자량 표준품은 Promega Co (Madison, USA)의 Mid-range protein molecular weight markers (MW 97,400~14,400 Da)를 사용하였다

발효조 배양

발효조 배양으로는 5L Jar Fermentor (Korea Fermentor Co, KF 500)를 사용하여 batch fermentation을 행하였다. 최대 효소생산 조건을 얻기 위한 발효배양 조건으로는 온도 25°C, 초기 pH 8.0, 교반속도 150~600rpm, 통기량 0.5~4.0 vvm으로 증류수 1L당 KCl 0.7g, MgCl₂·6H₂O 10.6g, CaCl₂ 11g, Na₂SO₄ 3.9g, NaHCO₃ 0.2g, (NH₄)₂SO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 0.01g, Tris-base 6.05g/pH 7.8의 인공해수에 Agar 0.3g, yeast extract 0.2g, NH₄NO₃ 0.1g, NaCl 50g이 첨가된 modified marine medium을 이용하여 발효조 배양을 실시하였다. 그리고 시간별 효소생산량을 조사하기 위해 3시간 마다 50ml 씩 시료를 채취하였다.

단백질의 정량

배양액중의 단백질량은 UV spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Co., Sweden)를 이용한 280 nm에서의 흡광도 측정과 Bradford method에 의해 구하였으며, 표준물질로는 Bovine serum albumin (Boehringer Mannheim Co., Germany)를 사용하였다(10).

효소활성 측정

한천분해효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogyi-Nelson법(11)으로 행하였다 0.1%(w/v)의 agarose가 포함된 기질용액 (10mM Na-phosphate buffer, pH 7.5)을 중탕가열하고, 40°C 까지 서서히 냉각시킨 후에 조효소용액을 첨가하여 30분간 반응시켰다 그리고, 효소반응을 정지시키기 위해 효소반응액에 Somogyi시약 (Na₂HPO₄·12H₂O 71g, C₄H₄O₆KNa·4H₂O 40g, 1N NaOH 100ml, 10% CuSO₄ 80ml, Na₂SO₄ 180g / D.W 1L)을 첨가하여 10분간 끓인 후, 실온으로 냉각시켜 arsenomolybdate 시약을 첨가하고, 12,000rpm에서 2분간 원심분리한 상층액의 흡광도를 510nm에서 측정하였다 이때, 한천분해효소의 활성은 1분당 1nmol의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit로 정의하였으며, 표준적정곡선으로 galactose를 사용하였다

$$\text{Total units} = \frac{\text{반응 후 생성된 총환원당량 (units)} - \text{반응 전 배지 자체에 포함된 환원당량 (units)}}{\text{효소반응시간 (min)}}$$

효소의 분리 및 정제

해양세균 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 균배양액을 고속냉동 원심분리기로 8,000 rpm, 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양 상층액을 회수하여 4°C에서 동결건조하였다. 동결건조된 시료는 소량의 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.8)에 녹인 후, 동일한 완충용액을 사용하여 24시간 투석하였다 투석된 효소를 분리하기 위해서 음이온 교환수지인 DEAE Sepharose CL-6B column (25×300mm, Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 이용하여 투석된 효소를 완전히 흡착시킨 후 다시 동일 완충용액으로 세척한 후 NaCl를 사용하여 0.0-1.0 M 까지 gradient를 주면서 NaCl 농도의 증가에 따라 효소를 용출시켰다. 용출된 각각의 fraction은 7 ml/tube로 분획하였으며, 각각의 분획된 tube에 대해서는 단백질량과 효소의 활성을 측정하였다. 활성이 있는 분획은 회수하여 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.8)로 투석한 후, 투석한 효소를 농축하기 위해 다시 동결건조를 행하였다 또한, 동결건조된 효소는 회수하여 HPLC를 이용한 gel filtration chromatography인 Superose 6HR 10/30 column를 이용하여 한천분해효소를 분리·정제하였다(12).

최적 온도 및 안정성

효소활성의 최적온도는 정제된 효소 (0.25 unit/ml) 용액을 0.1%의 agarose 용액 13 ml에 첨가하여 20~60°C까지 온도를 변화시키면서 40분간 반응시킨 다음 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하였다. 온도 안정성은 효소용액을 각 온도에서 일정시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 측정함으로써 확인하였다

최적 pH 및 안정성

기질을 포함하는 서로 다른 pH의 완충용액에 정제된 효소를 첨가하여 40°C에서 40분간 반응시킨 후 효소활성에 미치는 pH의 영향을 측정하였다 또한, 서로 다른 pH의 완충 용액에 0.1% agarose를 녹인 기질용액 1.3 mL에 정제된 효소(0.25 unit/ml) 용액을 첨가하여 일정온도에서 일정시간 방치한 후 잔존효소의 활성을 측정함으로써 그 안정성을 확인하였다.

결과 및 고찰

발효조 배양

최적조건으로 확인된 교반속도 150 rpm, 통기량 2 vvm, 점중량 1%(v/v), 한천기질농도 0.3%(w/v), pH 8.0의 조건하에서 5L의 발효조(working volume 3L) 배양을 행한 결과, 한천분해효소의 생산량은 160 units/L 였다. 이 결과는 플라스크 배양의 결과인 156.8 units/L와 비교해 볼 때 발효조를 이용한 배양에서의 효소생산량과는 큰 차이를 보이지 않았다. 이것은 본 실험에 사용한 해양미생물 *Bacillus cereus* ASK202는 된성호기성 균주로서 산소공급량에 절대적인 영향을 받지 않았기 때문으로 사료된다. 그러나, 한천분해효소의 최대 생산량에 도달하는 배양 시간은 플라스크를 이용한 배양시간에 비해서 발효조 배양에서는 약 8시간정도 상대적으로 배양시간이 단축됨을 확인하였다

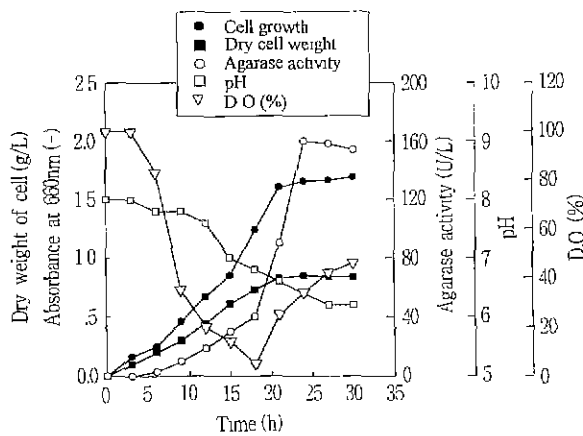


Figure 1 Time course on the agarase production by marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. (150 rpm, 2 vvm, Inoculum size 1%, agar 0.3%)

이때 발효조 배양에 의한 균체성장의 비증식속도(Specific cell growth, μ)는 0.16 h^{-1} 였고, Doubling time(T_d)은 4.28 h 였다(Figure 1)

효소의 분리 및 정제

본 균주가 생산하는 한천분해효소를 정제하기 위해 균체를 배양한 후, 원심분리하여 배양상층액을 동결건조하였다. 동결건조된 배양상층액은 하루정도 투석을 행하여 한천분해효소의 분리·정제를 위한 조효소로서 사용하였다. 조효소용액은 이온 교환에 의해 일차적으로 분리하기 위해서 음이온 교환수지인 DEAE Sepharose CL-6B를 column에 충전하여 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8)로 충분히 세척한 후 조효소 용액을 이온칼럼을 통해서 흡착시켰다 또한, 동일한 완충용액을 이용하여 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 0.0~1.0M NaCl 용액을 이용하여 조효소를 분리하였다 (Figure 2). 그 결과 0.15 M 농도이하의 NaCl 용액에 의해 활성을 지닌 agarase 분획이 용출되었으며, 용출된 효소액을 모아 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.8) 완충액에서 투석을 행하였다. 보다 순수한 정제를 위해서 투석한 효소를 동결건조한 후, 50 mM NaCl이 포함된 동일 완충용액에 녹여서 Superose 6HR 10/30 column를 이용한 HPLC를 사용하여 한천분해 효소를 최종적으로 정제하였다. 그 결과 정제된 효소는 HPLC상에서 단일 peak를 지니고 있음이 확인되었다(Figure 3) *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 한천분해효소의 정제단계는 Table 1에 나타내었다. 수율은 27.8 % 였으며, 정제도는 31.5배 정도 증가하여, 최종적으로 3,780

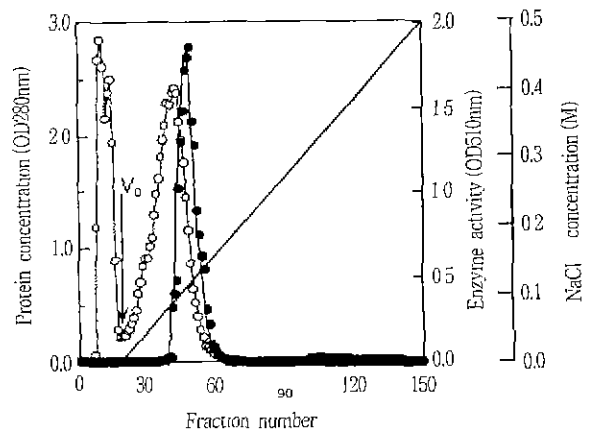


Figure 2. Chromatogram of DEAE Sepharose CL-6B column chromatography. The column (25 × 300 mm) was equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8 The enzyme was eluted with a linear gradient of 0-0.5M NaCl and every fractions were collected. ●, Enzyme activity; ○, Protein concentration OD, optical density; V₀, void volume

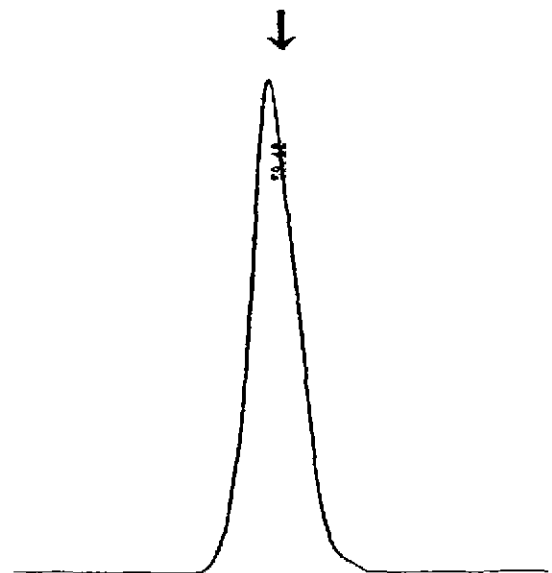


Figure 3. Typical chromatogram of the agarase by gel filtration HPLC The HPLC was performed Superose 6HR column (10 × 300 mm, flowrate: 0.3 ml/min) with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5 containing 50 mM NaCl for eluent. Protein was detected by UV-detector at 280 nm and the agarase was eluted in 59 min Agarase activity peak (↓).

Table 1. Summary of the purification steps of agarase from the culture supernatant of *Bacillus cereus* ASK202.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Degree of Purification (Folds)
Crude enzyme	125,000	1029.0	120	100.0	1.0
Dialyzed sample	68,000	89.7	760	54.7	6.3
DEAE Sepharose CL-6B	36,000	11.3	3,250	29.5	27.1
Superose 6 HR 10/30(HPLC)	34,000	9.2	3,780	27.8	31.5

units/mg의 specific activity를 지닌 정제된 agarase을 얻을 수 있었다

효소의 분자량 결정

정제된 한천분해 효소의 분자량을 결정하기 위해서 HPLC용 Superose 6HR 10/30 gel filtration column을 이용하여 분자량을 알고 있는 표준 단백질의 용출시간을 정제된 한천분해효소의 용출시간과 비교하였다. 그 결과 Figure 4의 직선관계로부터 분자량을 계산한 결과 약 90,000 daltons의 분자량을 가지는 것으로 확인되었다

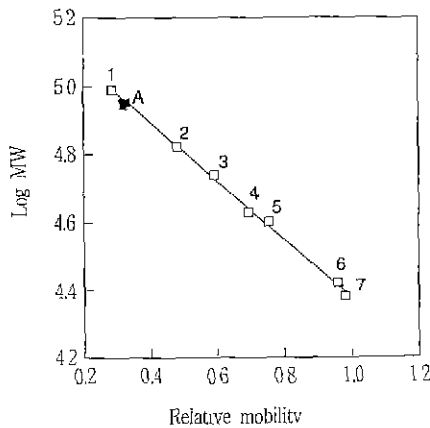


Figure 4. The estimation of molecular weight of the purified agarase. The molecular weight of purified agarase was estimated to be about 90 kDa 1, Phosphorylase B (97 kDa); 2, Bovine Serum Albumin (66kDa), 3, Glutamate Dehydrogenase (55kDa); 4, Ovalbumin (42 kDa); 5, Aldolase (40 kDa), 6, Carbonic Anhydrase (31 kDa); A, Purified agarase (90 kDa).

최적온도와 안정성

Bacillus cereus ASK202가 생산하는 agarase의 효소 활성의 최적온도를 알아보기 위해 20~60℃까지 각 온도별로 효소활성을 측정된 결과 Figure 5에서와 같이 40℃에서 최대활성을 나타내었다.

다른 미생물유래 *Vibrio* sp. Strain JT0107(14)은 30℃, *Vibrio* sp AP-2 (7)는 45℃, *Alteromonas agarlyticus* GJ1B (15)는 40℃로 본 연구에 사용한 한천분해효소와 최적온도가 동일하였고, 그리고 *Pseudomonas* sp PT-5 (16)는 35℃로 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 agarase보다는 다소 낮은 온도에서 최적 활성을 나타내었다.

효소의 온도 안정성을 검토하기 위해 각 온도에서 24시간 방치한 후 잔존효소활성은 Somogyi-Nelson 방법을 이용하여 측정하였다 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.8)에다 0.1%(w/v) agarase 용액 1.3ml, agarase 5unit/200 μ 를 첨가하여 1℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃에서 조사하였다 (Figure 6). 그 결과 50℃에서 24시간 방치한 후 잔존효소활성을 측정된 결과 약 83%의 효소활성을 유지하는 것으로 보아 이 효소는 이미 보고된 바 있는 *Vibrio* sp Strain JT0107(14), *Alteromonas* sp Strain C-1(15) 그리고, *Pseudomonas* sp. PT-5(16) 균주가 생산하는 agarase보다 다소 열안정성이 뛰어난 것으로 확인되었다

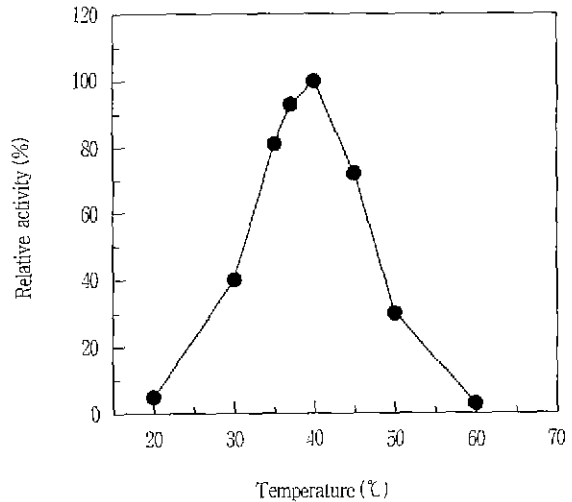


Figure 5. Effect of temperature on the agarase activity. Enzyme activity was measured at various temperatures in 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.8) for 40min, respectively.

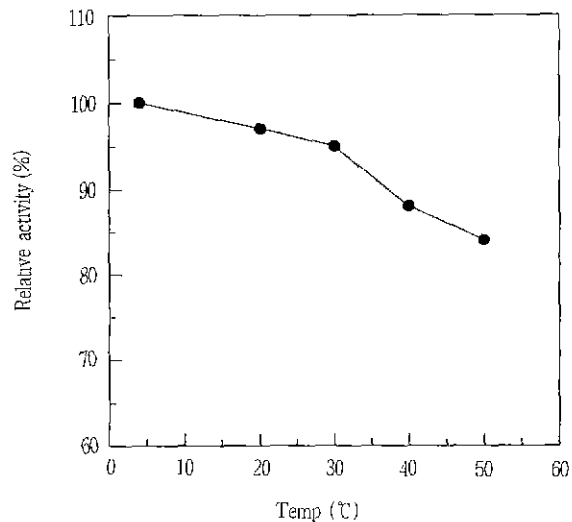


Figure 6. Stability of the agarase activity at various temperature. Enzyme activity was measured at various temperatures in 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.8) for 40min, respectively.

최적반응 pH와 안정성

Bacillus cereus ASK202가 생산하는 agarase의 효소반응에 있어 최적 pH를 조사하였다. pH 3.0~7.0은 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.8~8.0은 10 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0~10.6은 10mM glycine-NaOH buffer을 사용하여 0.1%(w/v) agarase기질용액 1.3mL에 한천 분해효소 5unit /200 μ 를 첨가하여 40℃에서 효소활성을 측정된 결과 Figure 7에서와 같이 pH 7.8에서 최대 활성을 나타내었다 미생물유래 한천분해효소의 최적 pH에 관한 기존의 연구결과를 살펴보면, *Vibrio* sp Strain JT0107 (14)는 pH 8.0, *Vibrio* sp. AP-2 (7)는 pH 5.5, *Alteromonas agarlyticus* GJ1B (15)는 pH 7.2, *Alteromonas* sp. Strain C-1은 pH 6.5, 그리고

Pseudomonas sp. PT-5 (16)는 pH 8.5에서 최적 활성을 나타냄이 보고되어 있어, 미생물유래 한천분해효소의 경우 그 최적 pH는 대체적으로 중성영역임을 알 수 있었다.

또한, 각 pH별로 제조한 완충용액에 효소용액을 첨가하여

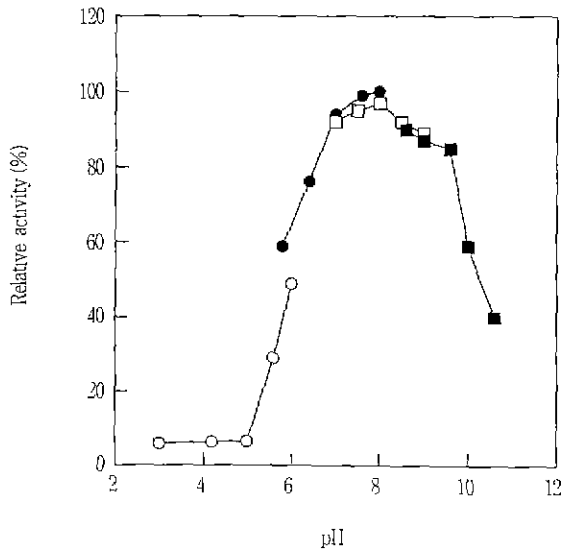


Figure 7. Effect of pH on the agarase activity with various buffer solution. The buffers used: ○, 10 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 3.0 to 7.0), ●, 10 mM sodium phosphate buffer (pH 5.8 to 8.0); □, 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 9.0), and ■, 10 mM glycine-NaOH buffer(pH 8.0 to 10.6). The agarase reaction was carried out various pHs for 30 min at 40°C

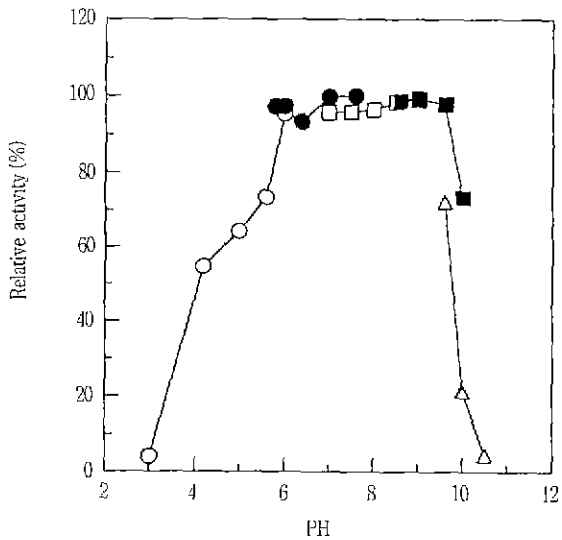


Figure 8 Effect of pH on the agarase stability. The buffers used: ○, 10 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 3.0 to 7.0), ●, 10 mM sodium phosphate buffer(pH 5.8 to 8.0); □, 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.0 to 9.0), ■, 10 mM glycine-NaOH buffer(pH 8.0 to 10.6) The agarase reaction was carried out at 4°C for 24 h in various pHs and the remaining activity was measured at pH 7.8.

40°C에서 24시간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정함으로써 pH 안정성을 조사하였다 그 결과 Figure 8에서와 같이 pH 5.0~10.0까지의 범위에서의 효소활성의 안정성이 확인되었다

기질 특이성

효소의 기질 특이성을 알아보기 위해 다양한 polysaccharides 을 기질로 하여 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8에서 효소 반응을 행한 결과 Table 2에 나타난 것과 같이 효소를 정제하기전 배양상층액을 이용한 경우에는 agar, agarose에 대하여 뛰어난 분해능을 그리고 다른 디당체인 alginate, cellulose, λ-, κ-, ι- carrageenan에 대해서는 약 20~40% 정도의 분해능을 나타내었다 그러나, 정제된 한천분해 효소의 경우 alginate, cellulose, carrageenan에 대해서는 전혀 분해능을 나타내지 않았으며, 오로지 agar, agarose에 대해서만 기질 특이성을 보였다. 이 결과로부터 *Bacillus cereus* ASK202에서 생산되는 agarase는 agar, agarose에 대해 특이적으로 반응하는 효소로 추정된다 그리고, 배양상층액을 기질인 agar와 반응하였을 때 agarose 보다 효소활성이 약 25% 높게 나타난 것은 배양과정중에 한천의 결사슬인 α-1,6 결합을 분해하는 debranching enzyme도 일부 생산하기 때문인 것으로 판단된다.

Table 2. Substrate specificity of the supernatant and the purified agarase from *Bacillus cereus* ASK202

Substrates	Supernatant agarase (%)	Purified agarase (%)
Agar	100.0	100.0
Agarose	76.7	97.6
Alginate	27.2	-
Cellulose	24.4	-
ι - Carrageenan	25.6	-
λ - Carrageenan	41.9	-
κ - Carrageenan	27.9	-

- : was not detected

금속이온의 영향

효소에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 1 mM 농도로 0.1% agarose를 포함한 10 mM sodium phosphate (pH 7.8) 용액 1.3mL에 5unit/200μl 효소를 첨가하여 40°C에서 1시간을 방치한 후 metal ion들이 한천분해효소 활성에 미치는 영향을 잔존 효소활성을 조사하여 측정된 결과는 Table 3과 같았다. 효소활성은 SnCl₂에서는 강한 저해를 받았으나, MnCl₂, FeCl₃, MgCl₂, CaCl₂, LiCl에서는 약간의 저해를 받았다. 그리고, Zn(NO₃)₂에서는 약 63 % 정도의 효소활성의 상승효과가 나타남을 확인하였다.

한편, Manachini 등(17)은 *B. thermoruber* 유래 효소는 Ca²⁺ 첨가시 효소의 안정화 및 효소활성의 증가에 영향을 준다고 보고하였으며, Rhaman 등(18)은 *B. stearothermophilis* F1 유래 효소는 Ca²⁺과 Zn²⁺ 첨가시 효소활성을 상승시킨다고 보고하였고, Ahn 등(19)은 *B. amylolique* 유래 효소에다 단백질 분해 효소 저해제인 puromycin 첨가시 Mg²⁺의 농도를 첨가하는 경우에는 효소활성이 강한 저해를 받았다고 보고하였다. 그리고,

Table 3. Effect of various metal ions on the agarase activity.

Reagents	Relative activity (%)
None	100
Zn(NO ₃) ₂	163
NaCl	103
LiCl	95
MgCl ₂	87
CaCl ₂	76
MnCl ₂	70
FeCl ₃	63
CuSO ₄	54
SnCl ₂	26

The agarase activity was measured in the present of final concentration of metal ion of 1mM

Cowan과 Daniel(20)은 *B. thermophile* 유래 효소는 Ca²⁺이 고온성 단백질 분해효소의 효소활성 증가에 크게 영향을 미친다고 보고하였고, Murphy 등(21)은 젤라틴 분해성 metallo-protease가 저해제 존재시 Ca²⁺와 Zn²⁺를 첨가할 경우 저해제의 효과를 줄일 수 있다고 보고하였다.

정제된 효소의 Km 및 Vmax

정제된 β -agarase에 대한 agarose의 기질 친화력을 측정한 결과를 Lineweaver-Burk plot로 나타내었다 (Figure 9) 이

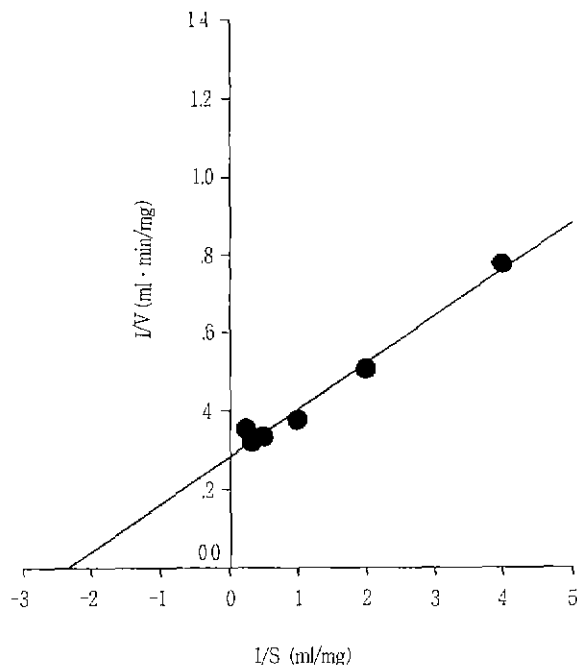


Figure 9. Lineweaver-Burk plot for determining Km and Vmax of agarase.

plot로부터 산출된 Michaelis constant (Km) 값은 2.4 mg/ml 였으며, Vmax 값은 13.6 mg/ml · min인 것으로 확인되었다.

요 약

해양세균 *Bacillus cereus* ASK202는 특이적으로 한천의 존재 하에서만 높은 한천분해효소 생산능을 가지는 것으로 확인되었다 이 균주는 기본배지에서 배양하였을 경우, 그 배양상층액은 21 unts/ℓ의 효소활성을 보였으며, 최적조건하의 발효조를 이용한 배양시에는 생산량은 160.8 unts/ℓ로 기본배지에서도 효소생산량이 약 7.7배 정도 증가한 결과를 보였다. 해양세균 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 한천분해효소(agarase)에 대하여 freeze drying, DEAE Sepharose CL-6B, Superose 6HR 10/30 column chromatography 등에 의해 분리·정제한 결과, 최종적으로 315 배의 정제도, 27.8 %의 수율, 3,780 unit/mg의 specific activity을 지닌 정제된 효소를 얻을 수 있었다 또한 HPLC상에서 정제된 효소가 90,000 daltons의 분자량을 지닌 단일 단백질임을 확인하였다 정제된 한천분해효소의 최적 pH 및 온도는 각각 6.0 과 40℃ 였으며, pH 5.0 ~ 10.0 및 30℃에서 장기 보존하였을 경우 효소활성이 안정적으로 유지됨을 확인하였다. 또한 정제된 한천분해효소 용액은 Zn(NO₃)₂의 첨가에 의해 약 16배정도 효소활성의 상승효과를 가져 왔으며, CuSO₄, SnCl₂에 대해서는 강한 저해효과를 나타내었다. 정제효소에 대한 기질특이성을 조사한 결과, agar와 agarose에 대해서만 특이적인 분해능을 나타내었으며, 그 밖의 polysaccharides에 대해서는 전혀 분해능을 보이지 않았다 한편 정제된 한천분해효소의 Km 및 Vmax 값은 각각 2.4 mg/ml와 13.6 mg/ml · min로 확인되었다

사 사

본 연구는 97년도 해양수산부 특정연구과제 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 깊은 감사를 드립니다

참 고 문 헌

- 1 해양수산통계연보 (1997), 해양수산부, p 987.
2. Kong, J. Y., S. H. Hwang, B. J. Kim, S. D. Ha, S. K. Kim, and J. D. Kim (1995), Purification of Extracellular Agarase of Marine Microorganism (*Pseudomonas* sp. W7) and Molecular Cloning of the Agarase. The First Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference '95, p. 57, Shinjuzi, Japan.
3. Kong, J. Y., S. K. Bae, S. H. Hwang, S. D. Ha, H. T. Kim, S. K. Kim, and B. J. Kim (1996), Purification of Extracellular Agarase from Marine Bacterium (*Pseudomonas* sp. W7) and Molecular Cloning of the Agarase Gene, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 11, 37-45.
4. 藤本浩, 磯村めぐみ, 魚參坂勝美 (1996), 糖加水分解酵素を用いた複合糖質 オリゴ糖ブロックの合成. *J. Appl. Glycosci.* 43, 265-272.
5. Kadota, H (1951), *Memoris of the college of science*,

- Kyoto university, 59, 54-57.
6. Morrice, L. M., M. W. McLean, F. B. Williamson, and W. F. Long (1983), β -Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*: purifications and some properties, *Eur. J. Biochem.* 135, 553-558
 7. Aoki, T., T. Araki, and M. Kitamikado (1990), Purification and characterization of a novel β -agarase from *Vibrio* sp. AP-2, *Eur. J. Biochem.*, 187, 461-466.
 8. Stanier, R. Y. (1942), Agar-decomposing strains of the *Actinomyces coelicolor* species-group, *J. Bacteriol.*, 44, 555-570.
 9. Lee, H. W., B. J. Kim, S. H. Hwang, and J. Y. Kong (1997), Isolation and Identification of Marine Bacterium *Bacillus cereus* ASK202 and Optimal Culture Condition for the Production of Agarase, *Korean J. of Biotechnol Bioeng.*, 12, 228-235
 10. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254
 11. Somogyi, M. (1952), Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.* 195, 19-23.
 12. Harris, E. S. and S. Angal (1989), Protein purification methods, p. II IRL Press, Oxford.
 13. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* (London). 227, 680-685.
 14. Sugano, Y., I. Terada, M. Arita, M. Noma, and T. Matsumoto. (1993), Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1549-1554
 15. Potin, P., C. Richard, C. Roches, and B. Kloareg. (1993), Purification and characterization of the α -agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B. *Eur. J. Biochem.* 214, 599-607.
 16. Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu, H. Shigeiri, and T. Shibata. (1991), Purification and some properties of agarase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agric. Biol. Chem.* 55, 2531-2536.
 17. Manachini, P. L., M. G. Fortina, and C. Parini. (1988), Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* - a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 409-413.
 18. Rahman, R. N. Z. A., C. N. Razak, K. Ampon, M. Basri, W. M. Z. W. Yunus, and A. B. Salleh. (1994), Purification and characterization of a heat stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 822-827.
 19. Ahn, S. J., S. O. Kim, D. H. Lee, and B. H. Song. (1989), Disturbance of α -amylase secretion from *Bacillus amylolique* faciens cells by the treatment of puromycin and magnesium. *Kor J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17, 412-420.
 20. Cowan, D. A., and R. M. Daniel. (1982), Purification and some properties of an extracellular protease (caldolysin) from an extreme thermophile. *Biochim. Biophys. Acta* 705, 239-305.
 21. Murphy, G., C. G. McAlpine, C. T. Poll, and J. J. Reynolds. (1985), Purification and characterization of a bone metalloprotease that degrades gelatin and type IV and V collagen. *Biochim. Biophys. Acta* 831, 49-58.