

## 해양에서 분리한 Arylsulfatase 생산 균주의 특성

서해점, 윤재희, 한순재, 김두상\*, 변대석, 김형락  
부경대학교 · \*(주)엔바이로젠 ·

### 서론

Arylsulfatase (EC 3.1.6.1)는 arylsulfate의 황산 ester 결합을 비가역적으로 가수분해하는 효소이다. 이러한 효소는 토양에서 처음 발견된 이래 동식물 및 미생물에서 검출되어졌으며, 주로 토양 중 황화합물의 recycle에 관여하여 토양 환경에 영향을 미치는 요인으로 보고되었다 (Speir and Ross, 1978).

Arylsulfatase에 대한 연구는 주로 토양으로부터 분리된 세균에 국한된 실정이다. Sulfate 중 arylsulfate는 해조류, 특히 갈조류와 홍조류의 세포벽을 구성하고 있는 다당류에 다량으로 함유되어 있는 화합물이다. 해조류를 섭취하는 해양동물 중에는 소화효소의 일부로서 arylsulfatase가 분포하는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 식이 중 함유되어 있는 다당류의 황산 ester 결합이 분해되어 해조 다당류의 체내 이용도를 높일 수 있다. 여러 가지 연체동물의 소화관은 arylsulfatase의 활성이 높은 것으로 알려져 있다 (Dhevendaran et al., 1980). 어류, 갑각류, 해양 미생물 등 여러 가지 해양생물에 있어서 arylsulfatase의 분포에 대하여 몇몇 연구가 시도되었으나(Maga et al., 1990), arylsulfatase가 해양동물의 소화효소로 분비되는지, 소화관에 상존하는 세균에 의한 것인지에 대한 자료는 미미한 정도이다. 최근 수종의 어류, 새우류 및 조개류를 대상으로 소화관과 소화관내 내용물을 취하여 arylsulfatase 활성을 측정한 결과 생물의 식습관과 관련이 없는 것으로 나타났으며, 소화관에 상존하는 세균수와 arylsulfatase 활성과는 상관관계가 없는 것으로 나타났다 (Dhevendaran and Maga, 1998).

본 연구는 해양 미생물을 대상으로 arylsulfatase 생산균주를 분리하기 위한 검색방법을 개발하여 많은 미생물을 대상으로 검색한 결과 arylsulfatase 활성이 높은 균주를 선발하여 동정하였으며 arylsulfatase의 생산 조건을 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

1) 균주의 검색 및 동정: Arylsulfatase를 생산하는 균주를 검색하기 위하여 *p*-nitrophenylsulfate를 5 mM의 농도로 첨가한 sea water agar medium (Zobell's 2216e medium: Beef extract, 1%; Peptone, 1%; Agar, 2%; Sea water, 75%; Tap water, 25%)에 시료를 도말하고 30°C에서 2일간 배양 후 콜로니 주변에 황색의 halo를 생산하는 균주를 분리하였다. 분리된 균의 동정은 16S rDNA의 50-70과 1374-1394 지역의 염기서열을 primer로 사용하여 PCR로 증폭시킨 후 16S rDNA의 1차 구조를 분석하여 행하였다.

## 2) 방법

① Arylsulfatase activity assay : 시료 1 ml (0.2 M Tris-HCl, pH 7.0)에 25 mM *p*-nitrophenylsulfate 기질 용액 250  $\mu$ l를 가하여 45°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 N NaOH를 1 ml 가하여 유리된 *p*-nitrophenol을 발색시켜 파장 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성 단위는 *p*-nitrophenol로 표준곡선을 작성하여 효소 반응 시간(분)당 유리되는 *p*-nitrophenol의  $\mu$ mole수로 계산하였다.

② Arylsulfatase 생산 균주의 배양 : 600 nm에서의 흡광도가 0.6 전후로 배양된 균주 배양액 (200 ml)을 멸균처리한 해수배지 5 L (총 배양기 부피 7 L)에 접종하여 30°C에서 교반 속도는 350 rpm (선단속도; 98 m/min), pH는 7.0으로 유지시키면서 배양하였다.

③ Arylsulfatase 생산 조건 검색 : 전 배양된 균주 배양액을 일반적 배양조건(교반 속도, 350 rpm; pH, 7.0; 통기량, 1 v.v.m)으로 일정하게 고정된 후 질소원으로는 tryptone을, 탄소원으로는 glucose와 효소의 생산과 관계가 깊은 potassium phosphate, sodium chloride 및 magnesium sulfate를 각 농도별로 첨가하여 최적 농도를 구하였다.

## 결과 및 요약

Arylsulfatase를 생산하는 균주를 검색하기 위하여 *p*-nitrophenylsulfate를 5 mM의 농도로 첨가한 sea water agar medium에 시료를 도말하고 30°C에서 2일간 배양 후 콜로니 주변에 황색의 halo를 생산하는 균주를 분리하였다. 이 균주는 해수로부터 분리되었고, 16S rDNA 분석결과 *Shpingomonas* sp.로 판명되었으며, 신종으로 밝혀졌다.

이 균주로부터 arylsulfatase를 생산하는 조건을 검색한 결과 배지의 pH를 7.0으로 고정하고, 질소원으로 tryptone 1.4%, 탄소원으로 glucose 0.25%의 농도에서 최고의 효소생산량을 나타내었다. 이외의 배지조성 조건은 potassium phosphate, sodium chloride 및 magnesium sulfate가 각각 0.25%, 0.25% 및 0.012%였다.

배양조건으로는 교반 속도를 350 rpm (선단속도; 98 m/min)으로 고정하하고, 배지의 pH를 7.0, 통기량을 1 v.v.m.으로 했을 때 최적으로 나타났다.

## 참고문헌

Dhevendaran K., T. Kannupandi, and Natarajan R. 1980. Arylsulfatase activity in marine gastropods. *Mahasagar* 13:173-178.

Dhevendaran, K. and Maya, K. 1998. Arylsulfatase in fish and shellfish of veli lake, South India. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 71-75.

Leon YA, Bulbrook RD, Corner EDS. 1960. Steroid sulfatase, arylsulfatase and b-glucuronidase in the Mollusca. *Biochem J.* 75:612-617.

Maya, K., Dhevendaran, K., Natarajan, P. 1990. Arylsulfatase producing bacteria in the gut of *Therapon jarbua*. Lesel R (ed). *Microbiology in poecilotherms*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 203-210.

Speir, T.W., and D.J. Ross 1978. Soil phosphatase and arylsulfatase. In R.G. Burns (ed.) *Soil enzymes*. Academic Press, 198-235.