

## 해양미생물 *Pseudomonas* sp. W7이 생산하는 Extracellular Agarase의 정제 및 Gene Cloning

†공재열·배승권·황선희·\*하순득·김홍태·김성구·김봉조  
부산수산대학교 생물공학과, \*동경대학 응용생명화학과

### Purification of Extracellular Agarase from Marine Bacterium (*Pseudomonas* sp. W7) and Molecular Cloning of the Agarase Gene

Jai-Yul Kong<sup>†</sup>, Seoung-Kwon Bae, Sun-Hee Hwang, Soon-Duck Ha,\*  
Hung-Tae Kim, Sung-Koo Kim, and Bong-Jo Kim

Dept. of Biotechnol. & Bioeng., National Fisheries University of Pusan 608-737, Korea

\* Dept. of Applied Biological Chemistry, The University of Tokyo, Japan

#### ABSTRACT

Marine bacterial strain, highly effective agar degrading, was isolated from south sea of Korea and was identified as *Pseudomonas* sp. This strain was named Halophilic *Pseudomonas* sp. W7 and accumulated an extracellular agarase which showed a high level of enzyme activity in the presence of agar and agarose. This extracellular agarase was purified by anion-exchange chromatography and gel filtration. Purified agarase showed a single protein band upon sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and its molecular weight was estimated to be about 89KDa. The agarase gene was cloned into *Escherichia coli* JM83 using the plasmid vector pUC19. DNA fragments(3.7, 3.0Kb) of *Hind* III-digested chromosomal DNA of *Pseudomonas* sp. W7 was inserted into the *Hind* III site of pUC19. Selected transformants, *E. coli* JM83/pSW1 and *E. coli* JM83/pSW3, produced agarase and this agarase was accumulated in the cytoplasmic space.

#### 서 론

한천은 해양에 존재하는 대표적인 해조류로, 공업적 목적이나 식량으로서 오래 전부터 제빵 산업, 과자류의 안정제 등으로 다양하게 사용되고 있으며, 특히 미생물의 배양시 배지의 gel 상태를 유지시켜 주기 위한 재료로 널리 사용되고 있다(1). 한천은 사람의 소화관내에서는 소화효소에 의해 분해되지 않기 때문에 영양원으로 사용될 수 없으며, 혈중 콜

레스테롤의 증가를 억제할 뿐만 아니라, 식사 중의 잉여 콜레스테롤을 체외로 배설시키는 작용을 지니고 있다. 또한, 체내에 잔존하고 있는 여분의 콜레스테롤도 쓸개즙산의 형태로 흡착·배설함으로써 체내 콜레스테롤의 절대량을 감소시키는 탁월한 기능을 가지고 있다. 이러한 한천의 주 구성 성분은 agarose와 agaropectin인데, 이 중 agarose는 전체 한천의 70%를 차지하며 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactopyranosyl-(1,3)-D-galactopyranose가 한 단위로  $\beta$ -(1 4) linkage로 되어 있는 polymer 형태

† Corresponding Author

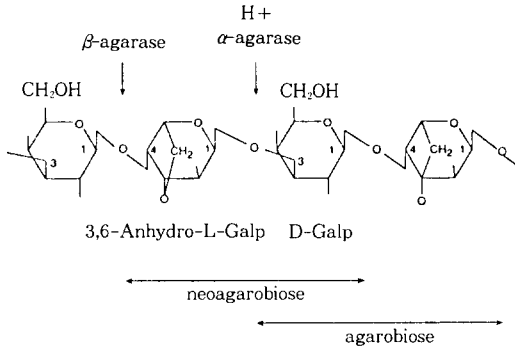


Fig. 1. Chemical structures of agarobiose and neoagarobiose.

의 D, L-galactan으로 되어 있다(Fig. 1)(2-5). Agarose는 화학적·효소학적 가수분해에 의해 agarobiose를 구성단위로 하는 agaro oligosaccharide와 neo agarobiose를 구성단위로 하는 neoagaro oligosaccharide와 같은 한천 oligosaccharide로 분해된다. 이렇게 생성된 한천 oligosaccharide는 전분 노화에 대한 억제 작용이 강하고, 난분해성으로, 소화효소에 의해서도 분해되지 않으며, 장내 유용세균인 비피더스균의 먹이가 되어 증식을 증가시키는 반면에 유해 세균인 대장균, 포도상구균, 식중독균 등의 먹이로는 사용될 수 없는 선택성을 지니고 있어 저장효과가 매우 크다. 또한 당뇨병, 비만, 변비 등의 치료에도 효과가 있다고 알려져 있다(6,7). 이런 특성으로 말미암아 식품의 '영양기능' '감각기능'에 이어 제 3의 기능으로 '생체조절기능'이 크게 강조되는 기능성 식품소재로서 한천 oligosaccharide의 이용이 크게 기대되고 있다. 한편, 기능성 한천 oligosaccharide는 분해효소인 agarase의 작용에 의해 한천으로부터 생산되어지기 때문에, 기능성 한천 oligosaccharide의 생산을 위해서는 뛰어난 활성을 지닌 agarase의 생산이 우선적으로 이루어져야 할 필요가 있다. 지금까지 보고된 한천분해효소 즉, agarase는 미생물로부터 생산되어지기 때문에, 미생물을 중심으로 한 한천분해효소의 생산에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다(8). W. Yaphe 등은 *Pseudomonas atlantica*로부터 3종류의 agarase를 발견하였고(9), C. Araki 등은 *Pseudomonas kyotensis*로부터 neoagarobiose를 생산해 내는 agarase를 발견하는(10,11) 등, 현재까지 한천을 분해하는 효소는 bacteria(9,11,12), actinomycetes(13) 등에서 많이 연구되었으며 특히 *Pseudom-*

*onas* sp.에서 많은 연구가 행해졌다(9,12,14,15).

또한 agarase의 대량생산을 위한 gene의 cloning에 관한 연구는 1984년 K. Kendall 등이 *Pseudomonas* 속의 균주로(15), 1987년 M. J. Buttner 등이 *Streptomyces coelicolor* A3(2)균주로 실행하여 왔다(17,18). 그러나 아직까지도 한천 oligo-saccharide를 생산하는 agarase에 관한 연구보고는 거의 없는 실정이며, 따라서 한천 oligosaccharide의 공업적 생산을 위한 연구도 전무한 상태이다.

더욱이, 이상과 같은 효소의 특성 및 DNA cloning에 사용된 미생물은 하수처리장 등에서 분리한 육상 유래의 미생물로서, 한천이 해양으로부터 얻어진다는 점을 고려할 때, 보다 다양하고 복잡한 해양 환경에 적응하고 있는 새로운 기능을 지닌 수많은 해양 미생물 가운데에는 육상유래 미생물보다 한천 분해능력이 훨씬 뛰어난 해양미생물이 필히 존재할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 해양으로부터 한천을 분해하는 능력이 뛰어난 agarase를 생산하는 미생물을 분리·동정함과 동시에, agarase의 생산을 위한 분리균의 특성을 조사하였다. 또한, 이들 균주로부터 생산된 agarase를 분리·정제하여 그 특성을 조사함과 동시에, agarase의 대량생산을 목적으로 *E. coli*를 이용한 gene cloning을 행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

한국의 남해로부터 채집한 해수와 미역, 다시마 등의 해조류를 파쇄하여 그 현탁액을 배지에 도말하고, 25°C에서 4일 동안 배양하여, 탁월한 한천 분해능을 보인 균주를 분리하여 동정한 후 본 실험에 사용하였다. 균주의 활성을 유지하기 위해서는 인공해수로 만든 사면배지에서 1개월마다 계대배양하여 4°C의 저온실에서 보관하였다.

균을 배양하는 데 사용한 배지조성은 증류수 1ℓ 당 NaCl 4.0g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.6g, CaCl<sub>2</sub> 1.1g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01g, Tris 6.05g/pH 7.5의 인공해수에 yeast extract 2g, ferric citrate 0.1g, ammonium nitrate 0.0016g, disodium phosphate 0.008g이 첨가된 것을 사용하였다. 액체 배지인 경우 0.3%의 한천을 첨가하였다. *E. coli*는 증류수 1ℓ 당 tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g을 함유하는 LB배지에서 배양하

였다. 재조합된 유전자를 가진 transformant를 선별하기 위해서는 X-gal 25 $\mu$ g/ml, IPTG 25 $\mu$ g/ml, ampicillin 50 $\mu$ g/ml이 함유된 선택배지를 사용하였다. 일반 배양용 시약은 Bacto社 제품을 사용하였으며, buffer용 시약들은 Sigma社 제품을 사용하였다.

#### 균주의 동정

균주의 동정은 Kadota의 방법에 의해 행하였다(8). 형태적 관찰은 광학현미경(Carl Zeiss Jenane-2)을 사용하여 1,000배 배율로 관찰하였다. 생화학적 특성검사는 rapid multi-test system인 AIP-20E kit(Alytab product Inc.)를 이용하였으며, 운동성 검사는 in media법과 hanging drop법을 병행하였다(19).

배양시간에 따른 균주성장, 효소활성, 점도의 측정 균을 배양하면서 4시간마다 균주성장과, 배양 상층액이 지나는 효소활성과 배양액의 점도를 측정하였다. 균주성장은 배양액으로부터 흡광도 660nm에서 측정하여 조사하였고, 배양액으로부터 분리한 상층액이 지나는 효소 활성은 기질로서 사용된 한천의 분해산물인 환원당을 정량함으로써 측정하였다. 배양액의 점도는 Wells-Brookfield Viscometer(model : TDV-2)를 이용하여 측정하였다.

#### Enzyme assay

0.05%의 agarose 기질용액(pH 7.5, 10mM Tris·HCl buffer)에 효소용액을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응액에 Somogyi시약을 첨가하여 10분간 끓인 후, 실온으로 냉각시켜, Arsenomolybdate 시약을 첨가하고, 14,000rpm에서 2분간 원심 분리한 상층액의 흡광도를 510nm에서 측정하였다(20,21). 그리고, Agarase activity는 1분당 1 $\mu$ mol의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1Unit로 정의하였다.

#### 단백질의 정량

배양액과 각 정제과정 중의 단백질 양은 Gilford UV-spectrophotometer를 이용한 280nm에서의 흡광도 측정과 Bradford method에 의해 구하였으며(22), 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

#### 효소의 정제도 및 분자량 측정

효소의 정제도 및 분자량을 알아보기 위하여 Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 행하였다. Protein-electrophoresis kit는 BIO-RAD Mini II protein system을 사용하였으며, 12%의 SDS-polyacrylamide gel을 사용하였다. Gel 염색은 Coomassie Brilliant blue G-250을 사용하였으며(23), protein molecular marker로는 lysozyme(14.4KDa), trypsin inhibitor(21.5KDa), bovine carbonic anhydrase(31.0KDa), ovalbumin(45.0KDa), bovine serum albumin(66.2KDa), phosphorylase b(97.4KDa)을 사용하였다.

#### 효소의 정제

균주를 0.3%의 한천을 함유한 pH 7.5의 액체배수배지에서 25 $^{\circ}$ C, 2일간 배양한 후, 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 상층액을 실험에 사용하였다. 분리된 상층액에 2 배의 냉각된 아세톤을 넣어 단백질을 침전시킨 후, 원심분리하여 상층액을 버리고, pellet을 10mM Tris·HCl buffer(pH7.5)에 녹여 동일 buffer에서 투석하였다. 투석된 효소용액은 DEAE-Cellulose ion exchange chromatography column(3.2 $\times$ 20cm)을 통과시켰다. Salt-gradient는 NaCl을 이용하였으며, 용출된 용액을 각 fraction별로 모아 효소활성을 지닌 부분만을 재투석하여 염성분을 제거하고, 이 용액을 Sephadex G-200 gel chromatography column(2 $\times$ 130cm)을 이용하여 재정제시켰다.

#### Agarase의 gene cloning

원균주의 chromosomal DNA는 Alkaline method에 의해 분리하였으며(24), Plasmid DNA는 Ish-Horowicz 등에 의한 alkaline-SDS-method에 의해 분리하였다(25,26). Vector는 pUC19(2.7kb, Ap<sup>r</sup>, lacZ<sup>+</sup>, multi-cloning site)을, host cell은 *E. coli* JM83(rK<sup>+</sup>, mK<sup>+</sup>, ara $\Delta$ (lac pro AB) rpsL,  $\Phi$ 80lacZ  $\Delta$ M15)을 사용하였다. 원 균주의 chromosomal DNA를 제한효소 *Hind* III로 절단하고, plasmid DNA도 동일 효소로 완전히 자른 후, 두 DNA를 T<sub>4</sub> ligase로 ligation 시켰다. 이 ligation mixture를 *E. coli* JM83에 Mandel and Higa의 CaCl<sub>2</sub>방법으로 transformation 시킨 후(27), 선택배지에 도말하여 흰색의 colony를 일차적으로 선별하고, 0.5N Iodine 용액을 가하여 환을 형성하는 colony를 이차적으로 분리하여 gene의 삽입여부를 확인하였다(28).

재조합된 대장균이 생산하는 agarase의 생산여부 재조합된 대장균이 생산하는 agarase의 생산여부에 관해서는 전자현미경을 사용하여 관찰하였다. 균 배양액 3ml를 원심분리한 후, 2.5% glutaraldehyde와 1% osmium tetroxide(OsO<sub>4</sub>)로 균체를 두 번 고정화하여, pH 7.3 phosphate buffer로 씻어 낸 후 아세톤과 에탄올을 이용해 탈수시켰다. 다이아몬드 칼이 달린 LKB-Ultratome으로 얇게 자른 후, 구리격자로 덮힌 Formvarcarbon 필름 위에서 잘려진 단면을 살펴보고, 한 부분을 선택하여, citrate와 uranyl acetate로 염색을 실시한 후, 촬영하였다. 전자현미경은 JEOL 1200 EX II (TEM)을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 동정 및 특성

미역을 파쇄한 현탁액의 상층액을 고체 한천배지에 도말하여 배양하는 중에 주위의 배지를 강하게 분해하는 균주가 있어 이를 동정해 본 결과, Gram (-)이고, 운동성을 가지는 간균으로 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의해 *Pseudomonas* sp.로 동정되었으며(Table 1), 보다 정확한 동정을 위하여 한국중균협회에 의뢰하여 조사한 결과 Halophilic *Pseudomonas* sp.임이 확인되어 본 균주를 Halophilic *Pseudomonas* sp. W7로 명명하였다.

이 균주가 균체 외로 분비하는 agarase에 의해서 colony 주위의 배지가 현저하게 분해되는 것이 관찰되었으며(Fig. 2), 지금까지 보고된 미생물에 비하면 그 분해능이 대단히 뛰어난 것을 알 수 있었다.

본 균주를 25°C에서 배양하면서 4시간마다 균주 성장과 배양액 상층액의 효소활성, 배양액의 점도를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 균주 성장은 16시간부터 정상기에 들어가서 24시간 경과 후 최대로 증가하였으며, 효소활성은 대수기에서 서서히 증가하기 시작하여 정상기에서 최대치를 나타내었다. 배양액의 점도는 배양초기에는 233cp(한천 0.3%)로 높은 값을 나타내었으나, 6시간 후 40cp로 급격히 떨어졌으며, 28시간 이후에는 점도가 완전히 감소하였다. 따라서 이러한 점도의 급격한 감소 결과로부터 본 균주가 생산하는 agarase는 polysaccharide chain의 말단부터 순차적으로 절단하는 exo type이 아니라, polysaccharide chain의 중간을 무작위적으로 절단하는 endo type으로 판단된다(15).

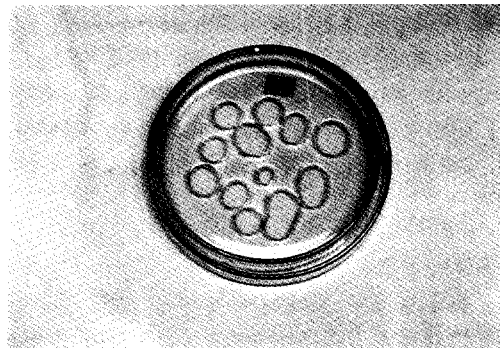


Fig. 2. Photograph of agarolytic bacterial(*Pseudomonas* sp. W7) colonies cultured at 25°C for 4 days.

Table 1. General characteristics of isolated marine bacterium W7.

Tests	Results
Gram stain	- <sup>a</sup>
Motility	+ <sup>b</sup>
NO <sub>2</sub> production reduction to N <sub>2</sub> gas	-
Indole production	-
Acidification	-
Arginine dehydrolase	-
Urease	-
β-glucosidase	+
Protease	-
β-galactosidase	+
Glucose assimilation	-
Arabinose assimilation	+
Mannose assimilation	-
Mannitol assimilation	-
N-acetyl-glucosamine assimilation	-
Maltose assimilation	+
Glucouate assimilation	-
Caprate assimilation	-
Adipate assimilation	-
Malate assimilation	-
Citrate assimilation	-
Phenyl-acetate assimilation	-
Cytochrome oxidase	-

a : negative reaction, b : positive reaction

균체의 성장과 agarase의 생산에 미치는 배지 조성의 영향

Agar, agarose, starch, sucrose, glucose, fruc-

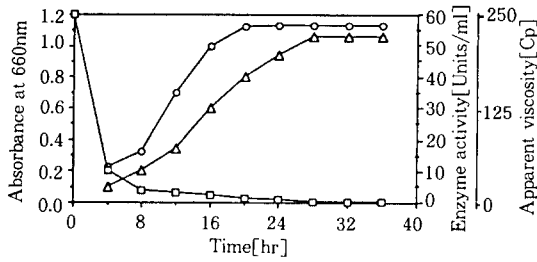


Fig. 3. Production of the extracellular agarase during the growth of *Pseudomonas* sp. W7.  
 ○ absorbance at 669nm,  
 △ Agarase activity,  
 □ Apparent viscosity.

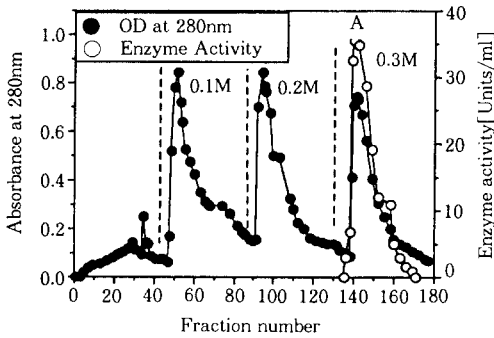


Fig. 4. Chromatography of the crude enzyme on DEAE-cellulose ion exchange column. Flow rate, 5ml/hr; Elution volume, 10ml/tube.

tose, lactose 등과 같이 탄소원의 종류를 달리하였을 경우 *Pseudomonas* sp. W7의 세균성장 및 agarase 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). Sucrose와 starch를 첨가하였을 경우에는 균체 및 효소가 원활히 생산되지 않았고, fructose와 lactose를 첨가하였을 경우, 균의 성장은 이루어 졌으나 agarase는 생산되지 않는 것으로 나타났다. 균의 성장과 agarase의 생산에 있어서는 agar와 agarose가 가장 유효하였으므로, agarase는 agar나 agarose 등과 같은 탄소원의 존재 하에서 생산되어지는 것으로 사료된다.

해양 유래 미생물인 *Pseudomonas* sp. W7은 호염성 균주로 동정되었으므로, 이들의 성장과 extracellular agarase 생산능에 미치는 NaCl의 농도의 영향을 조사하였다(Table 3). 본 균주는 배지 중의 NaCl 농도가 증가함에 따라 extracellular agarase

Table 2. Effects of carbon sources on the cell growth and agarase activity.

Carbon source (0.3%)	Cell number (cells/ml × 10 <sup>6</sup> )	Agarase activity (Units/ml)
Agar	7.7	62.0
Agarose	7.8	62.4
Glucose	5.4	9.8
Sucrose	2.8	10.3
Fructose	6.4	10.0
Lactose	7.4	9.5
Starch	3.5	14.0

Table 3. Effects of NaCl concentration on the cell growth and agarase activity.

NaCl concentration (%)	Cell number (cells/ml × 10 <sup>6</sup> )	Agarase activity (Units/ml)
0	1.7	14.7
1	5.7	45.7
2	6.7	53.1
3	6.9	59.3
4	7.6	62.1
5	7.4	55.3

의 생산량 역시 증가하였으며, 해수 중의 NaCl 농도 보다 조금 높은 약 4%에서 최적치를 보였다.

효소의 분리·정제

*Pseudomonas* sp. W7이 생산하는 extracellular agarase의 분리정제를 위해 우선, 균 배양액으로부터 원심분리하여 얻어진 상층액에 대하여 DEAE-Cellulose anion exchange chromatography를 실시한 결과, 용출용액 중의 NaCl 농도가 0.3M일 경우에 분리된 부분(peak A)이 효소활성을 나타내었으며(Fig. 4), 이 peak A 부분(fraction number 135~165)을 모아, 다시 Sephadex G-200 gel chromatography를 행하여 activity를 가지는 두 개의 peaks(B, C)를 얻었다(Fig. 5). 또한, 보다 높은 효소 활성을 나타내는 Peak C 부분(fraction number 23~32)에 대하여 DEAE-Cellulose ion exchange column으로 재정제를 행한 결과, 효소 활성을 지니는 단일 peak D를 얻어내었다(Fig. 6). Peak D는 12% SDS-PAGE를 통해 분자량 89KDa의 단일 protein임이 확인되었다(Fig. 7). Table 4에 *Pseudomonas* sp. W7이 생산하는 agarase의 정제과정과 각 과정에 있어서의 specific

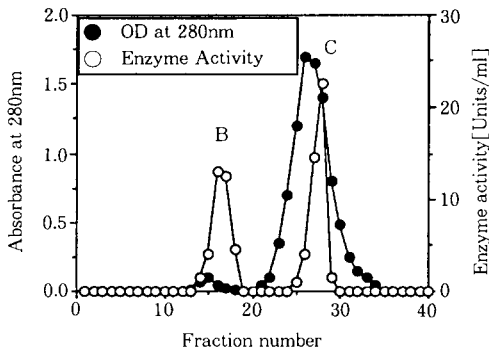


Fig. 5. Gel chromatography on sephadex G-200. Flow rate, 2ml/h; Elution volume, 2.5ml/tube.

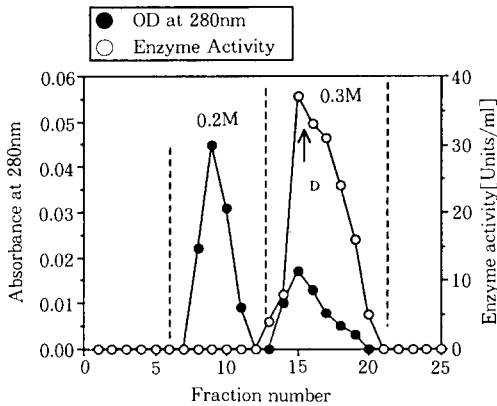


Fig. 6. Chromatography of the enzyme on DEAE-cellulose ion exchange column. Flow rate, 5ml/hr; Elution volume, 10ml/tube.

activity, purification fold, purification yield 등을 나타내었다. 기존에 보고된 agarase의 활성과 본 군주가 생산하는 agarase의 활성을 비교한 결과, 한천의 존재 하에서 *Pseudomonas atlantica*가 생산해 내는 agarase의 specific activity가 16.98 U/mg(14), *Pseudomonas sp. PT-5*는 3.34 U/mg(12), *Vibrio sp. strain JT0107*이 6.3U/mg(29)임에 비하여 *Pseudomonas sp. W7*의 값은 48U/mg으로 다른 미생물이 생산하는 효소들 보다 specific activity가 상당히 높은 것으로 나타났다.

또한, 위 결과로부터 *Pseudomonas sp. W7*은 두 가지 이상의 효소(peak B, C)를 생산해 내고 있음이 밝혀졌다. 정제된 B와 C의 specific activity가 3.3, 9.8U/mg인데 비해 B와 C를 1 : 1로 섞어 반응

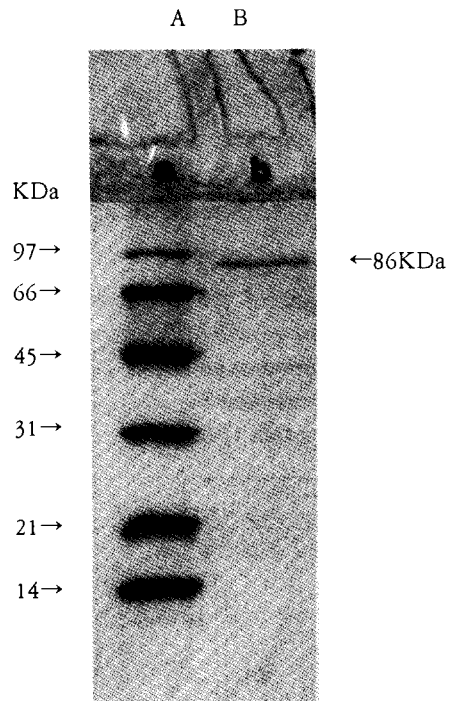


Fig. 7. Electrophoresis photograph of the purified agarase from *Pseudomonas sp. W7*  
 lane A : molecular marker  
 lysozyme, 14,400; trypsin inhibitor, 21,500; bovine carbonic anhydrase, 31,000; ovalbumin, 45,000; bovine serum albumin, 66,200; phosphorylase b, 97,400  
 lane B : purified agarase.

Table 4. Summary of the purification of agarase from *Pseudomonas sp. W7*.

	Total activity (U)	Total protein (mg)	specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Supernatant(2 ℓ)	11,994	8,000	1.4	1.0	100
Acetone precipitation	9,374	4,700	1.9	1.3	78.5
DEAE-Cellulose	9,259	2,100	4.4	3.0	77.5
Sephadex G-200					
peak B	1,995	6,125	3.3	2.2	16.7
peak C	1,554	1,575	9.8	6.5	13.0
DEAE-Cellulose	1,440	30	48.0	32.0	12.1

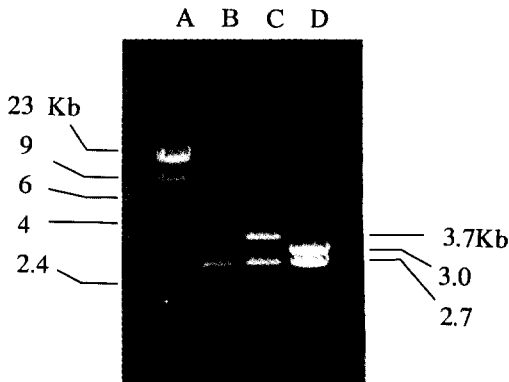


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid DNA carrying agarase gene of *Pseudomonas* sp. W7.

A, marker, B, pUC19 plasmid DNA digested by *Hind*III; C, pSW1 plasmid DNA digested by *Hind*III; D, pSW3 plasmid DNA digested by *Hind*III

시킨 결과, 나타나는 specific activity는 14.7U/mg으로 함께 섞은 경우, 2.4배 정도 높은 값으로 나타났다. 이들 각각은 agar나 agarose의 서로 다른 부위를 절단하는 기작을 가지고 있어 상호보완의 작용을 하는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 W. Mclean에 의해 발표된 *Pseudomonas atlantica*가 생산하는 서로 다른 agarase를 혼합하였을 때, specific activity가 높게 나타나는 것과 일치되는 것으로 나타났다(14,30).

Agarase의 gene cloning

*Pseudomonas* sp. W7 균으로부터 생산되는 agarase의 대량생산을 목적으로 agarase의 gene cloning을 행하여 *E. coli*에 발현시켰다. 우선, vector DNA로 pUC19를 사용하여, *Pseudomonas* sp. W7로부터 분리한 chromosomal DNA와 ligation시킨 후 *E. coli* JM83에 형질전환 시켰으며, 형질전환된 약 12,000종의 transformant에 대하여 그 활성 유무를 0.5N Iodine 용액으로 확인한 결과, 2 균주에서 agarase activity가 나타났다. 이들 균주를 각각 *E. coli* JM83/pSW1, *E. coli* JM83/pSW3이라 명명하였으며, 사용된 vector DNA에 *Pseudomonas* sp. W7 chromosomal DNA가 재조합 된 것을 확인하기 위하여 agarose gel 전기영동을 행하였다. 그

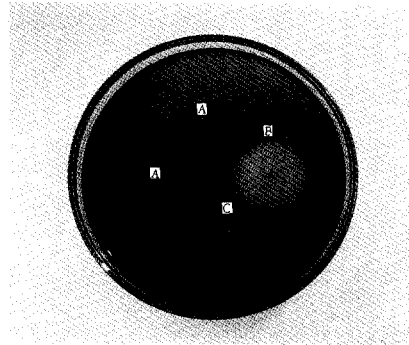


Fig. 9. Photograph of *E. coli* containing the cloned agarase gene(treated with soft agar).

A, *E. coli* JM83/pUC(control); B, *E. coli* JM83/pSW3; C, *E. coli* JM83/pSW1(B and C are containing the recombinant plasmid DNA carrying agarase gene of *Pseudomonas* sp. W7).

결과, pSW1(C)은 3.7Kb, pSW3(D)은 3.0Kb의 삽입부위를 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 8). 이것은 원균주 *Pseudomonas* sp. W7이 둘 이상의 agarase를 생산하는 점을 고려할 때에 단백질을 coding 하고 있는 agarase gene이 하나 이상 존재할 것이라는 예상에 부합되는 결과이다. *E. coli* JM83/pSW1과 *E. coli* JM83/pSW3는 그 자체로는 iodine 용액에 대해 환을 형성하지 않으나, lysozyme 처리를 행하여 세포막이 분해된 상태의 균체는 Iodine 용액에 대하여 투명한 환을 형성하므로, *E. coli* JM83/pSW1과 *E. coli* JM83/pSW3는 세포 내부에 축적되는 interacellular agarase를 생산해 내는 것으로 사료된다(Fig. 9). Interacellular agarase의 생산여부를 확인하기 위하여 *E. coli* JM83/pUC19와 *E. coli* JM83/pSW3에 대하여 전자현미경(TEM) 관찰을 행하였다. 그 결과 Fig. 10에서 나타난 바와 같이 pSW3(B)는 생산한 agarase protein을 inclusion body 형태로 축적시키고 있음을 확인하였다.

요 약

한국의 남해안에서 한천 분해능이 뛰어난 해양 미생물을 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas* 속으로 판명되었으며, 본 연구에서는 이 균을 Halophilic *Pseudomonas* sp. W7이라 명명하였다. 이 균주는 호



(A)



(B)

Fig. 10. Transmission electron micrographs of *E. coli* JM83. A, *E. coli* JM83/pUC19(control); B, *E. coli* JM83/pSW3(containing recombinant plasmid DNA carrying agarase gene of *Pseudomonas* sp. W7).

염성 세균으로, 한천의 존재 하에서 높은 효소활성을 가지는 extracellular agarase를 생산해 내었다. 이 extracellular agarase를 DEAE-Cellulose anion exchange chromatography와 gel filtration을 통해 정제하였으며, 정제된 agarase는 SDS-PAGE를 통해 약 89KDa의 분자량을 지니는 single protein band임을 확인하였다. 한편 agarase의 대량생산을 위하여 host cell *E. coli* JM83과 vector pUC19를 이용하여 gene cloning을 행하였다. *Pseudomonas* sp. W7의 chromosomal DNA가 삽입된 균주 중에서 agarase activity를 나타내는 *E. coli* JM83/pSW1과 *E. coli* JM83/pSW3를 선별하였으며, 전기영동 실험결과 이들은 각각 3.7Kb, 3.0Kb의 chromosomal 단편을 지니고 있음을 확인하였다. 또한 agarase 유전자가 삽입된 변이 균주(B)는 inclusion body 형태의 intercellular agarase를 세포 내에 축적하고 있음이 확인되었다.

## 사 사

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구과제(과제번호: 92-24-00-14)의 지원과, 일부 1994년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비 지원(과제번호:BSRI 94- 4410)에 의해서도 이루어졌으며, 이에 대하여 감사드립니다.

## 참고 문헌

1. K. Hayashi and K. Nonaka(1967), *J. Food Science and Technol.*, **14**, 67.
2. 池成圭(1992), 機能性食品, 光一文化社, 125-138.
3. C. Aaraka(1937), *J. Chem. Soc. Japan*, **58**, 1362-1383.
4. E. G. V. Percival and J. C. Somerville(1937), *J. Chem. Soc.*, 1615-1619.
5. S. Hands and S. Peat(1938), *Nature*, **142**, 797.
6. 河野敏明, 徳永隆久, 日高秀昌, 三好熙三, 比川應進, 平賀哲男(1987), 日本農藝化學會講演要旨集, 777.
7. 河野敏明(1988), *Food Chemical.*, **4**, 40.
8. H. Kadota(1951), *Memoris of the college of science*, Kyoto university, **59**, 54-57.
9. W. Yaphe(1957), *Can. K. Microbiol.*, **3**, 987.



10. C. Araki and K. Arai(1956), *Bull. Chem. Soc. Japan*, **29**, 339-345.
11. C. Araki and K. Arai(1957), *Bull. Chem. Soc. Japan*, **30**, 287-293.
12. I. Yamamura, T. Matsumoto, M. Funatsu, H. Shigeiri and T. Shibata(1991), *Agric. Bio. Chem.*, **55**(10), 2531-2536.
13. R. Y. Stanier(1942), *J. Bacteriol.*, **44**, 555.
14. L. M. Morrice, M. W. Mclean, F. B. Williamson and W. F. Long(1983), *Eur. J. Biochem.*, **135**, 553-558.
15. M. Malmqvist(1978), *Biochemica et Biophysica Acta*, **537**, 31-43.
16. K. Kendall and J. Cullum(1984), *Gene*, **29**, 315-321.
17. M. J. Bibb, G. H. Jones, R. Joseph, M. J. Buttner and J. M. Wand(1987), *J. Gen Microbiol.*, **133**, 2089.
18. M. J. Buttner, I. M. Featnley and M. J. Bibb (1987), *Mol. Gen. Genet.*, **209**, 101.
19. P. K. Noel and G. H. John(1984), "in Bergey's manual of systematic bacteriology" I, Ed. by F. U. Richard, Williams & Willkins, London, 214-219.
20. M. Somogyi(1952), *J. Biol. Chem.*, **195**, 19.
21. S. Nelson(1944), *J. Biol. Chem.*, **153**, 375.
22. J. Preiss and G. Ashwell(1962), *J. Biol. Chem.*, **237**, 309-316.
23. F. Fairbanks, T. L. Sleck and D. F. H. Wallavh(1962), *Biochem.*, **309**, 209.
24. R. C. Caswell, P. Gacesa, K. E. Lutrett and A. J. Weightman(1989), *Gene*, **75**, 127-134.
25. D. Ish-Horowicz and J. F. Burke(1981), *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2989.
26. D. S. Holmes and M. Quigley(1981), *Anal. Biochem.*, **114**, 193-197.
27. M. Mandel and A. Higa(1970), *J. Mol. Biol.*, **53**, 159-162.
28. R. Y. Stanier(1942), *J. Bacteriol.*, **44**, 55-57.
29. A. Takahiko and A. Toshiyoshi(1990), *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**(5), 825-830.
30. L. M. Morrice, M. W. Mclean, F. B. Williamson and W. F. Long(1983), *Eur. J. Biochem.*, **137**, 149-154.
31. J. Y. Kong, B. H. Ryu, M. W. Chang, I. S. Kong and S. D. Ha(1993), The 1st Academic plaza in international food Machinery Exhibition '93, Makuhari, Japan, 57.
32. 하순득, 공인수, 공재열(1994), 한국산업미생물학회 춘계학술대회 논문집, 190.
33. S. H. Hwang, S. D. Ha, J. D. Kim, S. K. Kim and J. Y. Kong(1995), The 3rd Academic plaza in international food Machinery Exhibition '95, Makuhari, Japan, 48.
34. J. Y. Kong, S. H. Hwang, B. J. Kim, S. D. Ha, S. K. Kim and J. D. Kim(1995), The first Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference '95, Shimizu, Japan, 70-71.