

한천 분해균(*Cytophaga* sp. ACLJ-18)이 생산하는 agarase의 정제 및 특성

주 동 식 · 송 해 미 · 이 정 석 · 조 순 영 · 이 응 호
부경대학교 식품공학과, ¹강릉대학교 식품과학과
(접수 : 1998. 3. 5., 게재승인 : 1998. 4. 5.)

Characterization and Purification of Agarase from *Cytophaga* sp. ACLJ-18

Dong Sik Joo, Hae Mi Song, Jung Suck Lee, Soon Young Cho¹, and Eung Ho Lee[†]
Department of Food Science and Technology, National Pukyong University, Pusan 608-737, Korea
¹Department of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 200-701, Korea
(Received : 1998. 3. 5., Accepted : 1998. 4. 5.)

Agar degrading enzyme-agarase-was purified from the culture fluid of *Cytophaga* sp. ACLJ-18, by acetone precipitation, DEAE-Cellulose, Sephadex G-100 and CM-Sephadex C25 column chromatographies. The molecular weight of purified agarase was estimated to be 24,700 dalton by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The optimum pH and temperature for agarase activity were 7.0 and 40°C, respectively. This agarase was stable in the pH range of 6.5 - 8.0 and 40°C, and required 0.35M NaCl for optimum activity. And this agarase was inhibited by metal ions such as Ba²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, and showed specificity on agar.

Key Words : agar, *Cytophaga* sp. ACLJ-18, agarase, purification, optimum condition

서 론

홍조류의 세포간 점질다당류인 한천은 황산기 함량이 적으며 강한 겔 형성능을 부여하는 성분인 agarose(agarobiose)가 반복적으로 α -1,3 결합)와 황산기를 많이 함유하는 겔 형성능이 약한 agaropectin이 결합한 hetero 형 해조 다당류이다(1). 이러한 구조적 특징을 가지는 한천은 오래전부터 식품, 공업, 의학 및 미생물 연구용 등의 분야에 널리 이용되어 왔고(2-3). 이의 추출, 겔 형성 기구 및 합성 등에 관한 연구가 많이 이루어져 있다(4-5). 최근에는 한천의 이용 범위를 확대하려는 시도들이 많이 행해지고 있는데, 그 중의 하나가 특정 분해 방법을 이용한 한천의 올리고당화인데, 올리고당이 가지고 있는 일반적인 특성인 정균작용, 비피더스균 증식 인자, 진분 노화방지, 항충치성, 비소화성 등을 한천 올리고당도 가지고 있어 식품의 기능성 향상을 위한 성분으로 역할이 기대된다. 이를 위한 미생물 효소의 검색으로 *Pseudomonas atlantica*가 생산하는 neoagarotetrose hydrolase에 대한 보고(6), *Vibrio* sp. AP-2가 생산하는 agarase의 정제와 특성(7), *Alteromonas* 속의 균체외 agarase에 대한 연구(8) 등의 연구가 이루어져 있다.

한편, 최근에 국내에서도 이러한 분야에 관심을 가지고 연구를 행하여 그 결과를 발표한 바 있으며(9), 조 등(10)은 한천 분

해 미생물 효소를 이용하여 한천 올리고당을 생산하고자 분해균을 분리한 바 있다. 본 논문에서는 한천을 분해하는 균이 생산하는 한천 분해 효소를 정제하고 특성을 밝혔다.

재료 및 방법

균 주

효소 생산에 이용한 균은 조 등(9)이 군부(chiton)에서 분리한 한천 분해능이 우수한 *Cytophaga* sp. ACLJ-18 균주를 이용하였다.

조효소액 제조

조 등(9)이 보고한 논문에서 확인된 바 있는 것처럼 이 균의 최적 활성 조건에서 조효소액을 대량 제조하여 정제에 이용하였다. 즉 질소원은 nutrient broth와 yeast extract를 각각 0.3%, 0.2%, 탄소원은 agar 0.5%였고, NaCl 2.0%, 온도 30±2°C에서 96시간 동안 진탕 배양한 후 원심분리(12,000×g, 10min)하여 얻어진 상층액을 조효소액으로 이용하였다.

단백질 농도, 효소 활성 및 분자량 측정

효소 정제 과정중의 단백질 희분은 분광광도계(UV/V spectrophotometer, Shimadzu UV-120-02)를 이용하여 280nm에서 흡광도를 측정하여 검색하였고, 단백질 농도는 Lowry 등의 비색법(10)에 의해 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 표준 단백질로 하여 얻어진 검량 곡선으로부터 구하였다.

[†] Corresponding author : Pusan city, Nam-gu, Daeyoungdong 599-1, Pukyong National Univ.
Tel : 051-620-6412, Fax : 051-622-9258

조효소액 1ml와 기질인 0.15% agar(30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, 2.0% NaCl 함유) 4.0ml를 40°C 항온 수조에서 90분간 반응시킨 후 그 중 1ml를 취하여 Somogyi-Nelson 법(11)으로 흡광도를 측정하여 표준당(galactose)으로 작성한 검량선으로부터 환원당을 측정하였다. 효소 1단위는 분당 1μmole의 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다.

효소 정제 과정중의 순도 검정은 Davis(12)의 Disc-PAGE (7.5% polyacrylamide gel electrophoresis)에 의하였으며, 분자량 측정은 Laemmli(13)의 방법에 따라 SDS-분자량 표준 단백질에 대하여 10% SDS-PAGE를 행한 후 SDS-분자량 표준 단백질의 전기영동 이동도를 대조로 하여 SDS화한 효소의 전기영동 이동도를 비교하여 효소의 구성 subunit의 분자량을 측정하였다.

효소 정제

효소 생산 최적 조건에서 균을 배양한 후 원심분리(12,000×g, 10min)한 상층액을 membrane filter(0.45μm)로 여과하여 조효소액을 얻었다. 조효소액에 -20°C로 조절된 아세톤을 조효소액에 70% 농도가 되게 첨가하여 효소를 침전시켜 원심분리(12,000×g, 5min)하여 모으고, 30mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 용해시켰다. 이것을 동일 완충액에서 하룻밤 냉장고에서 투석(투석막: M.W. 10,000)한 후 한외여과 장치를 이용하여 농축한 다음, 동일 완충액으로 평형화시킨 DEAE-cellulose 음이온 교환수지에 흡착시킨 후 완충액으로 만든 염용액을 사용하여 농도 구배법(0-1.0M)으로 용출, 분획을 행하였다. 한천에 대한 활성이 있는 획분을 모아 다시 농축을 행한 후, Sephadex G-100으로 겔 크로마토그래피를 행하고 활성 획분을 모은 후 양이온 교환 수지인 CM-Sephadex C25를 이용하여 이온 교환 크로마토그래피를 행하였다. 기질에 대해 활성이 강한 획분을 모아 농축하여 Sephadex G-100으로 다시 크로마토그래피한 다음 활성 획분을 농축하여 전기영동으로 순도 검정을 행한 후 최종 정제 효소를 제조하였고, 이 효소액을 특성 실험 효소액으로 이용하였다.

효소활성 최적조건

1.5% 한천과 2.0% NaCl이 함유된 기질 용액 2ml와 각 pH 별 완충액(pH 4.0-6.0: 0.1M sodium acetate-acetate buffer, pH 7.0-9.0: 0.1M Tris-HCl buffer, pH 10.0-11.0: sodium carbonate-sodium hydrogen carbonate) 2ml를 혼합한 액에 효소를 1ml 가하여 40°C에서 90분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 활성 최적 pH를 구하였다.

최적 온도는 효소액 0.5ml와 0.15%의 기질용액 2ml를 혼합하여 반응온도를 0°C에서 60°C까지 10°C 간격으로 조절하면서 90분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 구하였다.

효소 안정성

정제효소액 일정량을 pH 5.0 - 11.0인 완충액에 60분간 전처리한 후 이 효소액 1.0ml와 0.15% 기질 용액 4ml를 혼합하여 40°C에서 90분간 반응시키고 환원당을 측정하여 효소의 안정성에 미치는 pH 조건을 확인하였고, 정제 효소 1ml를 0 - 80°C의 온도에서 30분간 가온한 후 효소액 1ml와 0.15% 기질용액 4ml를 혼합하여 40°C에서 90분간 반응시켜 환원당을 측정하여 잔존

활성을 확인하여 온도에 대한 안정성을 알아보았다.

효소활성에 미치는 첨가물의 영향 및 기타 다당류에 대한 활성

기질의 NaCl 농도를 0 - 4.5%까지 다르게 첨가하여 효소활성에 미치는 NaCl의 영향을 알아보았다. 염화물형의 1,2가 이온(Li⁻, K⁻, Ba²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺, NH₄⁺ 등)이 효소 활성에 미치는 영향을 시험하였다. 효소 0.5ml와 30mM Tris-HCl buffer(pH 7.0) 2.0ml와 0.2M 금속용액 0.01ml를 혼합하여 40°C에서 30분간 전반응시킨 후 이 혼합액에 0.15% 기질용액(NaCl 0.2% 함유) 2ml를 가하여 40°C에서 90분간 반응시켜 환원당을 측정하였다. 대조구는 2.0% NaCl만 첨가한 것으로 하였다. 다당류에 대한 분해성을 확인하기 위해 연구실에서 제조한 한천 및 수용성 전분, CM-cellulose, dextrin 기질 용액을 만들어 동일한 조건에서 효소를 반응시킨 후 생성된 환원당을 측정하였다.

결과 및 고찰

효소 정제 및 분자량

균주 배양액의 상층액에서 냉각 아세톤의 첨가로 얻어진 단백질을 투석후 농축하여 음이온 교환수지인 DEAE-cellulose 크로마토그래피를 행한 결과(Figure 1) 한천 분해능이 있는 두 개의 획분을 확인하였다. 한천 분해능이 강한 획분대는 음이온 교환수지에 흡착되지 않았고, 미약한 활성을 보였던 획분대는 흡착되는 특성을 보였다. 활성이 매우 미약했던 획분이 단백질 농도도 매우 낮아서 본 실험에서는 더 이상 정제를 행하지 않았으며, 활성이 강했던 획분만 농축하여 겔 크로마토그래피를 행하였는데(Figure 2), 겔 크로마토그래피에서 단일의 효소 활성 획분이 확인되었다. 이 획분을 농축하여 양이온 교환 수지인 CM-Sephadex C25를 이용하여 크로마토그래피(30mM Tris-HCl buffer, pH 6.5, 0-1.0M NaCl gradient)를 행한 결과는 Figure 3과

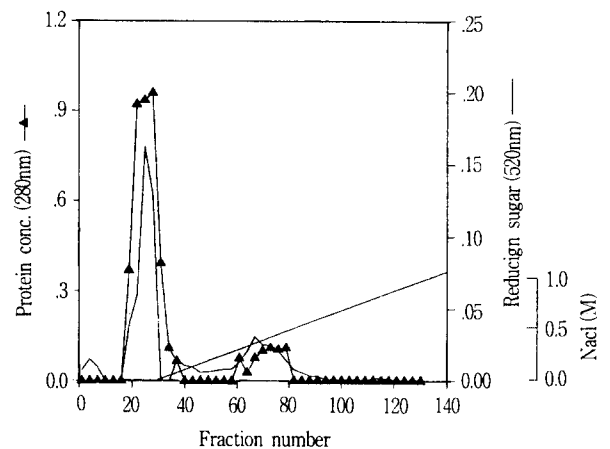


Figure 1. DEAE-Cellulose chromatogram(Ø3.0×50cm) of the crude enzyme obtained from acetone precipitation. ▲; prtein concentration, —; reducing sugar. The enzyme was eluted with a gradient of 0-1.0M in 30mM Tris-HCl buffer(pH7.0). The flow rate and fraction volume was 30ml/hr and 6ml, respectively.

같다. 단일의 핵분대에서 활성을 나타내는 단백질을 얻어 투석 후 농축하여 전기 영동을 통해 정제도를 확인한 결과 단일 band의 효소로 확인되었다. 각 정제 단계별 정제도를 살펴보면 DEAE-cellulose 크로마토그래피한 결과 비활성이 0.84U, 정제도는 4.7배였다. 최종 양이온 교환수지를 이용한 크로마토그래피한 것은 비활성이 2.36U, 정제도는 14.7배였다(Table 1).

한편, 정제 과정을 거쳐 얻어진 효소의 SDS-전기영동 분석을 통해 표준단백질과 대조하여 분자량을 측정된 결과, 분자량 24,700 dalton의 단량체 효소인 것으로 추정되었다(Figure 4).

Table 1. Purification of the agarase produced *Cytophaga* sp. ACLJ-18

Fraction	Protein (mg)	Total activity(U)	Specific activity(U)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	4900	882	0.18	100	1
Acetone precipitation fraction	627.3	282.3	0.45	32	2.5
DEAE-Cellulose chromatography	219.8	184.6	0.84	20.9	4.7
Sephadex G-100 chromatography	112.4	139.4	1.24	15.8	6.9
CM-Sephadex C25 chromatography	30.0	71.0	2.36	8.0	14.7

* Total Unit/protein conc.(mg)

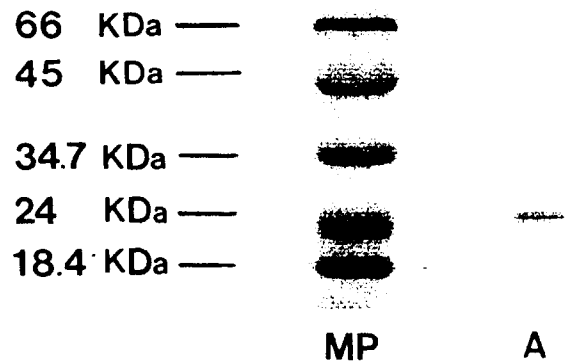


Figure 4. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of the purified agarase.

MP : Molecular weight of marker proteins

- 66 KDa : bovine
- 45 KDa : egg albumin
- 34.7 KDa : pepsin
- 24 KDa : trypsinogen
- 18.4 KDa : β -lactoglobulin

A : purified agarase

효소활성 최적 조건 및 안정성

얻어진 효소의 최적 활성 pH 및 안정성 조건을 실험한 결과 (Figure 5) pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보였고, pH 6.5와 8.0 사이의 미산성 및 미알칼리성 영역에서도 높은 활성을 보였고, 이는 균주 분리시의 고체 및 액체 배지의 pH 조건과도 밀접한 상관성이 있는 것으로 추정되었다. pH에 대한 효소의 안정성은 pH 6.5-7.5 사이의 영역에서는 별 영향을 받지 않았으며, pH6.0 이하와 pH 8.0 이상의 산, 알칼리 영역에서는 안정성이 크게 떨어졌다.

활성 최적 온도를 실험한 결과 40°C에서 최적 활성을 나타내었고, 37°C와 50°C에서는 각각 15%와 20%의 활성이 저하되는 것으로 확인되었다. 그리고 30°C 이하의 온도에서는 급격히 활성이 저하되는데, 이는 저온에서 기질인 환천의 점성이 높아지는 것과 상관성이 있는 것으로 판단되었다(Figure 6). 온도에 대한 안정성은 40°C에서 10%, 50°C에서는 20% 정도의 활성이

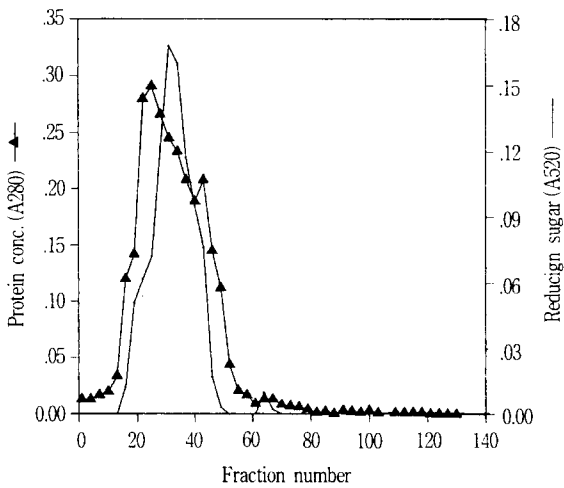


Figure 2. Sephadex G-100 chromatogram(\varnothing 2.6 \times 100cm) of the agar positive fraction obtained crude enzyme obtained by the DEAE-Cellulose chromatography for purifying the agarase. ▲; prtein concentration, —; reducing sugar. The enzyme was eluted with 30mM Tris-HCl buffer(pH7.0). The flow rate and fraction volume was 40ml/hr and 6ml, respectively.

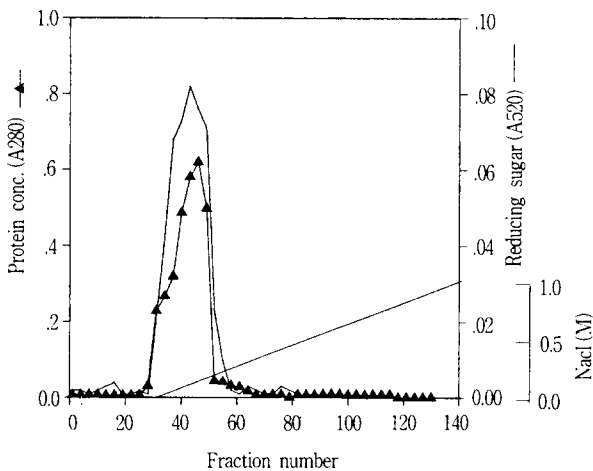


Figure 3. CM-Sephadex chromatogram(\varnothing 1.5 \times 25cm) of the agar positive fraction obtained by the Sephadex G-100 chromatography for purifying the agarase. ▲; prtein concentration, —; reducing sugar. The enzyme was eluted with a gradient of 0-1.0M in 30mM Tris-HCl buffer(pH6.5). The flow rate and fraction volume was 30ml/hr and 6ml, respectively.

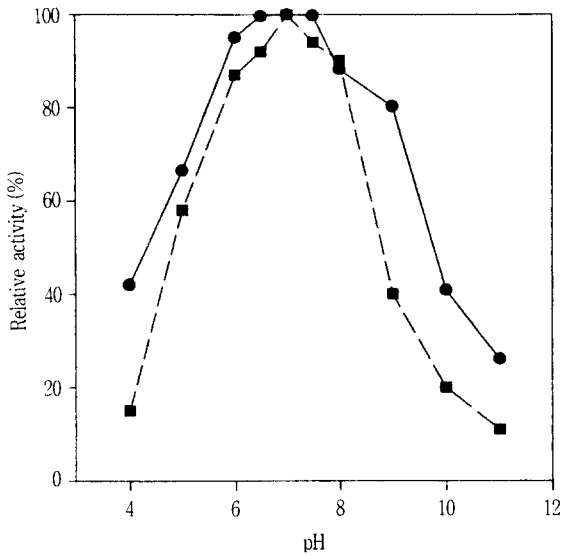


Figure 5. pH dependence of the activity(-■-) and stability (-●-) of agarase under the preincubation conditions. The buffer used for the reaction were 0.1M sodium acetate-acetate (pH 4.0-6.0), 0.1M Tris-HCl(pH 7.0-9.0) and sodium carbonate-sodium hydroxide carbonate(pH 10.0-11.0).

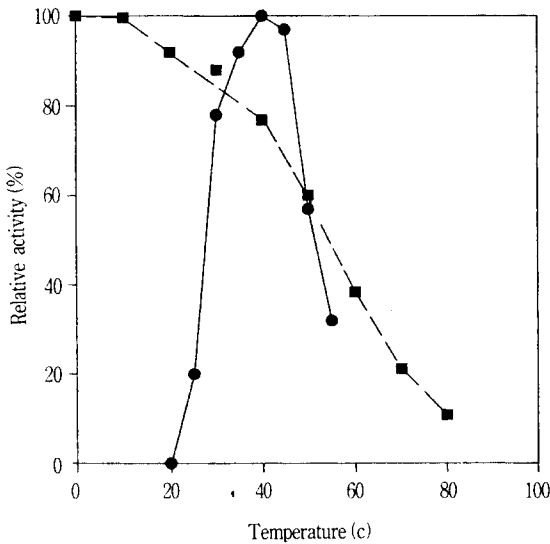


Figure 6. Temperature dependence of the activity(-■-) and stability(-●-) of agarase under the preincubation conditions. The buffer used for the reaction was 30mM Tris-HCl, pH 7.0. The enzyme was preincubated for 30min at different temperature.

감소하는 것으로 나타났는데, 이는 해양 유래 세균이라는 측면에서는 본다면 온도에 대한 내성이 높은 것으로 판단되며, 기질과 관련하여 향후 응용의 측면에서도 큰 문제는 없을 것으로 판단된다.

효소활성에 미치는 첨가물의 영향

효소활성에 미치는 NaCl의 영향을 알아본 결과(Figure 7), 무

첨가구에서는 활성이 거의 나타나지 않았고, NaCl 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하여 0.35M NaCl 농도에서 최대활성을 보인후 그 이상의 농도에서는 다소 감소하는 경향을 보였는데, 이는 주 등(14)이 보고한 또 다른 해양 다당류 분해 세균에서도 비슷한 결과를 보여주고 있는데, 해양 미생물의 생육에는 적절한 삼투 조절 물질이 요구된다는 것과는 관련이 있는 것으로 생각되어진다(15).

1,2가 중금속 이온의 경우 Ba²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Zn²⁺에 의해서는 현저하게 활성이 저해되었고, Li⁺, K⁺ 등의 1가 양이온과 Mg²⁺, Ca²⁺에 의해서는 활성이 약하게 저해되는 것으로 나타났다(Table 2). 이들 금속이온들은 기질인 한천과의 반응에 의한 기질간의 결합 구조 증가고 효소 활성에 영향을 주는 것으로 추정되었다.

Table 2. Effect of metal ions on the agarase activity.

Metal ion*	Relative activity(%)
Control	100
K ⁺	88.2
Li ⁺	89.5
Ba ²⁺	38.4
Ca ²⁺	90.8
Cnd ²⁺	39.6
Cu ²⁺	31.8
Hg ²⁺	15.2
Mg ²⁺	98.3
Mn ²⁺	60.4
Zn ²⁺	38.2
NH ⁴⁺	78.3

* Chloride form

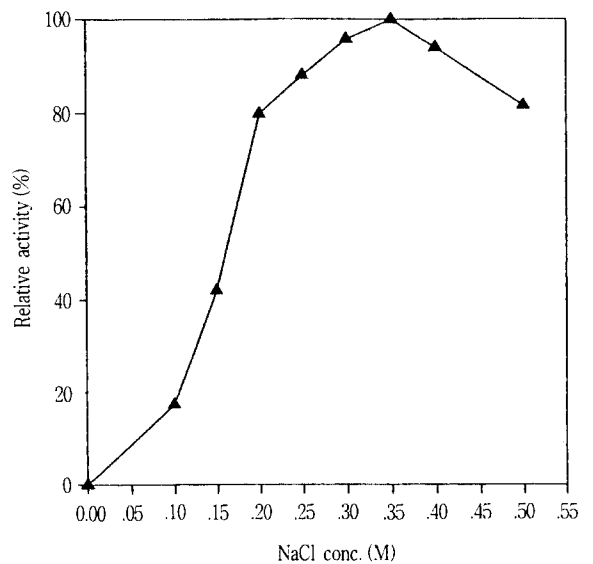


Figure 7. Effect of NaCl concentration on the agarase activity. The used buffer was in the reaction mixture 30mM Tris-HCl, pH 7.0.

다당류에 대한 효소의 분해능

본 실험에 사용된 효소의 다른 종류의 다당류에 대한 활성을 실험한 결과(Table 3) 시판 한천(Sigma Co.)과 비교해 볼 때, 국내 생산[(주)명신] 한천에서 8% 정도 더 높은 활성을 보였고, 본 실험을 위해 연구실에서 직접 제조한 한천의 경우 약 10% 정도 낮은 활성을 보였다. 함황 다당류·카라기난에 대해서는 15% 정도의 분해 활성을 나타내었으며, 그 밖에 수용성 전분, 알긴산, CMC, pectin, dextrin 등에 대해서는 전혀 활성이 없는 것으로 확인되었다. 이는 본 실험 효소가 한천에 대해 특이적인 활성을 보여주는 유도 효소의 일종으로 판단되어졌다.

Table 3. Substrate specificity of the agarase.

Substrate.	Relative activity(%)
Control	100.0
A-b* ¹	108.1
A-c* ²	91.5
Carrageenan	15.3
Soluble starch	-
Na-alginate	-
Carboxylmethyl cellulose	-
Dextrin	-
Pectin	-

* 1 commercial agar

* 2 prepared agar from seaweed in Lab.

요 약

Cytophaga sp.ACLJ-18이 생산하는 한천 분해 효소를 정제한 후 분자량을 측정 한 결과 24,700 달톤의 단량체인 것으로 확인되었다. 이 효소의 활성 최적 조건 및 안정성을 실험한 결과 pH는 중성부근, NaCl 0.35M, 40℃에서 최대 활성을 보였고, 중성부근의 pH와 40℃ 이하의 온도에서 안정성이 있는 것으로 보였으며, 37℃ 이하의 온도에서는 기질의 점도 증가로 활성이 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 효소 활성에 미치는 금속이온의 영향은 NaCl은 생육에 반드시 필요한 성분임이 확인되었고, 대개의 금속이온은 활성을 저하시켰다. 기질 특이성에 있어서는 한천에만 작용하는 효소였고, 기타 전분질이나 산성 다당류 펙틴, CMC 등에는 활성이 전혀 없었다.

감사의 말

본 연구는 1994년 한국과학재단 연구비 지원(과제번호:94-0402-07-01)으로 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 깊이 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 西澤一俊, 村杉幸子(1991), 海藻の本, pp. 30-38, 研成社, 日本.
2. Araki, C. L.(1965), Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes, pp. 3-17, In E. G. Young, and J. L. Maclachan(ed.), Proc. Int. Seaweed Symp. 5, Pergamon Press, London.
3. 林金雄, 岡崎彰彰夫(1970), 寒天ハンドブック, p. 3, 光琳書院, 東京.
4. Rees, D. A.(1969), Structural conformation and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Biochem.*, **24**, 267-332.
5. Duckworth, M. and W.Yaphe(1971), The structure agar. Part 1. The fractionation of a complex mixture of polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, **16**, 189-197.
6. Gloleau, D. and W.Yaphe(1977), Enzymatic hydrolysis of agar; purification and characterization of β -neogarrate-trose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*, *Can. J. Microbiol.*, **23**, 672-679.
7. Yasushi, S., 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.
8. Leon, O. L. Quintana, G. Peruzzo, and J. C. Slebe(1992), Purification and properties of an extra-cellular agarase from *Alteromonas* sp. C-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 4060-4063.
9. 조순영, 주동식, 최용석, 김옥선, 송해미, 이용호(1996), 한천 분해균 *Cytophaga* sp. ACLJ-18의 분리 및 효소 생산 조건 최적화, *한국생물공학회지*, **11**(5), 593-599.
10. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall(1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
11. Somogyi, M. and N. Nelson(1952), Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
12. Davis, B.J.(1964), Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein, *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404-427.
13. Laemmli, U.K.(1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the Bacteriophage T₄, *Nature*, **227**, 680-686.
14. 주동식, 이정식, 박중재, 조순영, 안창범, 이용호(1995), 알긴산 분해균 *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체내 효소의 정제 및 특성, *한국산업미생물학회지*, **23**(4), 432-439.
15. Baxter, R. M.(1959), An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*, *Can. J. Microbiol.*, **5**, 47-57.