

해양세균 *Cytophaga* sp. AYK301의 분리·동정 및 한천분해효소 생산을 위한 최적배양조건

이 원 경·김 봉 조·하 순 득·*공 재 열
부경대학교 식품생명공학부
(접수 : 1999. 9. 2., 게재승인 : 1999. 10. 7.)

Isolation and Identification of Marine Bacterium *Cytophaga* sp. AYK301 and Optimal Culture Conditions for the Production of Agarase

Won-Kyung Lee, Bong-Jo Kim, Soon-Duck Ha, and Jai-Yul Kong†
Division of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
(Received : 1999. 9. 2., Accepted : 1999. 10. 7.)

A marine bacterium with highly effective agar degrading activity was isolated from the southern sea of Korea (Chonnam, YoChon) and identified as *Cytophaga* sp. and named as *Cytophaga* sp. AYK301. This strain produced an extracellular agarase which had a high activity with agar. The optimum culture conditions for the production of agarase have been determined. For the increase of agarase productivity, 0.2% agar, 0.3% beef extract, and 0.05% NH_4NO_3 were used as carbon, organic and inorganic nitrogen source, respectively. The optimal initial pH, NaCl, culture time and temperature for the agar degrading activity were 7.5, 7.0%, 36 hr and 25°C, respectively. In the optimal culture conditions, the agarase production was increased up to more than 4.0 folds as compared to that by the basal medium.

Key Words : agarase, *Cytophaga*, marine bacterium

서 론

우리 나라 연안에는 다양한 종류의 해조류가 존재하고 있으며, 그 종류는 약 1천종이 넘을 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). 또한, 이들 해조류는 예로부터 식용, 사료, 비료 및 해조공업의 원료 등으로 널리 이용되고는 있지만, 그 채취에 많은 인력이 요구되고 용도 면에 있어서도 자연 채취상태 또는 단순 가공을 거친 후 값싼 원료상태로 판매되고 있기 때문에 그 부가가치가 매우 낮은 실정이다. 따라서, 국내에서 생산되는 한천의 경우 해마다 그 생산량이 3,600톤(약 50억원)에 이르고 있으나, 생산량의 6.5% 정도만이 단순 가공되어 값싼 원료로 사용되어 질 뿐이며 그 나머지의 대부분이 방치되고 있다(2). 특히 시약용이나 의약용으로 사용되고 있는 고가제품의 경우에는 오히려 수

입에 의존하고 있다. 게다가, 최근 들어 급속히 진행되고 있는 해양오염 및 이로 인한 생태계의 파괴 등은 지금까지의 해조류에 대한 이용 한계성을 가속화시키고 있다. 이에 풍부한 국내 수산자원임에도 불구하고 부가가치가 낮은 해조류에 대하여 이를 이용한 새로운 용도 및 부가가치 향상을 위한 연구개발이 크게 요구되고 있다(2, 3).

한편, 이러한 해조류는 공업적으로나 식량으로서 다양하게 사용되고 있는 polysaccharide를 함유하고 있는데 그 구조가 매우 복잡하여 생화학적·생리학적 연구를 행하는데 있어 큰 어려움을 유발시키고 있다. 그래서 많은 연구자들은 이들의 구조를 밝혀내는데 주 목적을 두고 화학적, 효소학적 방법을 동원하고 있다(4, 5). 이 중 비교적 지명도가 높은 한천은 홍조류에서 추출된 gelatin과 같은 점질성의 polysaccharide이다. 이와 같이 한천의 산 가수분해 또는 효소분해에 의해 생성되는 한천올리고당은 전분노화 억제, 난분해성, 장내유용세균 증식인자로서 정장효과, 당뇨병, 비만, 변비 등의 치료에 효과적인 기능성 식품소재인 것으로 보고되고 있다(2). 그런데 산 가수분해시에는 한천에 함유되어 있는 고유의 비타민이나 무기질 등이 다량 파괴되고 올리고당의 기능성 유지 및 안정성 유지 등이 문제가 되기 때문에 효소분해에 의한 방법이 보다 유용한 것으로 알려져 있다(6). 따라서 한천올리고당의 대량생산 또는 산업적 이용을 위해서는 우선적으로 고효율을 지닌 한천분해효소 및 이를 이용한 한천올리고

† Corresponding Author : Division of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, 599-1, Deayon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea
Tel & Fax : 051-620-6181
E-mail : kongjy@dolphin.pknu.ac.kr

당의 대량생산에 관한 연구개발이 이루어져야 하며 지금까지 보고된 경우, 미생물을 중심으로 한 한천분해효소의 생산에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다(6-12). 지금까지, 본 연구자 등은 한국 남해안으로부터 뛰어난 한천분해능을 지닌 새로운 해양세균을 분리하여 그 특성에 관하여 보고한 바 있으며, 한천분해능을 가진 해양미생물의 분리와 분리된 미생물로부터 한천분해효소의 분리·정제에 관한 연구를 진행하여 왔으며, 그 성과의 일부를 보고하였다(3, 13-16).

따라서, 본 연구는 해양자원으로부터 한천분해능이 뛰어난 신규 미생물을 분리하여 동정함과 동시에 그 세균학적 특성을 조사함을 목적으로 하고, 본 균주를 이용한 효소생산 최적화에 영향을 미치는 영양요구성과 배양조건을 연구하여 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주분리 및 보존

우리 나라의 연안에서 채집한 해수와 해조류를 이용하여 한천분해능을 지닌 균주를 분리하여 25℃에서 48시간 배양한 후 뛰어난 한천 분해능을 보인 균주를 2차 분리하여 본 실험에 사용하였다. 분리된 균주는 20%(v/v) glycerol을 첨가하여, -70℃ 냉동고에 보관하며 본 실험에 사용하였다.

배지조성 및 배양방법

균주의 분리 및 배양을 위한 배지조성으로는 증류수 1 L당 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, MgCl₂ · 6H₂O 10.6 g, CaCl₂ 1.1 g, Na₂SO₄ 3.9 g, NaHCO₃ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.01 g, Tris-HCl 6.05 g/pH 7.0의 인공해수에 0.3%(w/v) beef extract, 0.5%(w/v) yeast extract, 0.5%(w/v) peptone, disodium phosphate 0.008 g이 첨가된 배지를 기본배지로 사용하였다(17).

평판배지에서 얻어진 각종 분리균주를 10 mL 시험관의 액체배지 3 mL에 1차 접종하고, 25℃, 48시간 진탕배양한 다음, 액체배지 50 mL를 함유한 250 mL 삼각 플라스크에 전배양액 1%(v/v)를 2차 접종한 후 25℃, 진탕배양기에서 180 rpm으로 36시간 진탕배양하였다.

분리균주의 동정

해양으로부터 분리된 한천분해균의 동정은 각종 형태, 생리, 생화학적 특성검사를 행하였으며, 얻어진 결과들을 토대로 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*와 비교하여 동정하였다(18). 분리균의 형태는 전자현미경(TEM, HITACHI H-600, Japan; SEM, DSM940A, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

효소활성측정

한천분해효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogyi-Nelson 법으로 행하였다(19). 0.1%(w/v)의 agarose가 포함된 기질용액(10 mM Sodium phosphate 완충용액, pH 7.8)을 중탕가열하고 40℃까지 서서히 냉각시킨 후에 조효소용액을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그 다음, 반응액에 Somogy 시약을 첨가하여 10분간 끓인 후, 실온으로 냉각시켜, arsenomolybdate 시약을 첨가하고, 12,000 rpm에서 2분간 원심분리한 상층액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 이때, 한천분해효소의 활성은 1분당 1 μmol의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit로 정의하였으며, 표

준직정곡선으로 galactose를 사용하였다.

균주의 성장

분리균의 배양시간에 따른 성장곡선에서 세포증식은 진탕배양 후 얻어진 각각의 배양액을 흡광도 660 nm에서 측정하였다.

온도의 영향

한천분해능이 우수한 균주를 선별한 후, 효소생산증가에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 각각 다른 온도 (20, 25, 30, 37℃)에서 배양한 후 각각의 시료를 채취하여 각 온도에서의 균체성장 및 효소생산량을 측정하였다. 분리균의 배양에 따른 성장곡선은 진탕배양 후 얻어진 각각의 배양액을 흡광도 660 nm에서 측정함으로써 구하였다.

탄소원의 영향

기본배지에 각종 탄소원을 0.3%(w/v)씩 첨가하여 배양한 후 조효소용액의 효소활성을 측정함으로써 한천분해효소 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하였다. 또한, 이들 중 가장 효과적인 탄소원을 선정하여 0.0~1.0%(w/v)농도별로 재배양한 후, 효소생산 향상을 위한 최적농도를 결정하였다.

질소원의 영향

균의 성장 및 효소생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해서 beef extract, yeast extract를 제외한 기본배지에 각종 유기질소원을 0.5%(w/v)씩 가하여 배양하고 가장 효과적인 유기질소원을 선정하여 0.0~1.0%(w/v)범위에서 효소활성을 조사하였다. 또한 무기질소원의 영향을 조사하기 위해 (NH₄)₂SO₄를 제외한 인공해수에 각종 무기질소원을 0.1%(w/v)씩 첨가하여 배양하고 가장 효과적인 무기질소원에서의 최적농도를 결정하였다.

초기 pH의 영향

효소생산량에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 효소생산배지의 초기 pH를 1N-HCl 및 NaOH로 pH 4~10까지 조절하여 배양한 후, 효소활성을 측정하였다.

NaCl 농도의 영향

NaCl 농도에 따른 균체성장과 효소생산증가에 미치는 영향을 조사하기 위하여, NaCl농도를 0~9%(w/v)까지 조절한 인공해수를 이용하여 만든 배지상에서 균체를 배양한 후 배양상층액의 효소생산량을 측정하였다.

금속이온의 영향

균의 성장 및 효소생산에 미치는 금속이온의 영향을 조사하기 위해 최적 탄소원, 질소원 및 아미노산이 첨가된 배지에 각종 금속이온용액을 첨가하여 배양하였다. 금속이온 표준용액(Showa Co. Japan)과 EDTA(Sigma Co. USA)를 0.1 mM씩 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

국내연안으로부터 채집한 해수 및 해조류로부터 분리된 균주

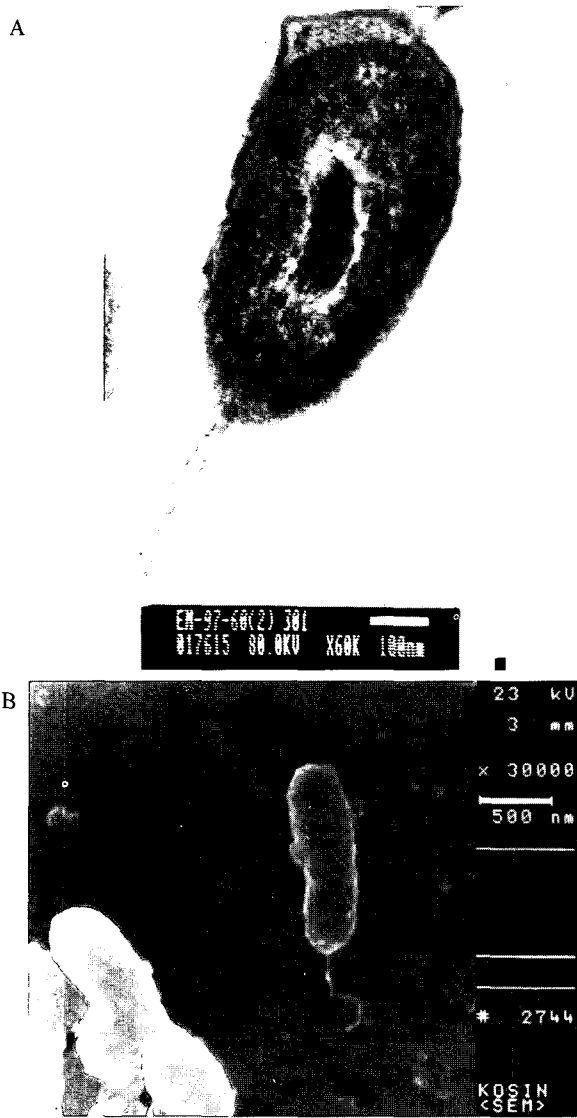


Figure 1. Photograph of isolated marine bacterium AYK301. (A) Transmission electron micrography (TEM, ×60,000) (B) Scanning electron micrography (SEM, ×30,000)

들 중 한천 평판배지를 함몰시키는 한천분해능이 뛰어난 균주를 1차 선별하였다. 각각의 균주를 0.3%(w/v) 한천을 포함한 기본 배지에서 각각 25°C, 180 rpm, 48시간 진탕배양한 후, 배양액 중의 환원당 값을 Somogyi-Nelson 방법(19)에 의해 조사함으로써 한천분해능을 측정하였으며, 측정결과로부터 한천분해능이 가장 뛰어난 균주를 선별하였다.

분리된 균주의 각종 형태, 생리, 생화학적 특성을 검사한 결과를 Figure 1과 Table 1에 나타내었다. 분리균주는 Gram(-)이고, 운동성을 가지는 간균 형태로 세로 1.5~2.0 μm, 가로 2.0 μm 크기를 가지며 Catalase 양성반응을 나타내었다. 그 외의 여러 가지 특징들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 토대로 조사한 결과(18), 본 실험균주는 *Cytophaga* sp.인 것으로 동정되었으며, 이 균주를 *Cytophaga* sp. AYK301로 명명하였다.

배양온도의 영향

배양온도에 따른 효소생산량은 enzyme activity(units/mL)로 나

Table 1. Biochemical and physiological characteristics of isolated marine bacterium AYK301.

Characteristic tested	Results	Characteristic tested	Results
Morphology		L-Alanine	+
Gram	-	L-Proline	+
Motility	+	5-Ketogluconate	+
Bacilli		Glycogen	+
Oxidase	-	3-Hydroxy-benzoate	+
Catalase	+	L-Serine	+
Length of cells(μm)	1.5~2.0	Manitol	+
Width of cells(μm)	2.0	D-Glucose	+
Optimum temperature(°C)	25	Salicin	+
Growth on seawater media	+	D-Melibiose	+
Utilization of :		L-Fucose	+
Rhamnose	+	D-Sorbitol	+
N-Acetylglucosamine	-	L-Arabinose	+
D-Ribose	+	Propionate	+
Inositol	+	Caprate	+
D-Saccharose	+	Valerate	+
Maltose	+	Citrate	+
Itaconate	+	Histidine	+
Suberate	+	2-Ketogluconate	+
Malonate	+	3-Hydroxy-butyrate	+
Acetate	+	p-4-Hydroxy-benzoate	+
DL-Lactate	+		

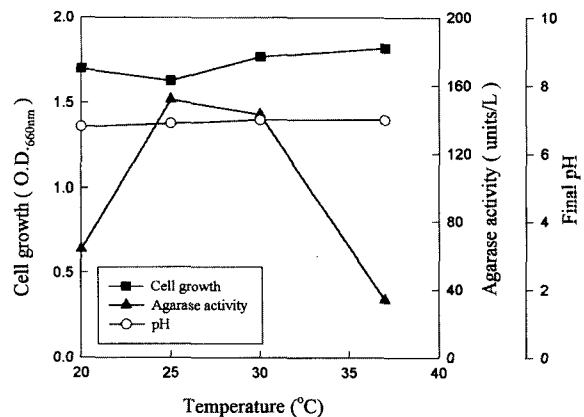


Figure 2. Effect of temperature on the cell growth and the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

타내었으며, 효소생산을 위한 최적온도 검토는 20, 25, 30, 37°C 범위에서 실험을 행하였다. 해양세균의 일반적인 특징처럼 육상 유래 세균의 평균적 배양온도 범위보다 다소 낮은 온도인 25°C에서 최대의 효소활성을 보였으며, 30°C까지 유지되다가 37°C에서는 급격히 저하되는 것으로 나타났다(Figure 2).

탄소원의 영향

균체성장과 효소생산성 향상을 위한 탄소원의 영향을 단당 및 복합다당류를 이용하여 살펴본 바, 탄소원에 따른 균체성장과 효소활성과의 관계는 서로 비례하지 않았으며, agar 및 agarose가 한천분해효소활성에 영향을 미치고 있었다(Table 2). 본 균주는 agar를 탄소원으로 사용하였을 때 균체성장과 효소활성이 가장 촉진되었으나, 다른 탄소원에서는 거의 활성이 나타나지 않

Table 2. Effect of various carbon sources on the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

C-sources	Cell growth (O.D. _{660nm})	Final pH	Agarase activity (units/L)
Control	0.17	6.8	3.5
Agar	1.72	6.5	154.5
Agarose	1.98	6.4	86.4
Corn starch	2.18	6.3	13.2
Potato starch	2.10	6.3	34.7
Wheat starch	2.16	6.3	10.9
Soluble starch	2.06	6.4	37.7
Lactose	1.75	6.7	16.8
Maltose	1.78	6.6	44.0
Saccharose	2.20	7.6	23.2
Glucose	1.80	6.5	24.4
Fructose	0.27	7.2	28.8
Galactose	0.41	7.0	49.0
Gluconolactone	0.06	5.2	8.9
Mannitol	0.26	7.1	17.5
D-sorbitol	0.28	7.0	18.7
Galactomannan	0.65	7.0	22.0

Table 3. Effect of various organic nitrogen sources on the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

N-sources	Cell growth (O.D. _{660nm})	Final pH	Agarase activity (units/L)
Control	0.14	7.1	16.3
Yeast extract	0.76	6.1	38.7
Casein	0.53	5.1	54.0
Bacto peptone	0.77	5.7	28.0
Tryptone	0.80	5.9	92.5
Beef extract	0.90	5.8	195.7
Gelatin	0.74	5.5	30.0
Urea	0.74	7.8	60.4
Malt extract	0.61	4.8	30.0
Proteose peptone	0.82	6.0	40.5

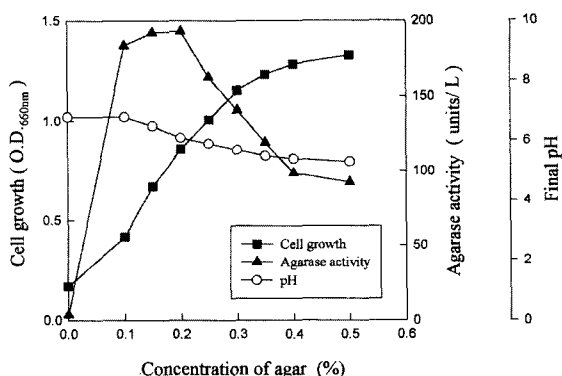


Figure 3. Effect of concentration on the cell growth and the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

는 것으로 미루어, agar가 한천분해효소의 생산을 위한 유도체역 할을 하는 것으로 사료된다. 그러므로, 효소생산능이 높은 agar를 0.0~0.6%(w/v) 농도별로 첨가하여 효소생산능의 최적조건을 살펴보았다. Agar를 기질로 넣어주지 않았을 때는 균체성장 및 효소활성이 나타나지 않았으며, agar 농도 0.2%(w/v)에서 최대 효소활성이 나타나고 그 이상에서는 기질저해 현상이 나타났다 (Figure 3). 따라서 이후의 실험에서는 탄소원으로 0.2%(w/v)의 agar를 사용하였다.

질소원의 영향

각종 질소원에 따른 균체증식과 효소활성의 비교는 크게 유기질소원과 무기질소원으로 나누어 조사하였다. 유기질소원은 기본배지에서 beef extract, yeast extract를 제외하고 yeast extract, casein, bacto peptone, tryptone, beef extract, gelatin, urea, malt extract, proteose peptone을 각각 0.5%(w/v) 첨가하여 실시하였다 (Table 3). 균체성장은 대체적으로 낮게 나타났으나, beef extract 첨가시 효소활성에 있어서 별 차이가 없었으므로 beef extract를 최적 유기질소원으로 선정하였고 농도별로 재배양하였다. 그 결

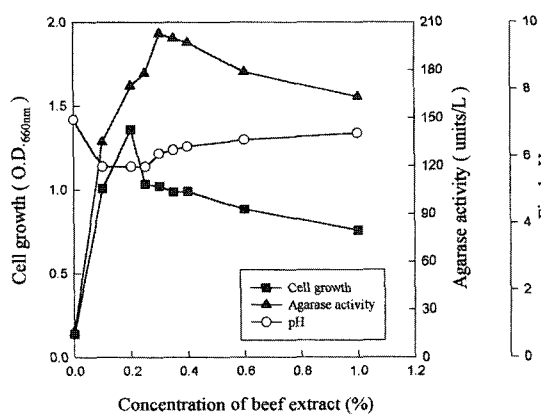


Figure 4. Effect of beef extract concentration on the cell growth and the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

Table 4. Effect of various inorganic nitrogen sources on the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

N-sources	Cell growth (O.D. _{660nm})	Final pH	Agarase activity (units/L)
Control	0.29	6.8	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.10	6.2	204.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.63	6.4	107.9
NH ₄ Cl	0.87	6.4	202.7
CH ₃ COONH ₄	1.08	7.3	171.0
NH₄NO₃	1.07	6.2	206.8
KNO ₃	0.75	7.5	180.5
NaNO ₃	0.71	7.5	170.2
NaN ₃	0.02	7.4	7.4

과 0.3%(w/v)에서 가장 높은 효소활성을 보였다(Figure 4).

무기질소원에 관한 영향은 각각 0.1%(w/v)의 (NH₄)₂SO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄Cl, CH₃COONH₄, NH₄NO₃, KNO₃, NaNO₃, NaN₃를 첨가하여 살펴보았다(Table 4). 이들 중 NaN₃만이 균의 성장을 크게 저해하였고, 효소활성은 (NH₄)₂SO₄ 보다 NH₄NO₃가 높은 효소활성을 나타내었으며, 0.0~0.5%(w/v)의 농도별 배양에서도 같은 결과를 보였다(Figure 5). 이 후의 실험에서는 유기질소원으로 0.3%(w/v) beef extract를 무기질소원으로 0.05%(w/v)의 NH₄NO₃를 사용하였다.

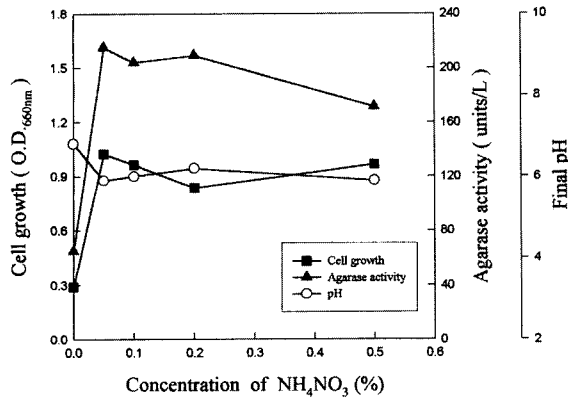


Figure 5. Effect of NH₄NO₃ concentration on the cell growth and the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

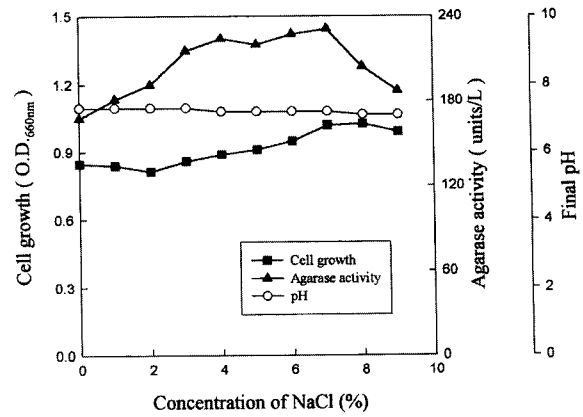


Figure 7. Effect of NaCl concentration on the cell growth and the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

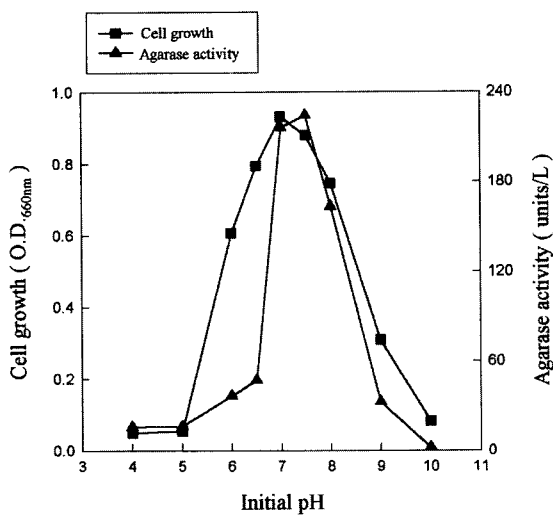


Figure 6. Effect of initial pH on the cell growth and the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

초기 pH의 영향

균체성장과 효소생산성에 미치는 초기 pH의 영향에 대한 실험결과, 중성범위인 pH 7.5에서 가장 높은 효소활성을 나타내었고, 산, 염기 범위에서는 균체성장과 효소생산이 매우 낮음을 확인하였다(Figure 6).

중성범위 pH에서 균체성장과 효소활성이 가장 높게 유지된 것은 분비효소의 작용 pH가 중성 부근이며, 이 부근에서 효소활성이 가장 안정화되기 때문인 것으로 사료된다.

NaCl 농도의 영향

일반적으로 해수에는 약 2.34%(w/v)의 NaCl이 함유되어 있으므로, 이에 서식하고 있는 해양미생물의 경우 배지중에 함유되어 있는 NaCl의 농도에 따라 그 생리적 특성이 변할 것으로 예상된다. 이에 분리균주의 배양배지 조제시에 사용되는 인공해수의 농도를 달리하여 균체성장과 효소생산에 미치는 영향을 조사하였다(Figure 7). 본 실험에서는 NaCl 농도가 7%(w/v)가 될 때까지 agarase activity가 계속 증가하여 최고 값을 나타내었으며 그 이상의 농도에서는 효소활성이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 또한 NaCl을 전혀 첨가하지 않았을 때 균체 성장은 어느 정도까지는 나타났으며, 2~7%(w/v)까지 일정하게 유지되다가 그 이

Table 5. Effect of various metal ions on the agarase production by *Cytophaga* sp. AYK301.

Metal ions	Cell growth (O.D. _{660nm})	Final pH	Agarase activity (units/L)
Control	0.95	6.9	220.5
Cr ²⁺	0.79	6.8	171.7
Mn ²⁺	0.81	7.0	227.2
Zn ²⁺	1.03	7.0	230.4
Pb ²⁺	0.82	6.9	223.5
Fe ²⁺	0.90	7.0	225.5
Cd ²⁺	0.95	6.9	210.5
EDTA*	1.11	6.9	229.0

*EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

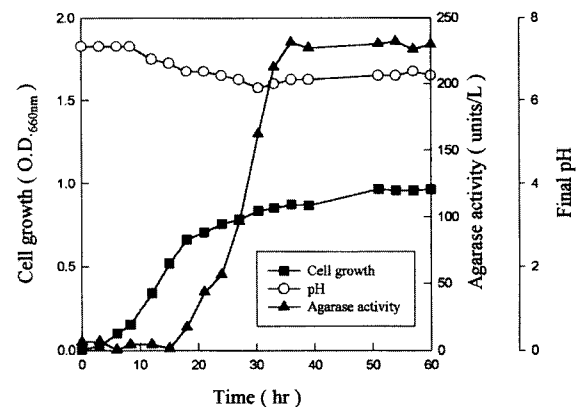


Figure 8. Time courses of the cell growth, the pH and the agarase production in 0.2% agar culture medium. *Cytophaga* sp. AYK301 was cultivated under the conditions of initial pH 7.5, 25°C and 180 rpm.

상에서는 감소한 것으로 보아 NaCl을 2~3%(w/v)만 첨가하여도 최대효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

금속이온의 영향

각종 금속이온들이 균 성장과 효소활성에 미치는 영향을 알아 보기 위해 해수성분에 이미 포함된 P, S, K, Mg, Ca, Na 등은 제외하고 그 외의 미량원소들과 금속이온의 작용을 저해하는 물질들을 0.1 mM씩 첨가하였다(Table 5). 그 결과, 대조군과 비슷

한 효소활성을 나타내었다.

최적조건하에서의 배양

앞서 실험한 각각의 최적조건하에서 시간경과에 따른 배양액을 채취하여 균체성장, pH 변화 그리고 효소생산을 알아본 결과, 균체성장은 약 18시간까지 급격히 성장하다가 이후로는 일정하게 유지되었고, pH는 배양과정에서 다소 산성으로 변했다. 한편, 효소생산은 12시간까지는 거의 생산량이 없다가 대수증식기가 지나 균체가 완전히 성장하고 난 후 15시간부터 급격히 생산이 증가하여 36시간부터 60시간까지는 균체성장과 효소생산량이 변화 없이 거의 일정하게 유지되었다(Figure 8). 따라서, 앞선 결과에서 최대 효소생산을 위한 배양시간은 36시간 정도가 적당하다고 사료되며, 36시간 배양하였을 때 231 units/L를 생산하여 기본배지를 사용하였을 때의 60 units/L 보다 약 4배 정도 효소생산량이 증가하였다.

요 약

해양으로부터 한천분해능이 뛰어난 균주를 한국의 서해(전남, 여천)으로부터 분리하여 *Cytophaga* sp.인 것으로 동정되었으며, 이 균주를 *Cytophaga* sp. AYK301이라 명명하였다. 균체성장과 효소 생산성 향상을 위한 탄소원의 영향을 단당 및 복합당류를 이용하여 살펴본 결과 본 균주는 agar기질을 사용하여 배양하였을 때 효소생산량이 가장 높은 것으로 확인되었으며, agar를 0.0~0.6%(w/v) 농도별로 첨가하여 효소생산능의 최적조건을 살펴보았다. 그 결과 0.2%(w/v) agar에서 최대효소활성을 나타내었다. 질소원의 영향은 유기질소원과 무기질소원으로 나누어 실험을 행하였는데 beef extract 0.3% (w/v), NH_4NO_3 0.05%(w/v)에서 각각 최고의 효소활성을 나타내었다. 또한, 초기 pH의 영향에서는 pH 7.5에서 효소활성이 가장 높게 나타났고, NaCl 농도의 영향에서는 7%(w/v)에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며, 각종 금속이온에 대한 효소활성은 거의 영향이 없는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 연구에서는 최적배양조건하에서 플라스크로 배양한 결과, 231 units/L를 생산하여 기본배지를 이용하였을 때 보다 약 4배 정도 효소활성이 증가하였음을 확인하였다.

사 사

본 연구는 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비 지원(과제 번호 : 1998-015-D00243)에 의해 이루어졌으며, 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. 해양수산통계연보 (1997), 해양수산부, p. 987.
2. 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**(1), 37-45.
3. 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, Shimizu, Japan.

4. 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**(10), 2531-2536.
5. Malmqvist, M. (1978), Purification and Characterization of Two Different Agarose-Degrading Enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **537**, 31-43.
6. 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**(5), 1549-1554.
7. Belas, R., D. Bartlett, and M. Silverman (1988), Cloning and Gene Replacement Mutagenesis of a *Pseudomonas atlantica* Agarase Gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(1), 30-37.
8. Buttner, M. J., I. M. Feamley, and M. J. Bibb (1987), The Agarase Gene(dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) : Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis, *Mol. Gen. Genet.*, **209**, 101-109.
9. Leon, O., L. Quintana, G. Peruzzo, and J. C. Slebe (1992), Purification and Properties of an Extracellular Agarase from *Aalteromonas* sp. Strain C-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(12), 4060-4063.
10. Agbo, J. A. C. and M. O. Moss (1979), The Isolation and Characterization of Agarolytic Bacterium from a Low Land River, *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 355-368.
11. Sampietro, A. R. and M. A. Vattuone de Sanpietro (1971), Characterization of the Agarolytic System of *Agarobacterium Pastinator*, *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 65-76.
12. van Hofsten, B. and M. Malmqvist (1975), Degradation of Agar by a Gram-Negative Bacterium, *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 150-158.
13. Hwang, S. H., S. D. Ha, J. D. Kim, S. K. Kim, and J. Y. Kong (1995), Isolation and Purification of Agarase from Marine Microorganism (*Pseudomonas* sp. W7), The 3rd Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition '95, pp. 57, 70-71, Maku-hari, Japan.
14. Kong, J. Y. and S. K. Bae (1996), 海洋微生物による機能性食品素材(寒天オリゴ糖)の生産, The 4rd Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition '96, p. 64, Maku-hari, Japan.
15. Kong, J. Y., S. H. Hwang, B. J. Kim, S. K. Bae, and J. K. Kim (1997), Cloning and Expression of an agarase Gene from a Marine Bacterium *Pseudomonas* sp. W7, *Biotech. Lett.*, **19**(1), 23-26.
16. Lim, D. J., B. J. Kim, S. K. Bae, J. D. Kim, and J. Y. Kong (1999), Immobilization of Agarase for the Agarooligosaccharide Production, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(3), 208-214.
17. Hwang, S. H., S. D. Ha, B. J. Kim, H. J. Kim, and J. Y. Kong (1999), Isolation and Its Optimal Culture Condition for High Agarase-Producing Mutant, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(3), 351-357.
18. Baumann, P., A. L. Fumiss, and J. V. Lee (1984), In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1-4, Williams & Wilkins, Baltimore.
19. Somogyi, M. (1952), Notes on Sugar Determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.