

## *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43이 생산하는 Carrageenase의 정제 및 특성

주동식 · 조순영<sup>†</sup> · 이정석\* · 이용호\* · 양승택\*\*

강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터

\*부경대학교 식품공학과

\*\*경성대학교 식품공학과

## Purification and Characterization of Carrageenase from *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43

Dong-Sik Joo, Soon-Yeong Cho<sup>†</sup>, Jung-Suck Lee\*, Eung-Ho Lee\* and Seung-Taek Yang\*\*

East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

\*Department of Food Science and Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

\*\*Department of Food Science and Technology, Kyungsoo University, Pusan 608-736, Korea

### Abstract

Our works performed for preparation of oligosaccharides from carrageenan, seaweed polysaccharide, and one active strain for carrageenan was isolated from sea water and identified to *Pseudomonas alcaligenes*. Carrageenan degrading enzyme was purified from the culture fluid of isolated strain-*Pseudomonas alcaligenes* JCL-43, by DEAE-Cellulose, Sephadex G-100, Q-Sepharose and CM Sepharose CL-6B column chromatography. Two enzyme -F-I, F-II- was identified this purifying process, and the molecular weight of the purified carrageenase were estimated to be 23.6kDa and 30.2kDa, respectively. The optimum pH and temperature for two carrageenase activity were 7.0 and 40°C. These enzymes were stable in the pH range of 6.0~7.5 and lower than 50°C, and required 1.5% NaCl for optimum activity. And these carrageenase were inhibited by metal ions such as Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, but increased by Ba<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, and showed specificity on  $\kappa$ -carrageenan.

**Key words** – Carrageenan, *Pseudomonas alcaligenes*, Oligosaccharide, Carrageenase

### 서 론

당질이 생체내에서 생명현상의 조절 인자로서 역할을 한다는 것이 밝혀진 것은 최근의 일이며, 이로 인해 과거의 에너지원이나 세포구조 성분으로서의 당질에 대한 인식이

상당히 바뀌고 있으며, 이러한 이유로 당질에 대한 관심과 연구가 활발하게 진행되고 있고, 당쇄공학이라는 학문영역이 생겨나기도 했다[3,20]. 이 중에서도 glycoprotein과 같은 복합 당질을 포함하는 mucopolysaccharide나 이와 유사한 함황 다당류에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있

<sup>†</sup>Corresponding author

다[3]. 황산기 함유 당질은 chondroitin sulfate, dermatan sulfate, keratan sulfate 등과 같은 동물조직이나 동물세포에 다량 함유된 것도 있지만[13], 해조식물에서 유래한 황산다당류도 있는데 한천과 카라기난을 들 수 있으며, 황산기의 함량이나 당질의 형태로 판단해 볼 때 카라기난을 대표적인 해조식물 유래 황산 다당류로 단정 지을 수 있다[17]. 카라기난은 홍조류의 돌가사리목에 속하는 해조나 지누아리목에 속하는 일부 해조에서 추출되는 점질성의 산성다당류이며, 황산기를 다량 함유하고 있어서 응고성이 약한 반면, 점성이 큰 것이 특징이다[18]. 카라기난이 갖고 있는 물성으로 겔화제, 증점제 등 주로 식품분야에 이용되어 왔고, 국내에서도 각종 홍조류를 원료로하여 카라기난을 제조하고 있으며, 이러한 카라기난은 갈락토스에 황산기가 다량 결합한 구조이고, 황산기의 결합 위치에 따라  $\mu$ -,  $\lambda$ - 및  $\iota$ -카라기난 등으로 나누며 종류에 따라 다양한 물성을 가지고 있다.

한편, 최근 기능성 물질로서 올리고당에 대한 관심이 매우 높으며, 식물 유래 다당류나 설탕 등을 기질로 이용하여 다양한 방법으로 여러 종류의 올리고당 생산에 대한 연구가 이루어졌다[16,19]. 이러한 올리고당의 생산에는 거의 대부분이 식물 유래 당질이 주로 이용되었으나, 최근에는 다양한 당질을 원료로 올리고당을 만들려는 연구가 행해지고 있으며, 그 한가지 당질원이 해조 유래 다당류이다. 최근 국내에서도 알긴산이나 한천을 이용하여 미생물 유래 효소를 이용한 올리고당의 제조가 시도되었으며 가능성이 충분히 있는 것으로 확인되었다[4-9]. 또한 카라기난으로부터도 올리고당을 만들기위해 카라기난 분해효소를 생산하는 카라기난 분해 균주를 검색하여 발표한 바 있다[15].

본 논문에서는 카라기난 분해 균주가 생산하는 효소를 정제하였으며, 그 특성을 밝혔기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

전보[15]에서 보고한 것과 같이 점도 저하능이 컸던 균주와 환원당 생성능 높았던 균주의 복합 배양에서 발생했던 문제를 해결할 수 없어서 환원당 생성능이 가장 높았던 균주인 *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43을 카라기난 분해 효

소 생산주로 이용하였다.

### 조효소 생산을 위한 배양

배양조건은 질소원으로서 0.7% nutrient broth, 탄소원으로 0.2% carrageenan, NaCl 1.5%, 0.5%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.0002%  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01%  $CaCl_2$ , pH 7.0, 배양 온도는  $30 \pm 0.5^\circ C$ , 배양시간 96시간으로하여 batch culture를 행하였고, 배양액을 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 이용하였다.

### 단백질 농도 측정

효소 정제 과정중의 단백질 희본의 검색은 분광광도계(UV/V spectrophotometer, Shimadzu UV-120-02)로써 280nm에서 흡광도를 측정하였고, 단백질 농도는 Lowry 등의 비색법[11]에 의해 bovine serum albumin을 표준단백질로하여 구한 검량 곡선으로부터 구하였다.

### 환원당 측정

효소반응에 따라 생성되는 환원당의 함량은 Somogyi-Nelson법[14]에 따라 시료 용액 1ml와 동(銅)시약 1ml를 시험관에 취하고 water bath에서 20분간 가열하여 산화제 1등을 생성시켰다. 여기에 몰리브덴 용액 1ml를 가하여 발색시킨 다음 520nm에서 흡광도를 측정하여 maltose를 이용하여 얻어진 표준 검량선으로부터 환원당을 정량하였다.

### 효소의 정제

최적의 생육조건에서 균을 배양한 다음 원심분리(12,000  $\times$ g, 20min)하여 상층액을 membrane filter(0.45 $\mu$ m)로 여과한 여액을 조효소액으로 하였다. 이 조효소액에  $-20^\circ C$ 로 조절된 아세톤을 65% 농도가 되게 첨가하면서 교반하여 효소를 침전시켰다. 침전된 효소를 원심분리(12,000  $\times$ g, 20min)하여 모으고, 30mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 용해시켰다. 다음 동일 완충액으로 저온에서 하룻밤 투석막(M.W. 10,000)으로 투석을 행한 조효소를 원심분리(12,000  $\times$ g, 20min)하여 상등액을 한외여과기로 농축을 행한 후, 동일 완충액으로 평형화시킨 DEAE-Cellulose( $\phi 3.0 \times 50$ cm)에 시료를 흡착시킨 다음 동일 완충액으로 만든 염용액을 사용하여 농도 구배법(0-1.0M NaCl)으로 용출시켰다. 이

렇게 얻어진 활성획분을 농축한 다음 동일 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-100( $\phi 2.5 \times 100\text{cm}$ )으로 용출·분획하였다. 카라기난에 대해 활성 획분에 따라 CM Sepharose CL-6B( $\phi 2.0 \times 80\text{cm}$ )나 Q-Sepharose( $\phi 1.5 \times 50\text{cm}$ )에 흡착시키고, 동일 완충액으로 만든 염용액을 사용하여 농도구배법(0-1.0M NaCl)으로 용출시켰고, 활성획분을 모아 순도 검정을 한 후 효소 특성 실험용 효소 용액으로 하였다.

#### 분자량 측정

순도 검정을 위한 분석은 Davis[2]의 Disc-PAGE(7.5% polyacrylamide gel electrophoresis)에 의하였으며, 분자량 측정은 Lammler의 방법[10]에 따라 SDS-분자량 표준 단백질에 대하여 10% SDS-PAGE를 행한 후 SDS-분자량 표준 단백질의 전기영동 이동도를 대조하여 효소의 구성 sub-unit의 분자량을 측정하였다.

#### 카라기난 분해 효소의 특성

##### 효소활성 최적조건

1) pH - 정제효소에 대해 1.5% NaCl이 함유된 0.6% 카라기난 2ml와 각 pH별 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 : 0.1M sodium carbonate-sodium hydrogen carbonate) 2ml를 혼합하여 반응(40°C, 90min)시킨 후 환원당을 측정하여 활성 최적 pH 조건을 구하였다. 이 때 효소 1unit은 1분간 1 $\mu\text{mole}$ 의 환원당을 생산하는 효소량으로 정의하였고, 효소 활성은 상대활성으로 나타내었다.

2) 온도 - 정제된 효소 0.5ml와 0.6% 기질 용액 2ml를 혼합하여 반응온도를 0°C에서 60°C까지 5~10°C 간격으로 조절하면서 각각 90분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 활성 최적 온도를 구하였다.

##### 효소의 안정성

1) pH - 정제효소를 pH 4.0에서 pH 11.0까지의 각 완충액에서 60분간 투석시킨 후 효소액과 기질을 혼합하여 반응시킨 후 환원당 측정으로 잔존 활성을 측정하여 효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 조사하였다.

2) 온도 - 정제효소를 0~80°C의 각 온도대에서 30분간 교반하면서 가온한 후 기질용액을 첨가하여 환원당을 측정함으로써 잔존활성을 측정하여 온도에 대한 안정성을 측정하였다.

#### NaCl 및 금속이온의 영향

0.6% 기질용액에 NaCl 농도를 0~3.0%로 달리 첨가하고, 효소활성에 미치는 NaCl의 영향을 측정하였다. 금속이온은 염화물(-Cl)형의 1, 2가 이온( $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{NH}_4^+$  등)과 효소를 혼합하여 기질과 반응시켜 환원당을 측정하여 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 즉 정제효소 0.5ml와 30mM Tris-HCl buffer(pH 7.0) 2ml와 0.2M 금속용액 0.01ml를 혼합하여 40°C에서 30분간 전반응 시킨 후, 이 혼합액에 0.6% 기질용액(0.25M NaCl 함유) 2ml를 가하여 40°C에서 90분간 반응시켜 환원당을 측정하였으며, 대조구로는 1.5% NaCl만 첨가한 것을 사용하였다.

#### 다당류에 대한 분해 활성

시판 카라기난과 동일한 농도의 추출·정제한 카라기난, soluble starch, carboxy-methyl cellulose(CMC), dextrin,  $\lambda$ -,  $\kappa$ -, 및 *l*-카라기난을 기질로하여 동일한 반응 조건에서 정제효소를 첨가하여 반응시킨 후 생성되는 환원당을 측정하여 카라기난 이외의 다당류에 대한 활성여부를 실험하였다.

## 결론 및 고찰

#### 효소의 정제

카라기난 분해 균주 배양액을 원심분리하여 아세톤 처리로 침전된 단백질 획분을 완충액에 녹여 투석을 행하고, 이를 농축한 다음 음이온 교환 수지인 DEAE-Cellulose 크로마토그래피를 행한 결과(Fig. 1), 카라기난에 대해 높은 활성을 나타내는 획분이 2개가 확인되었다. 한 획분은 음이온 교환수지에 흡착되지 않는 효소였고(F-I), 다른 획분은 음이온 교환수지에 흡착되는 효소였다(F-II). 각 획분별로 투석을 행한 후 농축을 행하여 Sephadex G-100 크로마토그래피를 행하였다. F-I 획분의 경우 활성이 강한 획분 대와 활성이 없는 획분이 나타났으며(Fig. 2), 활성이 강한 획분을 농축하여 양이온 교환수지인 CM Sepharose CL-6B를 이용하여 이온크로마토그래피를 행하였는데 활성이 강한 한 획분이 확인되었다(Fig. 3). 이 활성 획분을 모아 투석한 후 농축하여 전기영동으로 순도 검정을 한 결과, 단일의 단백질 획분이 확인되었다. 한편, F-II 획분의 경우도

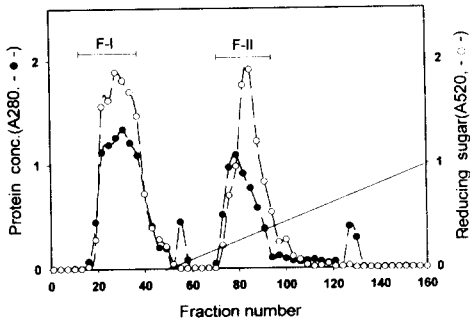


Fig. 1. DEAE-Cellulose chromatogram( $\phi$  3.0 $\times$ 50cm) of crude enzyme obtained from acetone precipitation. The enzyme were eluted with a gradient of 0.01~1.0M NaCl in 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The flow rate and fraction volum was 30ml/hr and 6ml, respectively.

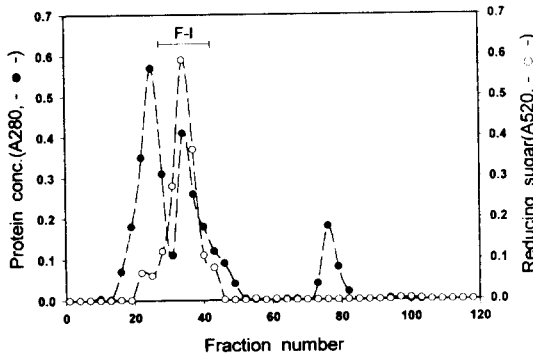


Fig. 2. Sephadex G-100 chromatogram( $\phi$  2.6 $\times$ 100cm) of the carrageenan positive fraction(F-I) obtained by the DEAE-Cellulose chromatography for purifying the carrageenase. The enzyme were eluted with 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The flow rate and fraction olum was 40ml/hr and 6ml, respectively.

활성이 강했던 획분을 Sephadex G-100으로 크로마토그래피를 행하여(Fig. 4), 카라기난 분해활성이 강했던 획분을 모아 농축하여 음이온 교환수지인 Q-Sepharose로 이온크로마토그래피를 행하였고(Fig. 5), 활성 획분을 모아 투석·농축하여 전기영동한 결과, 단일획분으로 구성된 효소였음이 확인되어 이 효소를 특성 실험용 효소로 하였다.

한편, 각 정제 단계별 정제 정도와 수율 등을 측정하여 Table 1에 나타내었다. F-I의 경우 DEAE-Cellulose를 크로

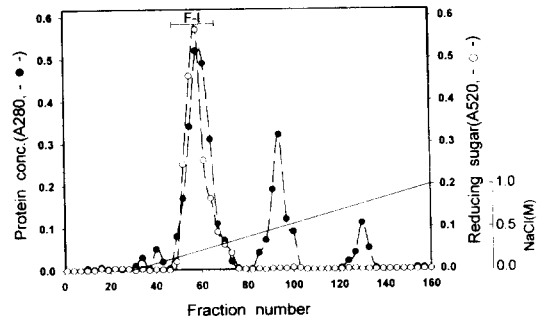


Fig. 3. CM Sepharose CL-6B chromatogram( $\phi$  2.0 $\times$ 100cm) of the carrageenan positive fraction(F-I) obtained by the Sephadex G-100 chromatography for purifying the carrageenase. The enzyme were eluted with a gradient of 0.1~1.0M NaCl in 3mM phosphate buffer, pH 6.0. The flow rate and fraction volume was 30ml and 6ml, respectively.

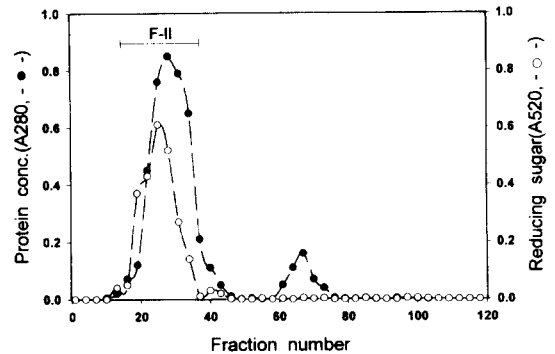


Fig. 4. Sephadex G-100 chromatogram( $\phi$  2.6 $\times$ 100cm) of the carrageenan positive fraction(F-II) obtained by the DEAE-Cellulose chromatography for purifying the carrageenase. The enzyme were eluted with 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0. The flow rate and fraction volume was 40ml/hr and 6ml, respectively.

마토그래피를 행한 효소의 경우 고유활성이 0.80U/mg, 수율은 11.18%였고, 정제도는 3.81배 였으며, CM Sepharose CL-6B로 정제를 마친 효소의 경우 고유 활성이 2.42U/mg, 수율은 1.62%, 정제도는 11.52배였다. F-II의 경우는 Sephadex G-100 크로마토그래피를 행한 효소는 고유활성이 1.64U/mg, 수율은 3.20%, 정제도는 7.81이었고, Q-Sepharose로 정제를 마친 효소는 고유활성이 3.38U/mg,

Table 1. Purification of carrageenase produced by *Pseudomonas* sp. JCL-43

(F-I)

Fraction	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield(%)	Purification (fold)
Cul.broth	7,800	1632	0.21	100	1
Acetone pre.	1,043	511.8	0.49	31.36	2.30
DEAE-Cell.	227.8	182.5	0.80	11.18	3.81
Sephadex G-100	47.9	57.9	1.21	3.55	5.76
CM Sepharose CL-6B	10.9	26.4	2.42	1.62	11.52

(F-II)

Fraction	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield(%)	Purification (fold)
Cul.broth	7,800	1632	0.21	100	1
Acetone pre.	1,043	511.8	0.49	31.36	2.30
DEAE-Cell.	198.2	141.9	0.72	8.69	3.42
Sephadex G-100	31.9	52.2	1.64	3.20	7.81
Q- Sepharose	8.1	27.4	3.38	1.68	16.09

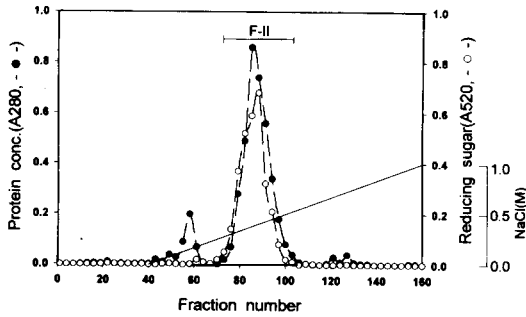


Fig. 5. Q-Sepharose chromatogram( $\phi$  2.5×50cm) of the carrageenan positive fraction(F-II) obtained by the Sephadex G-100 chromatography for purifying the carrageenase.

The enzyme were eluted with a gradient of 0.0~1.0M NaCl in 30mM Tri-HCl buffer, pH 7.5. The flow rate and fraction volum was 30ml and 6ml, respectively.

수율은 1.68%, 정제도는 16.09배였다.

효소의 분자량

정제 과정을 거쳐 얻어진 F-I 및 F-II 효소는 Fig. 6의 SDS-PAGE 분석에서 표준단백질과 대조하여 분자량을 측정 한 결과(Fig. 7), F-I 효소는 26.3kDa, F-II 효소는 30.2kDa 정도로 추정되었으며, 두 효소간에는 활성에서도 차이가 있었지만 분자량에서 다소 차이가 있는 효소였다.

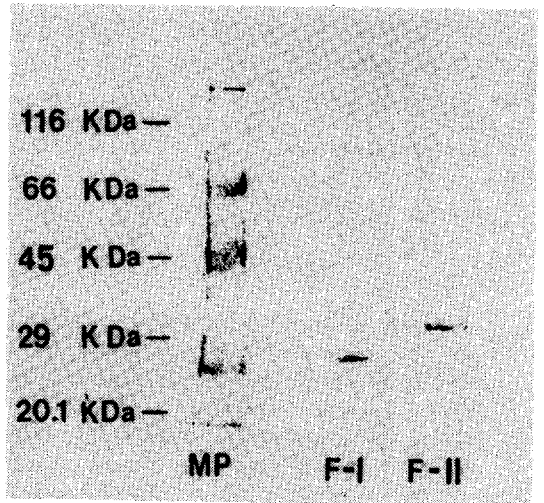


Fig. 6. SDS-Polyacrylamide gel electrophotogram of the purified F-I and F-II enzyme.

The letters of the photographs; MP: marker protein, F-I: fraction I enzyme, F-II: fraction II enzyme.

효소활성 최적조건 및 안정성

정제된 효소의 최적 활성 pH 조건을 실험한 결과(Fig. 8), F-I 효소와 F-II 효소 모두 최적 활성 pH는 7.0이었으나, F-I 효분은 pH 6.5에서 7.5까지, F-II 효분은 pH 6.0에서 pH 9.0까지 활성에서 큰 차이를 나타내지 않았으며, 특

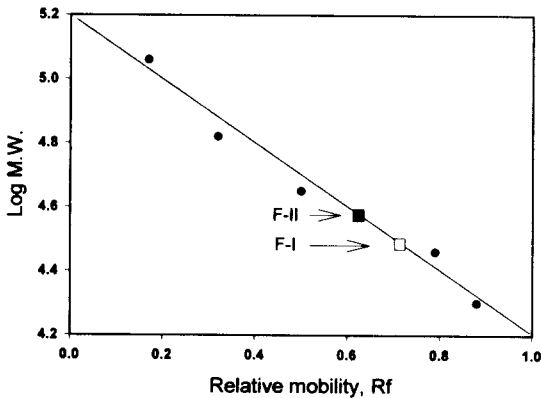


Fig. 7. Estimation of molecular weights of F-I and F-II enzyme by SDS-PAGE.

Molecular weight of markers  
 $\beta$ -Galactosidase: 116 kDa, Bovine serum albumin: 66 kDa  
 Ovalbumin: 45 kDa, Carbonic anhydrase: 29 kDa  
 Trypsin inhibitor: 20.1 kDa  
 Regression equation:  $M.W.=5.12-0.99X(r=-0.989)$

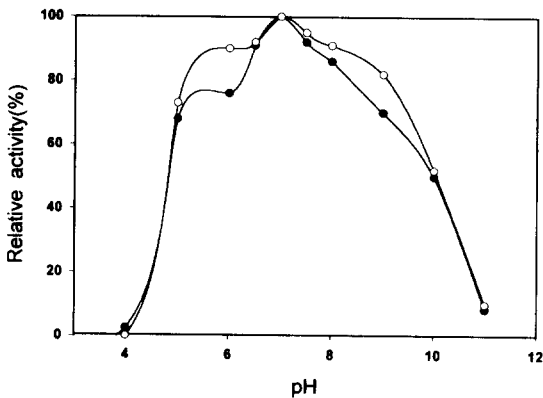


Fig. 8. pH dependence of the carrageenase.

The used buffer in the reaction mixture were 0.1M sodium acetate-acetate(pH 4.0-6.0), 0.1M Tris-HCl(pH 7.0-9.0), 0.1M sodium carbonate(pH 10.0-11.0).  
 Substrate concentration: 0.6% carrageenan(contain 1.5% NaCl), Enzyme concentration: F-I-46 $\mu$ g/ml, F-II-114 $\mu$ g/ml, Reaction condition: substrate 2.0ml, buffer soln. 2.0ml, enzyme soln. 0.5ml, temperature 40 $^{\circ}$ C, reaction time 90min.  
 Symbol: ● - F-I, ○ - F-II.

히 F-II 효소 획득이 훨씬 넓은 범위에서 높은 효소 활성을 보여주었다. Potin 등[12]은 *Cytophaga* sp.에서 유래한 carrageenase의 효소 활성 최적 pH는 7.2라고 보고한 바

있다. 활성 최적 온도 조건을 실험한 결과(Fig. 9), 두 효소 모두 40 $^{\circ}$ C에서 최적 활성을 나타내었으며, 45 $^{\circ}$ C와 50 $^{\circ}$ C에서도 상대활성이 90% 정도를 나타내어 대체적으로 낮은 온도보다는 높은 온도 영역에서 활성이 높음을 확인하였고, Potin 등[12]의 보고에서는 최적 활성 온도가 30 $^{\circ}$ C라고 한 것 보다는 훨씬 높은 온도였다. 이는 기질인 carrageenan이 30 $^{\circ}$ C 이하의 낮은 온도에서 높은 점성을 나타내어 효소 활성의 방해 요소로 작용한다는 것을 추정할 수 있었다.

정제효소를 각 pH의 완충액에 60분간 투석시킨 후 잔존 활성을 측정하여 효소의 pH 안정성을 실험과 결과는 Fig. 10과 같다. F-I 효소의 경우 pH에 매우 민감하여 pH 6.0이하와 pH 7.5 이상의 영역에서는 불안정한 것으로 나타났고, F-II 효소는 F-I 보다는 덜 민감하였는데, pH 6.0이하와 pH 9.0 이상에서 불안정한 것으로 나타났다. 온도에 대한 안정성을 확인하기 위하여 정제 효소를 0~80 $^{\circ}$ C의 온도에서 30분간 서서히 교반하면서 가온하여 잔류하는 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 11). F-I와 F-II 효소 모두 20 $^{\circ}$ C에서 5% 정도의 활성 소실이 일어났고, 40 $^{\circ}$ C에서는 15%, 50 $^{\circ}$ C에서는 20% 정도의 활성 소실이 확인되었다. 60 $^{\circ}$ C 이상에서는 80% 이상의 효소 활성이 소실되었는데, 본 실험에서 분리된 균주가 생산하는 효소는 열에 비교적

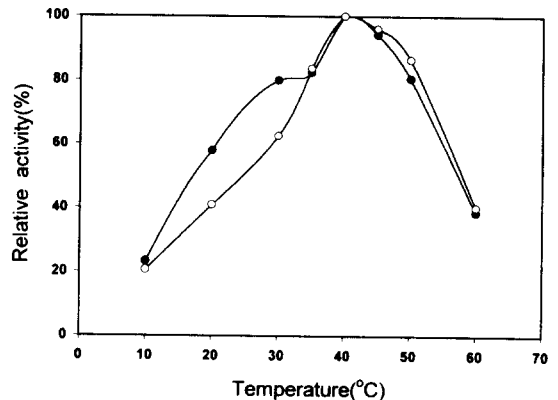


Fig. 9. Temperature dependence of the carrageenase.

The used buffer in the reaction mixture were 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0.  
 Substrate concentration: 0.6% carrageenan(contain 1.5% NaCl), Enzyme concentration: F-I-46 $\mu$ g/ml, F-II-114 $\mu$ g/ml, Reaction condition: substrate 2.0ml, enzyme soln. 0.5ml, buffer soln. 2.0ml, reaction time 90min.  
 Symbol: ● - F-I, ○ - F-II.

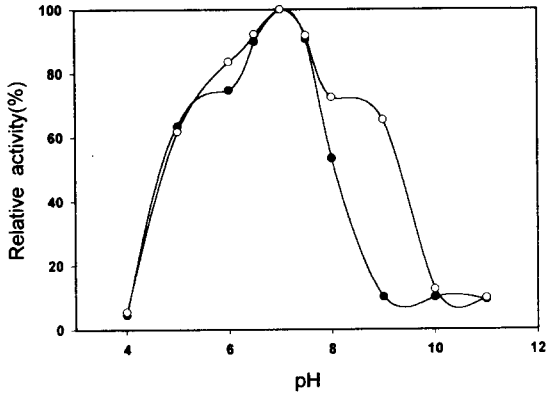


Fig. 10. Stability of the carrageenan at the different pH under preincubation condition.

The enzyme were preincubated for 60min by dialysing in the different pH buffer solution.  
 Substrate concentration: 0.6% carrageenan(contained 1.5% NaCl), Enzyme concentration: F-I-46 $\mu$ g/ml, F-II-114 $\mu$ g/ml, Reaction condition: substrate 2.0ml, buffer soln. 2.0ml, enzyme soln. 0.5ml, temperature 40 $^{\circ}$ C, reaction time 90min.  
 Symbol: ● - F-I, ○ - F-II.

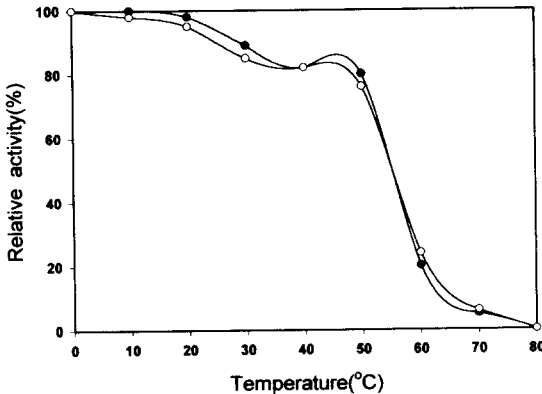


Fig. 11. Stability of the carrageenan at the different temperature under preincubation condition.

The enzyme were preincubated for 60min at different temperature.  
 Substrate concentration: 0.6% carrageenan(contained 1.5% NaCl), Enzyme concentration: F-I-46 $\mu$ g/ml, F-II-114 $\mu$ g/ml, Reaction condition: substrate 2.0ml, enzyme soln. 0.5ml, buffer soln. 2.0ml, reaction time 90min.  
 Symbol: ● - F-I, ○ - F-II.

안정한 것으로 확인되었다.

효소 활성에 미치는 첨가물의 영향

NaCl 농도에 따른 카라기난 분해 효소의 활성변화를 측정된 결과(Fig. 12), 두 효소 모두 NaCl 1.5%(약 0.25M)에서 최대 활성을 나타내었으며, 2.0% 이상의 NaCl 농도에서는 급격히 활성이 소실되었으며, 해수 염농도인 3.0% 부근에서는 70% 이상이 소실됨을 알 수 있었다. 일반적으로 해양 환경에서 생육하는 미생물은 삼투압 조절을 위해 일정 농도 이상의 염을 필요로 하는데[1], 이 때의 염 농도가 효소 활성에 중요한 영향을 미친다. 본 균주의 경우 생육 조건과 동일한 조건인 1.5% 염 농도에서 최대 효소 활성을 보였다. 한편, 1, 2가 금속이온이 효소 활성에 미치는 영향을 확인한 결과(Table 2), 두 효소 모두 반응액 중에 1mM 농도로 첨가한 Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>에 의해서는 활성이 현저하게 저해됨을 알 수 있었고, 반면에 F-I의 경우 Ba에 의해서 활성이 현저히 증가되는 경향을 보였다. 그 외 K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>에 의해서는 큰 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

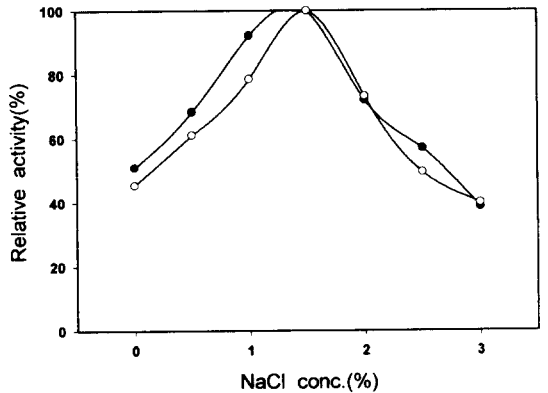


Fig. 12. Effect of NaCl concentration on the carrageenase activity.

The used buffer in the reaction mixture were 30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0.  
 Substrate concentration: 0.6% carrageenan  
 Enzyme concentration: F-I-46 $\mu$ g/ml, F-II-114 $\mu$ g/ml, Reaction condition: substrate 2.0ml, enzyme soln. 0.5ml, buffer soln. 2.0ml, temperature 40 $^{\circ}$ C, reaction time 90min.  
 Symbol: ● - F-I, ○ - F-II.

다당류에 대한 효소의 분해활성

F-I 및 F-II 효소의 시판 카라기난 이외 다른 다당류에 대한 분해 활성을 시험한 결과(Table 3), 두 효소 모두

Table 2. Effect of metal ions on the enzyme activity

Metal ion*	Relative activity(%)	
	F-I	F-II
control	100	100
K <sup>+</sup>	107	91
Li <sup>+</sup>	92	98
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	94	88
Ba <sup>2+</sup>	124	102
Ca <sup>2+</sup>	107	103
Cu <sup>2+</sup>	9	6
Mg <sup>2+</sup>	107	86
Zn <sup>2+</sup>	16	11
Mn <sup>2+</sup>	68	59
Hg <sup>2+</sup>	34	30

\*chloride form(1mM)

Table 3. Substrate specificity of carrageenases

Substrate	Relative activity(%)	
	F-I	F-II
Control*	100	100
K-C**	86.9	85.7
$\kappa$ -Carrageenan	91.4	90.2
$\iota$ -Carrageenan	25.6	19.1
$\lambda$ -Carrageenan	19.7	12.5
Soluble starch	-	-
Agar	-	-
Na-alginate	-	-
Carboxymethyl Cellulose	-	-
Dextrin	-	-

\* commercial carrageenan(Myeong Shin Co., Korea)

\*\*prepared carrageenan from seaweed(*Chondrus ocellatus*)

soluble starch, agar, Na-alginate, CMC 및 dextrin 등의 다당류에는 전혀 분해 활성을 나타내지 않았으며, 여러 종류의 카라기난 중에서도  $\lambda$ - 및  $\iota$ -carrageenan에는 거의 활성을 나타내지 않았으며,  $\kappa$ -carrageenan에 가장 활성이 높았는데, 이는 균주 검색용으로 사용한 시판 카라기난 보다 활성이 낮았다. 물론 검색에 이용한 카라기난은 복합 카라기난으로 성분은  $\kappa$ -carrageenan이 대부분이며 일부  $\lambda$ - 및  $\iota$ -carrageenan이 혼합된 것이기는 하지만 국내에서 생산한 시판 카라기난과 시약용으로 구입된 카라기난과는 구조적 차이에서 기인하는 것으로 판단된다. 이상의 결과

로 본 F-I 및 F-II 효소 모두  $\kappa$ -carrageenase라는 것을 추정할 수 있었다.

## 요 약

미생물 유래 효소를 이용하여 카라기난으로부터 올리고당을 제조하기 위해 해양으로부터 분해활성이 강한 한 균주를 선별하였고, 선별된 균주는 *Pseudomonas alcaligenes*로 분류되었다. 이 균주로부터 생산된 효소를 정제하고 특성을 밝혔는데, 본 균주가 생산하는 효소는 두 종류의 카라기난 분해 효소를 생산하는 것으로 확인되었는데, 분자량을 측정된 결과 F-I은 26.3kDa, F-II는 30.2kDa 인 것으로 추정되었다. 두 효소 모두 pH 7.0, 온도 40°C에서 최대 활성을 보였고, pH 6.0이하와 7.5이상에서는 상당히 불안정하였으며, 온도에 대해서는 상당히 안정하여 60°C 이상에서 활성이 소실되었다. 최적 활성에는 1.5% NaCl이 요구되었고, NaCl 무첨가구에서는 활성을 보이지 않았다. 두 효소 모두 2가 금속 이온에 의해 활성이 현저하게 저해되었으나, F-I은 Ba<sup>2+</sup> 이온에 의해 활성이 증가하였다. 대부분의 다당류에 대해 활성이 없었으며,  $\kappa$ -carrageenan에 대해 활성이 높았던 반면,  $\lambda$ - 및  $\iota$ -carrageenan에 대해서는 거의 활성을 나타내지 않았다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목적기초 연구비 지원(94-0402-07-01)과 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터의 지원에 의한 것입니다. 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

- Baxter, R. M. 1959. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.*, 5, 47.
- Davis, B. J. 1964. Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, 404-427.
- De Clercp, E. 1993. In "Carbohydrate and Carbohydrate Polymers", Edited by M. Yalpani, 609-613.
- Joo, D. S., Cho, S. Y. and Lee, E. H. 1998. Preparation of agar hydrolysates by agarase and functionality of



- the hydrolysates. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**(4), 378-82.
5. Joo, D. S., Choi, S. Y. and Lee, E. H. 1993. Isolation of alginate degrading bacteria and production of alginate degrading activities by bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Botechnol.* **21**(3), 207-213.
  6. Joo, D. S. and Lee, E. H. 1993. Purification of extracellular enzyme produced by *Vibrio* sp. AL-145. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**(2), 234-239.
  7. Joo, D. S., Lee, J. S., Cho, S. Y., Shin, S. J. and Lee, E. H. 1995. Changes in functional properties of alginic acid by enzymatic degradation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**(1), 86-91.
  8. Joo, D. S., Lee, J. S., Park, J. J., Cho, S. Y., Kim, H. K. and Lee, E. H. 1996. Preparation of oligosaccharides from alginic acid by enzymatic hydrolysis. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**(1), 146-151.
  9. Joo, D. S., Song, H. M., Lee, J. S., Cho, S. Y. and Lee, E. H. 1998. Characterization and purification of agarase from *Cytophaga* sp. ACLJ-18. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(1), 320-324.
  10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-686
  11. 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
  12. Potin, P., A. Sanseau, Y. Le Gall, C. Rochas and B. Kloareg. 1991. Purification and characterization of a new Kappa-carrageenase from marine *Cytophaga*-like bacterium. *Eur. J. Biochem.*, **201**, 241-246.
  13. Roger, W. J. 1970. Mucopolysaccharides of higher animals, *The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, W. Pigman and D.Horton, Academic Press, pp.589-625.
  14. Somogyi, M. and N. Nelson. 1952. Notes on Sugar Determination. *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
  15. Yang, S. T., Joo, D. S., Park, J. J., Lee, J. S., Kim, M. S. and Lee, E. H. 1996. Isolation and identification of carrageenan degrading bacteria and optimization of enzyme production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Botechnol.* **24**(6), 652-656.
  16. 富田旁男・横田 馬. 1992. 微生物による天然多糖からの有用オリゴ糖の生産. *化学と生物*, **30**, 170-175.
  17. 西澤一俊・村杉幸子. 1986. 海藻の本, 研究士, pp.38-44.
  18. 岩瀬弘士郎. 1990. ケル化剤, 増粘剤としてのカラギナンの特性とその商品への応用例について. *New Food Industry*, **32**, 17-24.
  19. 日高秀昌・榮田利章・足立 暁・劑藤安弘. 1987. フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開発. *日本農藝化学會誌*, **61**, 915-921.
  20. 佐佐木隆造. 1993. 糖鎖の生物機能. *日本農藝化学會誌*, **67**, 1727-1731.
  21. 박관화. 1992. 탄수화물 신소재의 개발. *식품과학과 산업*, **25**, 73-76.
  22. 박준태. 1994. Carbohydrates/polysaccharides의 의학적 이용 및 현재의 개발 현황. *생물공학 News*, **1**, 31-37.