

## 한천분해효소의 고생산성 변이주의 분리 및 최적배양조건

황 선 희 · 하 순 득 · 김 봉 조 · 김 학 주 · †공 제 열

부경대학교 식품생명공학부

(접수 : 1999. 4. 19, 게재승인 : 1999. 5. 27.)

### Isolation and Its Optimal Culture Condition for High Agarase-Producing Mutant

Sun-Hee Hwang, Soon-Duck Ha, Bong-Jo Kim, Hak-Ju Kim, and Jai-Yul Kong†

Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University

(Received : 1999 4 19, Accepted : 1999. 5 27)

A marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202, agarase producing strain, was treated with some mutagenic agents, ultraviolet(UV), 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(NTG), and ethyl methane sulfonate(EMS), several times for the increasing of the agarase production. After mutagen treatment, we isolated one mutant strain treated with NTG showed the highest stability and agarase productivity and named as *Bacillus cereus* ASK202-N3. This *Bacillus cereus* ASK202-N3 strain was well grown in the modified marine medium containing 0.5%(w/v) agar, 0.3%(w/v) yeast extract, and 5.0%(w/v) NaCl, and the optimal initial pH, temperature and culture time were 7.8, 25°C and 32h, respectively. In the optimal culture conditions, the agarase production was increased to 5.3 fold(850units/L) compared to that of the wild type.

Key Words : Agarase, Mutation, *Bacillus*, Marine Bacterium

#### 서 론

한천은 비교적 풍부한 국내 수산자원의 하나로 오래 전부터 식량자원이나 공업용 목적으로 널리 이용되어져 왔다. 이러한 한천은 주로 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있으며, 이 중 한천의 70%를 차지하는 agarose는 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactopyranosyl-(1,3)-D-galactopyranose가 한 단위로  $\beta$ -(1,4) linkage로 되어 있는 hetero polymer 형태의 다당이다(1). 한천의 분해에 의해서 생성되는 한천올리고당 (agarooligosaccharide 또는 neoagarooligosaccharide)은 전분의 노화에 대한 억제작용이 강하고, 경관작용, 정장작용, 비피더스균 증식인자, 항충치성 등의 기능성 효과가 매우 크며, 또한 난소화성으로 당뇨병, 비만, 변비 등의 치료에도 효과가 있는 것으로 알려져 생체조절기능이 크게 강조되는 기능성 식품소재로서의 이용이 기대되고 있다(2,3).

한천올리고당은 한천의 산 가수분해 또는 효소분해에 의해 생성되지만, 산 가수분해시에는 한천에 함유되어 있는 고유의 비타민이나 무기질 등이 다량 파괴되고, 올리고당의 기능성 및 안정성 유지에 문제가 제기되므로 효소분해에 의한 방법이 보다 유

용한 것으로 알려져 왔다(4). 한천을 분해하는 효소, agarase는 *Pseudomonas* sp.(5-8), *Vibrio* sp.(4,9), *Streptomyces* sp.(10), *Alteromonas* sp.(11) 등과 같은 미생물로부터 많이 보고 되어져 있으며, 효소의 대량생산 방법으로는 균주 배양배지의 최적화, 효소 분리 정제 기술의 간편화, 균주의 개량법 등에 의한 연구가 진행되고 있다. 균주 개량법에는 돌연변이법과 cloning에 의한 형질전환법 등이 많이 사용되고 있으나, 생성물이 효소일 경우 단순한 균주의 형질전환으로는 대량생산의 결과를 얻기 힘든 경우가 많이 있으므로, 돌연변이법에 의한 균주의 개량을 시도하려는 연구가 많이 이루어지고 있다. 따라서, 현재 돌연변이원으로는 자외선(ultraviolet light), NTG(1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine), EMS(ethyl methane sulfonate)등이 가장 널리 사용되고 있으나, 이 중 자외선을 이용한 방법은 처리방법이 간단하다는 장점을 지니고 있으나, 돌연변이 유발 확률이 낮을 뿐만 아니라 본래의 성질인 야생형으로 되돌아가는 돌연변이 회복률이 높은 것이 단점이다(12,13). 이에 반해 NTG나 EMS는 인체에 유독한 시약이라는 단점은 있으나 매우 강력한 돌연변이를 유발시켜, 변형된 성질을 지속성 있게 유지시키며 효소생산에 대해서도 안정성이 높은 것으로 알려져 있다.

따라서, 본 연구에서는 이미 보고된(14) 한천분해능이 우수한 해양세균 *Bacillus cereus* ASK202를 이용하여, 한천분해효소의 생산성 향상을 위한 돌연변이균주의 선별 및 선별된 돌연변이주의 효소생산을 위한 최적 영양요구성과 배양조건에 대해 조사하였다.

† Corresponding Author · Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, 599-1, Daeyeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea  
Tel & Fax : +82-51-620-6181  
e-mail : kongjy@dolphin.pknu.ac.kr

**재료 및 방법**

**사용 균주**

본 연구에서는 남해안 일대에서 채집한 해수와 해조류로부터 분리된 한천분해능이 우수한 *Bacillus cereus* ASK202를 사용하였다(14).

**배지조성 및 배양조건**

균주의 배양은 증류수 1L당 NaCl 23.0g, KCl 0.7g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.6g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 1.1g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.9g, NaHCO<sub>3</sub> 0.2g, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1.0g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01g, Tris-base 6.05g, pH 7.8인 인공해수에 yeast extract 2.0g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.008g, agar 3.0g이 첨가된 변형된 해양배지를 기본배지로 사용하였다. 그리고 돌연변이주 선별시에는 인공해수에 agar 1.5%(w/v)가 첨가된 한천고체평판배지를 사용하였다.

변형된 해양배지 20ml가 포함된 100ml 삼각플라스크를 이용하여 -80℃에 보관중인 *Bacillus cereus* ASK202 균주를 0.5ml 집중한 후 18시간 배양하였다. 또한, 배양된 균주를 1%(v/v) 농도로 2차 집중하여 25℃, 180rpm에서 36시간 진탕배양한 균주를 본 실험에 사용하였다.

실험에 사용된 배지는 특급시약을 사용하였고 mutagen으로 사용한 NTG (1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine)는 Aldrich Co. 제품, EMS (ethyl methane sulfonate)와 그 외의 시약들은 Sigma Co. 제품을 사용하였다.

**돌연변이의 유발 및 변이주의 선별**

**1) 자외선 조사에 의한 돌연변이 유발**

배양된 세균을 원심분리하여 균체를 회수한 다음 인공해수로 2회 세척하였다. 효율적인 돌연변이 유발을 위해서 세척된 균체에 0.1M MgSO<sub>4</sub>, 10mM Caffein, 0.02%(v/v) tween 80을 2 : 3 · 1로 제조된 용액을 처리하여 세척한 후, 660nm에서 흡광도 값이 0.7 정도 될 때까지 배양하였다 그리고 배양액 5ml를 petri dish(직경 10cm)에 분주한 후 20cm의 거리에서 10Watt 자외선 램프로 0, 1.5, 5, 10, 20, 30, 60분간 각각 자외선을 조사하여 돌연변이를 유발시켰다(16-18).

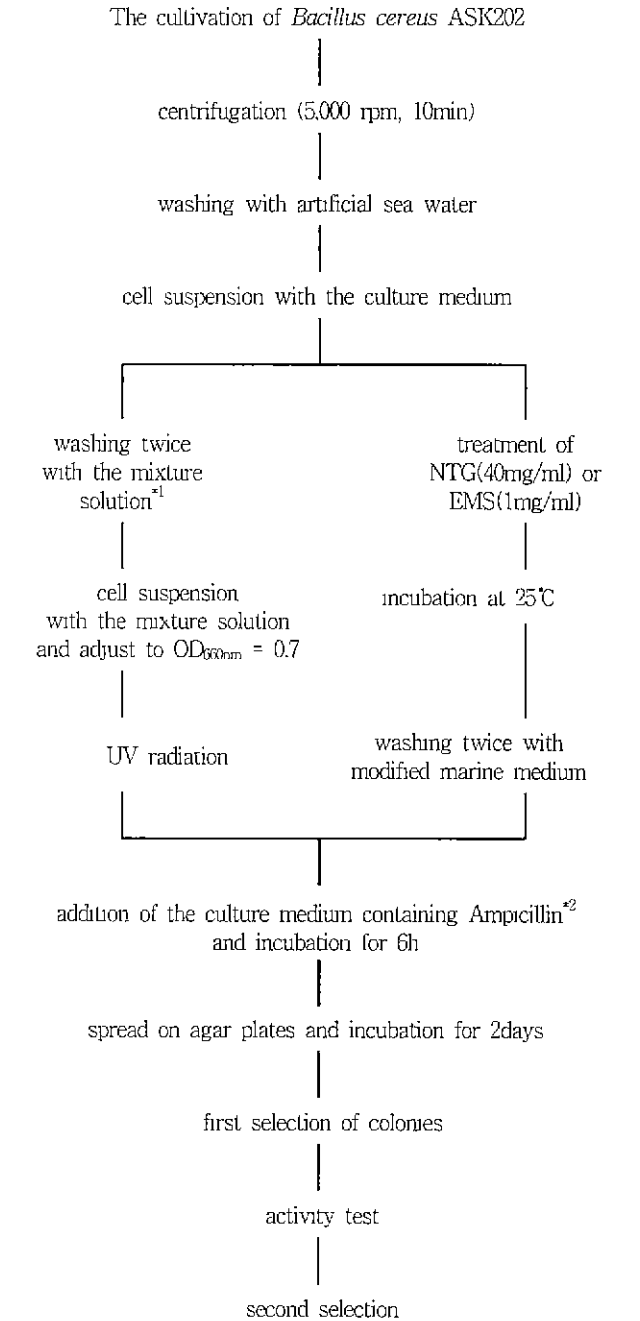
**2) NTG 또는 EMS 처리에 의한 돌연변이 유발**

앞서 동일한 방법으로 균체를 세척한 다음 새로운 배지를 첨가하여 균체를 완전히 현탁시켰다. 현탁된 균체에 NTG를 40mg/ml, 그리고, EMS를 1mg/ml 농도로 각각 첨가하여, 25℃에서 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120분 간 각각 정지배양하였다. 또한 배양된 균체를 다시 회수하여 동일 액체배지를 이용하여 2회 세척한 다음 돌연변이 균주를 선별하였다(16,17, 19-21).

**3) 한천분해효소의 고생산성 변이주의 선별**

자외선, NTG 및 EMS를 처리하여 돌연변이를 유발시킨 균체에 ampicillin (0.05mg/ml)이 첨가된 배지를 이용하여 약 6시간 동안 진탕배양한 후, 고체평판배지에 도말하여 25℃에서 2일간 배양하였다 그리고 형성된 균주를 counting하여 균체사멸률이 99% 되는 시간을 결정하고, 이 조건에서 유발시킨 변이주를 무작위로 선별하였다. 선별된 균주는 멸균된 백금니를 이용하여

한천평판배지에 접종한 후 형성되는 균체 크기를 비교하여 1차 선별하였고, 선별된 균주를 액체배양 및 고체배양을 병행하며 한천분해효소 생산능을 비교하여 활성이 높고 계대배양에 대한 안정성이 뛰어난 균주를 2차 선별하였다(Figure 1). 그리고, 한천분해효소 고생산성 균주의 안정성은 5회 이상의 계대배양을 하면서 조사하였다



\*1 0.1M MgSO<sub>4</sub> : 10mM Caffein : 0.02 %(v/v) tween80 = 2 : 3 · 1

\*2 addition of 0.05mg/ml Ampicillin

Figure 1. Screening strategy for selecting the high agarase-producing mutants

### 효소활성 측정

효소활성 측정에 필요한 조효소용액은 액체배양배지로부터 얻은 균배양액을 원심분리한 후 그 상층액을 사용하였다. 그리고, 한천분해효소의 활성측정은 Somogyi-Nelson 법을 이용하였다(22). 이때, 1분당 1 $\mu$ mol의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1unit로 정의하였다

### 단백질 정량 및 균체성장 측정

배양액 중의 단백질 양은 UV spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Co.)를 이용한 Bradford method(23)에 의해 측정하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. 균체 성장은 흡광도 660nm에서 측정하였다

### 배양온도 및 시간의 영향

선별된 돌연변이주의 균체성장 및 효소생산량의 증가에 미치는 배양온도 및 최적배양 시간의 영향을 조사하기 위하여, 25, 30, 37 $^{\circ}$ C에서 각각 배양하였다. 그리고, 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 각 온도에서의 균체성장 및 효소활성을 측정하였다

### 초기 pH의 영향

선별된 돌연변이주의 효소생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 효소생산배지의 초기 pH를 3~10까지 조절하였다. 그리고, 25 $^{\circ}$ C에서 30시간 배양한 후, 배양액 속에 포함된 한천분해효소의 효소활성을 측정하였다.

### NaCl 농도의 영향

균체성장과 효소생산능에 영향을 미치는 NaCl의 농도를 조사하기 위하여 인공해수의 NaCl 농도를 0~9%(w/v)까지 조절하여 만든 배지에서 균체를 배양한 후 각 농도에서의 균체 성장 및 효소활성을 측정하였다

### 탄소원 및 질소원의 영향

한천분해효소 생산능에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향은 기본배지에 각종 탄소원 및 질소원을 각각 0.3%, 0.5%(w/v)씩 첨가하여 배양한 후, 이를 조효소용액으로 사용하여 효소활성을 측정하였다. 또한 이들 중 가장 효과적인 탄소원 및 질소원을 선정하여 각각 0.0~1.5%(w/v) 농도별로 재배양한 후, 균체성장 및 효소활성을 측정함으로써 효소생산량 향상을 위한 최적 배양 농도를 결정하였다

## 결과 및 고찰

### 돌연변이주의 선별

원균주 *Bacillus cereus* ASK202를 이용하여 한천분해능이 뛰어난 균주를 선별하기 위해 돌연변이원으로서 UV, NTG 그리고 EMS를 각각 처리하여 돌연변이를 유발시킨 후 선택배지에서 배양하였다. 그 결과, 자외선조사 시간에 따른 균체사멸율이 99%이상 증가한 조건은 자외선조사 후 10분 때인 것으로 나타났다. 이 조건하에서 총 68회의 돌연변이를 유발시킨 결과 2만여 균주를 1차 선별하였고, 이 중 한천분해능이 우수한 돌연변이 14균주를 2차 선별하였다(Table 1) 그리고, NTG와 EMS

처리시 균체 사멸율이 99% 이상으로 증가한 시간은 약 30분 경과하였을 때로 나타났으며, NTG의 경우 약 6300 균주, EMS는 약 3200 균주를 1차 선별하였으며, 이들 중 각각 4균주와 13균주를 2차 선별하였다(Table 1).

그리고, 자외선 조사에 의해 선별된 14균주의 경우 원균주에 비하여 한천분해효소 생산능이 약 2배 정도 향상되었고, EMS에 의해 선별된 균주는 1.3~2.4배 정도의 향상을 보였으며, NTG를 처리한 경우에는 2.5~5.0배 높은 생산능을 나타내었다. 또한, 2차 선별된 균주중 한천분해능이 뛰어난 균주(UV-4, 9, 10, 11, NTG-2, 3, 4, EMS-9, 11, 13)를 선별하여 균주의 안정성을 조사하기 위해서 5회 이상 계대배양을 실시하여 한천분해능을 조사하였다. 그 결과 자외선조사에 의해 선별된 균주는 2~4회의 계대배양에서 모두 균주의 안정성을 잃고 야생형(wild type)으로 회복되었으며, NTG-3번 균주와 EMS-11번 균주는 5회의 계대배양 후에도 원균주보다 약 5배이상의 높은 한천분해능을 유지하였다

따라서, 본 실험에서는 뛰어난 효소생산능과 그 안정성을 고려하여 NTG 처리에 의한 NTG-3 균주를 최종적으로 선별하였으며, 선별된 균주를 *Bacillus cereus* ASK202-N3으로 명명하였다. 이후의 실험에서는 선별된 돌연변이주의 한천분해효소 생산을 위한 최적배양조건을 살펴보았다.

### 배양온도 및 시간의 영향

선별된 변이균주를 이용하여 최적 배양시간 및 최적 온도를 조사하기 위해서 배양시간에 따른 균체성장과 한천분해효소 생산능을 조사하였다. 그 결과 균체의 성장은 30 $^{\circ}$ C에서 가장 좋았고, 한천분해효소의 생산량은 25 $^{\circ}$ C에서 가장 뛰어난 것으로 확인되었다. 반면, 37 $^{\circ}$ C에서는 거의 균체가 성장하지 않았으며, 한천분해효소의 생산량도 미약한 것으로 나타났다(Figure 2). 이러한 경향은 원균주에서도 비슷한 경향을 나타낸 것으로 보고된 바 있다(14) 그리고, 균체성장과 효소생산량이 뛰어난 25 $^{\circ}$ C와 30 $^{\circ}$ C에서 배양시 한천분해효소가 최대 생산되는 시간은 각각 20시간, 30시간으로 확인되었고, 이후의 효소생산능을 보면 원균주에 있어서는 시간이 경과함에 따라 급격히 감소하는 것으로 보고되었으나(14), 선별된 돌연변이주는 시간이 경과함에 따라 비교적 완만하게 저하되거나 최대생산량을 그대로 유지하였다(Figure 2). 이것은 돌연변이 균주의 경우 배양 시간의 경과에 대한 한천분해효소 생산에 안정성을 유지하며 생산된 한천분해효소의 활성도 지속적인 안정성을 지니는 것으로 사료된다. 또한 전체적으로 원균주는 흡광도 660nm에서 측정된 균체량이 1.6~1.8 정도로 유지된 반면(14), 돌연변이주는 최대 2.2~2.3 정도로 균체량도 증가된 것으로 나타났다.

### 초기 pH의 영향

초기 배지의 pH 변화에 대한 균체 성장과 한천분해효소 생산능을 살펴본 결과, pH 7.5~8.0에서 균체성장 및 효소생산능이 가장 좋은 것으로 확인되었으며, 산·염기의 범위에서는 효소생산능이 감소되는 경향을 나타내었다(Figure 3). 이와같이 중성 범위에서 효소생산능이 높게 나타난 것은 분해효소의 작용 pH가 중성범위인 것으로 사료되며, 이것은 원균주와 비슷한 경향을 나타내었다(14)

Table 1 Agarase activity and stability of isolated mutant strains on various mutagen.

Strain No.	Agarase activity (Units/ml × 10 <sup>-3</sup> )	Relative activity (%)	Stability* (Times)	Strain No.	Agarase activity (Units/ml × 10 <sup>-3</sup> )	Relative activity (%)	Stability (Times)
Control	150	100		NTG 1	356	237	4
UV 1	306	204	2	2	670	447	4
2	316	210	3	3	720	480	5>
3	326	217	3	4	700	467	3
4	367	245	3	EMS 1	227	151	4
5	337	225	2	2	200	133	3
6	350	233	2	3	243	162	3
7	343	229	2	4	216	141	3
8	327	218	2	5	229	153	4
9	357	238	2	6	229	153	3
10	360	240	3	7	323	215	4
11	350	233	2	8	327	218	4
12	310	207	3	9	360	240	4
13	313	208	2	10	293	195	3
14	315	210	2	11	333	222	5>
				12	323	215	2
				13	363	242	2

\* measured by subculture times

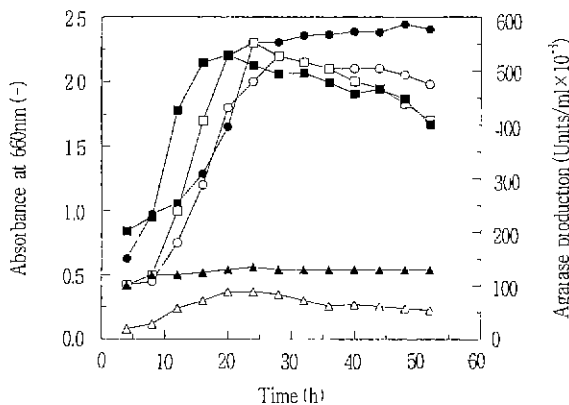


Figure 2. Effect of temperature on the cell growth and agarase production from *Bacillus cereus* ASK202-N3.

Cell growth : —○—, 25°C, —□—, 30°C, —△—, 37°C  
 Agarase production. —●—, 25°C, —■—, 30°C; —▲—, 37°C

**NaCl 농도의 영향**

해양유래인 원균주가 NaCl 농도에 따라 균체 성장 및 효소 생산능에 크게 영향을 받았으므로, NTG치리에 의해 선별된 돌연변이주에 대해서도 NaCl 농도에 대한 영향을 조사하였다. 이미 보고된 바에 의하면 해양유래 세균들은 NaCl 농도에 대해서 균체성장 및 효소 생산능이 크게 영향을 받는 것으로 알려져

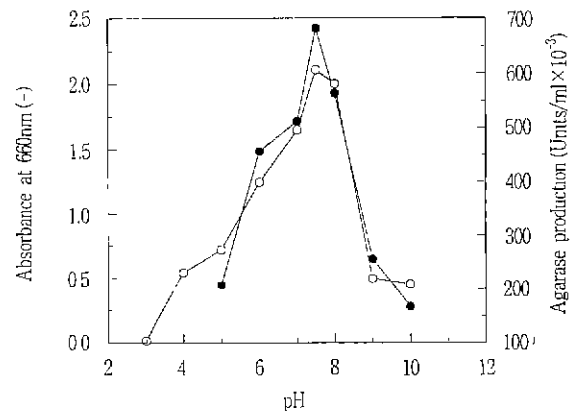


Figure 3. Effect of pH on the cell growth and agarase production

—○—, Cell growth, —■—, Agarase production

왔다(14). 선별된 돌연변이 균주의 경우 0.0~3.0% (w/v) NaCl 농도 범위에서는 균체성장 및 효소의 활성이 점차적으로 증가하였고, 3.0~5.0%(w/v)에서는 일정하게 유지되었으며, 5.0% 이상에서는 균체성장 및 효소활성이 오히려 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(Figure 4). 따라서, 이후의 실험에서는 5.0%(w/v) NaCl이 첨가된 배지를 사용하여 실험을 행하였다.

**탄소원 및 질소원의 영향**

균체성장 및 효소생산능의 향상을 위해서 다양한 종류의 탄소원 및 질소원의 영향을 조사하였다. 실험에 사용된 탄소원은 단당류, 이당류 및 복합다당류를 이용하였고, 그 결과 원균주와 마찬가지로 최적탄소원은 agar 첨가시 가장 뛰어난 것으로 확인되었다. 따라서, 효소생산량이 가장 높은 것으로 확인된 agar 기질을 0.0~1.0%(w/v) 농도별로 첨가하여 효소생산능의 최적조건을 조사하였다(Figure 5) 그 결과 agar를 첨가하지 않았을 때는 균체성장 및 효소생산능이 거의 나타나지 않았으며, agar 0.5%(w/v) 농도에서 최대 효소생산량을 나타냄을 알 수 있었다. 이것은 agar 농도 0.3%(w/v) 이상의 조건에서는 균체 성장 및 효소생산능이 크게 저하되던 원균주에 비해 최적 탄소원의 농도가 증가하였을 뿐만 아니라, 원균주의 경우 27units/L (0.3%(w/v) agar)의 농도로 생산되던 한천분해효소가 돌연변이 균주를 이용하여 0.5% (w/v) agar를 첨가하여 최적조건하에서 배양시 약 700 units/L로 효소생산량이 약 26배 정도 향상된 결과를 나타내었다

또한, 다양한 유기질소원에 대한 영향을 살펴본 결과(Table 2), urea를 제외한 다른 모든 질소원에 대해서는 대체적으로 균체는 잘 성장하였으나, 한천분해효소의 생산량은 tryptone, beef extract, yeast extract 첨가시에만 높은 생산량을 보였다. 이는 원균주가 질소원 yeast extract에 대해서만 뛰어난 한천분해효소 생산능을 지닌 원균주에 비해 크게 달리진 결과로(14), 한천분해효소의 생산이 배지에 첨가된 질소원의 종류에 따라 크게 달라지는 것으로 보고된 예(25)와 비교해 볼 때, 선별된 돌연변이 균주 *Bacillus cereus* ASK202-N3의 질소원 이용에 관한 메카니즘에도 다소간 영향을 받은 것으로 사료된다. 그리고, 가장 높은 한천분해효소 생산능을 보인 yeast extract의 농도에 따른 한천분해효소 생산능을 살펴본 결과, 균체 성장은 0.2% (w/v)에서 1.0% (w/v) 범위에서는 거의 일정 수준으로 조금씩 증가하였으나, 효소생산능은 0.3% 첨가시 가장 뛰어난 것으로 나타났다(Figure 6). 따라서, 이후의 실험에서는 최적 탄소원으로 0.5%(w/v) agar와 질소원으로 0.3%(w/v)의 yeast extract를 사용하여 실험을 행하였다.

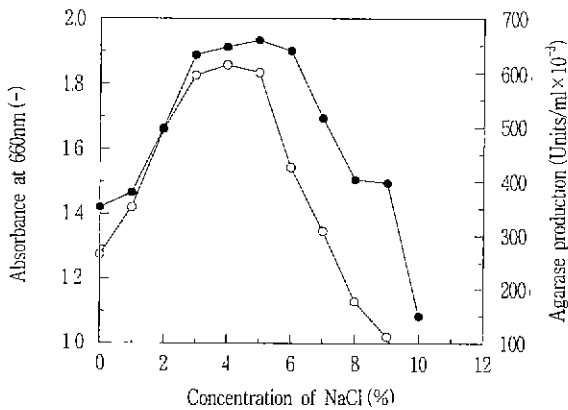


Figure 4 Effect of NaCl concentration on the cell growth and agarase production.

○—○, Cell growth; ●—●, Agarase production

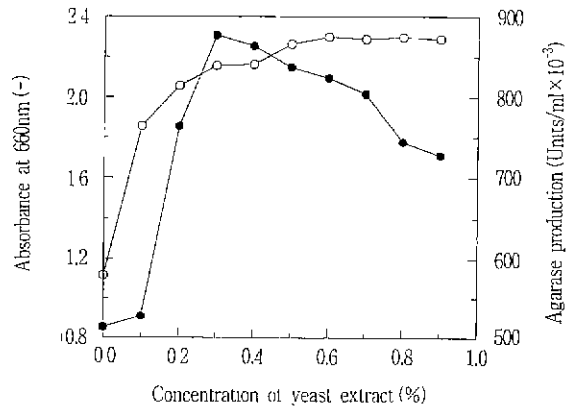


Figure 6. Effect of yeast extract concentration on the cell growth and the agarase production.

○—○, Cell growth; ●—●, Agarase production

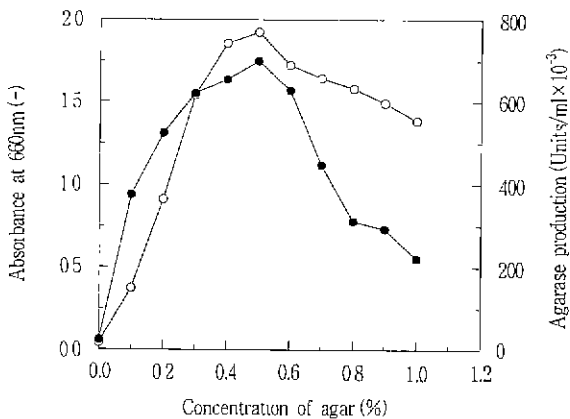


Figure 5. Effect of agar concentration on the cell growth and agarase production

○—○, Cell growth, ●—●, Agarase production

Table 2 Effect of various organic nitrogen sources on *Bacillus cereus* ASK202-N3.

N-sources	Cell growth (O.D.660nm)	Agarase activity (Units/ml × 10 <sup>-3</sup> )	Relative activity (%)
Caseine	1.56	114	16
Gelatin	1.14	84	12
Urea	0.26	-	-
Tryptone	2.01	587	85
Beef extract	2.01	611	88
Yeast extract	2.20	694	100
Malt extract	1.21	81	12
Bacto peptone	1.69	181	26
Proteose peptone	1.84	377	54

- not detected

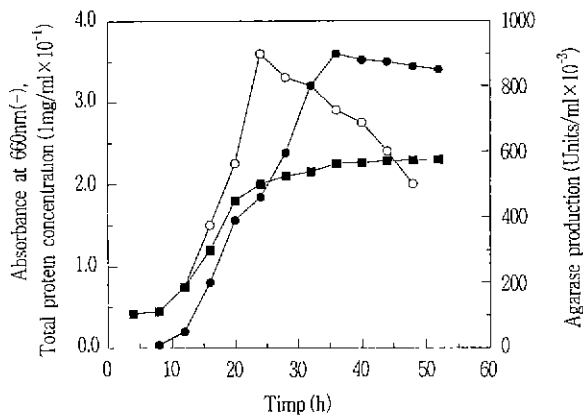


Figure 7 Time courses of the cell growth and agarase production under the optimized culture conditions.

—■—, Cell growth;  
—○—, Total protein concentration.  
—●—, Agarase production

최적조건하에서의 배양

앞의 실험에서 결정된 최적 배양조건, pH 7.8, agar 0.5% (w/v), NaCl 5.0%(w/v), yeast extract 0.3%(w/v)가 함유된 변형된 해수배지에 변이균주를 접종하여 25℃에서 배양하면서 시간 경과별로 균체성장을 측정하고, 그에 따른 효소생산능과 단백질생산량을 비교·검토하였다(Figure 7).

그 결과, NTG 처리에 의해 선별된 돌연변이주 *Bacillus cereus* ASK202-N3는 최적 배양조건하에서는 효소생산능이 대수증식기 초기부터 서서히 증가하기 시작하여 배양 32시간 경과 후 효소생산량은 최고치에 도달하였다.

선별된 돌연변이주인 *Bacillus cereus* ASK202-N3은 최적배양조건하에서 배양시 약 850units/L의 한천분해효소를 생산하였고, 이는 원균주가 최적배양조건하에서 생산하는 한천분해효소량과 비교해 볼 때 약 5.3배 정도 증가된 결과이다. 또한, 기존에 보고되어진 미생물이 생산하는 한천분해효소의 생산량, 즉, *Vibrio* sp. strain JT0107(66.0 units/L)(4), *Pseudomonas* sp. PT-5(4.5 units/L)(5), 그리고, *Pseudomonas* like bacterium (46.5 units/L)(26)과 비교해 볼 때 최고 190배 가량 한천분해효소 생산능이 높아진 것으로 확인되었다.

또한, 배양과정 중의 단백질량은 균체량이 증가하기 시작하는 12시간 경과 후부터 증가하기 시작하여 대수증식기가 끝나고 약 2시간 후에 최대값을 나타내었고, 이후는 감소하는 경향을 보였다. 단백질 생산량은 원균주와 비교해 볼 때 최고 생산량이 0.3mg/ml였으며 이는 0.2mg/ml인 원균주에 비해 1.5배 가량 증가한 것으로 확인되었으며, 증가된 단백질량 중에는 한천분해효소의 생산량 증가도 배제할 수 없을 것으로 사료된다.

특히, 한천분해효소의 생산과 관련하여 Figure 8에 나타난 것과 같이 원균주의 경우, 한천분해효소 생산량과 관계없이 배지 자체에는 극소량의 한천올리고당이 존재하는 것으로 확인되었으나, 돌연변이 균주 *Bacillus cereus* ASK 202-N3는 한천분해효소 생산량이 증가함에 따라 균주에 의해 이용되지 않고 배지 자체에 남아 있는 한천올리고당량이 상당히 존재하는 것으로 나타났다.

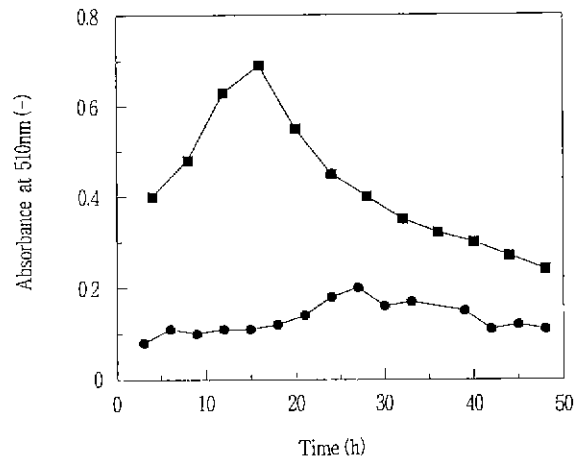


Figure 8. Comparison of amount of reduced sugar between *Bacillus cereus* ASK202 and ASK202-N3 in culture broth

—●—, ASK202; —■—, ASK202-N3

요 약

한천분해효소를 생산하는 해양미생물 *Bacillus cereus* ASK202를 이용하여 돌연변이원으로써 자외선, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine 그리고 ethyl methane sulfonate를 처리하여 고생산성 한천분해효소 변이주를 선별하였다. 선별된 변이주 중 한천분해효소 생산에 대한 안정성과 생산능을 검토한 결과 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine처리에 의해 유발된 N3 변이주가 가장 우수하였으며, 이 변이주를 *Bacillus cereus* ASK202-N3로 명명하였다. 선별된 균주, *Bacillus cereus* ASK202-N3는 agar 0.5%(w/v), NaCl 5.0%(w/v), yeast extract 0.3%(w/v)가 첨가된 pH 7.8 변형해수배지에서 25℃, 약 32시간 배양시에 최적의 한천분해효소 생산능을 나타내었다. 이 최적 조건하에서의 한천분해효소 생산량은 원균주보다 약 5.3배 증가된 850units/L였다.

사 사

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

참 고 문 헌

1. 食品産業バイオリアクター-システム技術研究組合 (1990). 實踐バイオリアクター, 初版, pp87-105, 株式會社食品化學新聞社, Tokyo
2. 河野敏明, 日高秀昌 (1989). ネオアガロオリゴ糖の特性とその生産技術, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 63(6), 1126-1129.
3. 河野敏明, 山口実樹, 山口吾一, 日高秀昌, 三好照三, 北川廣進, 平賀哲男, (1988), 寒天分解酵素生産菌の分離とその酵素の性質, 日本水産學會大會講演要旨集, p. 345, Tokyo
4. 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.
5. 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
  6. Kong, J. Y., S. H. Hwang, B. J. Kim, S. K. Bae, and J. D. Kim (1997), Cloning and Expression of an Agarase Gene from a Marine Bacterium *Pseudomonas* sp. W7, *Biotechnol. Lett.*, **19**(1), 23-26.
  7. Morrice, L. M., M. W. Mclean, F. B. Williamson, and W. F. Long (1983),  $\beta$ -Agarase I and II from *Pseudomonas atlantica* - Purification and some Properties, *Eur. J. Biochem.*, **135**, 553-558.
  8. 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.
  9. Aoki, T. and T. Araki (1990), Purification and Characterization of  $\beta$ -Agarase from *Vibrio* sp AP-2, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**(5), 825-830.
  10. Buttner, M. J., I. M. Fearnley, 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.
  11. Leon, O., L. Quintana, G. Peruzzo, and J. C. Slebe (1992), Purification and Properties of an Extracellular Agarase from *Alteromonas* sp. Strain C-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(12), 4060-4063.
  12. Essentials of Molecular Biology (1987), David Freifelder, pp. 119-130, Jones and Bartlett Publishers Inc., USA.
  13. 미생물유전학실험 (1988), 주현규, pp192-209, 문연당출판사.
  14. Lee, H. W., B. J. Kim, S. H. Hwang, and J. Y. Kong (1997), Isolation and Identification of Marine Bacterium *Bacillus cereus* ASK202 and Optimal Culture Conditions for Production of Agarase, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **12**(2), 228-235.
  15. Kong, J. Y., B. J. Kim, S. H. Hwang, and S. K. Bae (1997), Isolation, Purification and Characterization of  $\beta$ -Agarase from A Marine bacterium, *Bacillus cereus* ASK202, The Second Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference '97 and Third Asia-Pacific Conference on Algal Biotechnology, Abstract, May, 98, Phuket, Thailand.
  16. Na, K. H., H. J. Kim, G. W. Kim, K. T. Kim, J. H. Lee, and J. I. Yang (1991), Selection of High Tobramycin-Producing Mutants, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(4), 343-347.
  17. Son, K. H., H. K. Kwon, H. W. Lee, and S. H. Bok (1991), Effect of Some Factors on the Production of an Antifungal Compound KRF-001 from *Bacillus subtilis* subsp. *krietiensis*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(6), 614-618.
  18. Kim, Y. J., S. H. Lee, K. H. Son, and S. H. Bok (1989), Effect of Some Parameters for Selection the High Kasugamycin Production Mutants, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**(2), 131-135
  19. Fang, T. J. and T. Y. Chiou (1996), Batch Cultivation and Astraxanthin Production by a Mutant of the red Yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501, **16**, 175-181.
  20. Chung, M. C., H. K. Chun, H. J. Lee, C. H. Lee, and Y. H. Kho (1995), Characterization of the Mutant of *Streptomyces* sp. SL-387 (KCTK 0102BP) Producing Amino peptides M Inhibitors, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**(1), 47-52.
  21. Kim, D. and J. F. Robyt (1994), Production and Selectino of Mutants of *Leuconostoc mesenteroides* Constitutive for Glucansucrases, *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 659-664.
  22. Somogyi, M. (1952), Notes on Sugar Determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23
  23. Bradford, M. M. (1976), A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
  24. Duckworth, M. and W. Yaphe (1970), Thin-alyer Chromatographic Analysis of Enzymic Hydrolysates of Agar, *J. Chromatog.*, **49**, 482-487.
  25. Sugano, Y., H. Nagae, K. Inagake, T. Yamamoto, I. Terada, and Y. Yamazaki (1995), Production and Characteristics of Some New  $\beta$ -agarase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107, *J. Ferment. and Bioeng.*, **79**(6), 549-554.
  26. Malmqvist, M. (1978), Purification and Characterization of Two Different Agarase-Degrading Enzymes, *Biochim. et Biophys. Acta*, **537**, 31-43