

## 한천분해세균 *Cellvibrio mixtus* SC-22의 분리 및 효소적 특성

차정아<sup>1</sup> · 김유진<sup>1</sup> · 서영범<sup>2</sup> · 윤민호<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 생물환경화학학과, <sup>2</sup>충남대학교 임산공학과

### Isolation of an Agarolytic Bacteria, *Cellvibrio mixtus* SC-22 and The Enzymatic Properties

Jeong-Ah Cha<sup>1</sup>, Yoo-Jin Kim<sup>1</sup>, Yung-Bum Seo<sup>2</sup>, and Min-Ho Yoon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bio-Environmental Chemistry, <sup>2</sup>Department of Forest Products, College of Agriculture and Lifesciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received September 26, 2009; Accepted November 9, 2009

An agar-liquefying bacteria (SC-22), which produces a diffusible agarase that caused agar softening around the colony was isolated from Daecheong lake in Korea. Chemotaxonomic and phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequences revealed the strain was classified as *Cellvibrio mixtus* SC-22. The isolate SC-22 showed maximal extracellular agarase activity with 58.5 U/mL after 48 h cultivation in the presence of 0.2% agar. It was observed that the isolate produced two kinds of extracellular and three kinds of intracellular isoenzymes. The major agarase was purified from the culture filtrate of agarolytic bacteria by ammonium sulfate precipitation, anion exchange and gel filtration column chromatographic methods. The molecular mass of the purified enzyme was estimated to be 25 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of the purified enzyme were pH 7.0 and 50°C, respectively. The agarase activity was activated by Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ions while it was inhibited by Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> at 1 mM concentration. The predominant hydrolysis product of agarose by the enzyme was galactose and disaccharide on TLC, indicating the cleavage of β-1,4 linkage in a random manner. The enzyme showed high substrate specificity for only agar and agarose among various polysaccharides.

**Key words:** agarase, characterization, *Cellvibrio mixtus* SC-22, isozymes, purification

#### 서 론

한천(agar)은 우뚝가사리 등 대형 홍조류의 주요 구성성분으로 식품안정제, 종이, 의약, 화장품원료, 점성제, 윤활제, 고체배지 등 공업적 목적으로 사용되어 왔고 최근에는 바이오 에탄올 생산에 주로 이용된 전분계 다당류의 대체 바이오연료 자원으로 관심이 높은 다당류이다. 한천의 구조는 대략 agarose와 agaropectin의 두 형태로 존재하며 agar다당류의 약 70% 정도를 차지하고 있는 agarose는 1→3결합으로 연결된 β-D-galactose와 1→4결합으로 연결된 3,6-anhydro-α-L-galactose의 연쇄로 구성된 중성 고분자 형태이고, agaropectin은 3,6-anhydro-α-L-galactose 잔기의 일부가 L-galactose sulfate로 치환되고 D-galactose 잔기의 일부가 pyruvic acid acetal 4,6-o-(1-carboxy-ethylidene)-D-galactose로 치환된 형태로 구성된 음전하

를 가지고 있는 고분자이다[Morrice 등, 1983; Stosz 등, 1996].

한천의 분해는 주로 해조류들에 기생 혹은 공생하는 해양 미생물들에 의하여 이들이 생산하는 한천분해 효소인 agarase의 가수분해 작용으로 해조류의 주된 구조 다당류인 agarose의 분해에 의하여 이루어진다. Agarose 분해효소인 agarase는 작용양식에 따라 α-(1→3)결합을 분해하여 agarobiose를 구성단위로 하는 agarooligosaccharide를 생산하는 α-agarase(EC 3.2.1.158)와 β-(1→4)결합을 분해하여 neoagarobiose를 구성단위로 하는 neoagarooligosaccharide를 생산하는 β-agarase(EC 3.2.1.81) 효소가 알려져 있다[Young 등, 1978; Lakshmikanth 등, 2006]. 즉 α-agarase는 3,6-anhydro-α-L-galactose의 (α-1→3) β-D-galactose 사이의 결합을 끊어 환원 말단으로 3,6-anhydro-α-L-galactose 잔기를 형성하는 agarooligosaccharide를 생산하며, 또한 β-agarase는 β-D-galactose (β-1→4) 3,6-anhydro-α-L-galactose 사이의 결합을 가수분해하여 환원 말단으로 β-D-galactose 잔기를 형성하는 neoagarooligosaccharide를 생산한다.

Agarase는 주로 해양 세균만이 생산하며 대부분의 균주들은 적어도 한 가지 이상의 agarase를 생산하는 것으로 나타났다. β-agarase의 경우 한 균주가 서로 다른 특성을 가진 두 가지 이

\*Corresponding author  
Phone: +82-42-821-6733; Fax: +82-42-823-9241  
E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr

상의 isoenzyme를 생산하는 예는 많이 보고되어 있으나,  $\alpha$ -agarase가 한 균주에서 두 가지 이상 생산된 예는 거의 없다. 특히  $\beta$ -agarase를 생산하는 균주 중  $\alpha$ -agarase 생산이 보고되지 않은 종이 더 많이 있다. 이처럼 한천분해효소와 그 유전자에 관한 연구는 대부분 *Cytophaga*속[Van der Meulen 등, 1975], *Pseudomonas*속[Morrice 등, 1983; Belas 등, 1988], *Streptomyces*속[Buttner, 1987], *Vibrio*속[Aoki 등, 1990; Sugano, 1995], *Bacillus*속 [Suzuki 등, 2003], *Pseudoalteromonas*속[Tao 등, 2008] 및 *Altermonas*속[Stosz, 1996]등이 생산하는  $\beta$ -agarase의 효소학적 및 유전학적 특성규명이 두드러지게 연구되었으나,  $\alpha$ -agarase의 경우 그램 음성 세균에 존재하리라고 예측되지만 정제효소의 특성 및 그 유전자가 보고된 결과는 없고  $\alpha$ -agarase의 활성이 일부 보고 되어 있는 상태이다[Young 등, 1978; Ohta 등, 2005; Flament 등, 2007]. 또한 대부분의 agarase는 30~40°C, pH는 중성영역에서 최적 활성을 가지며 분자량은 최저 18,000 Da에서 360,000 Da의 다양한 크기로 나타났다.

본 연구진에서는 한천 당화공정에 필요한 고효율 agarase 효소 및 관련 유전자를 분리하기 위하여 국내 연안의 해수를 포함하여 담수의 해초로부터 한천 분해 세균들을 분리하였다. 본 논문에서는 이 중에서 한천분해능이 우수한 담수세균의 분리, 동정, 그리고 이 분리균으로부터 생산된 agarase를 정제하여 그 효소적 특성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

**사용균주.** 우리나라 제주도 해안의 해조류와 민물 담수호의 수초로부터 분리한 십 여종의 한천 분해세균 중 한천분해능이 우수한 담수세균 SC-22 균주를 대전 대청댐 부근의 민물에서 분리하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

**배지 및 배양.** SC-22균주의 생육을 위해서는 Tryptic soy broth(중류수 1L당 pancreatic digest of casein 17 g, papaic digest of soybean 3.0 g, dextrose 2.5 g, NaCl 5.0 g,  $K_2HPO_4$  2.5 g, pH 7.0)를 사용하였다. 또한 agarase 생성을 위해서는 각각의 동일배지에 0.2% Difco agar를 첨가하여 배양하였으며, 실험에 사용된 배지와 시약은 Difco와 Sigma 사의 제품의 특급 시약을 사용하였다.

**분리균 동정.** 분리균의 지방산 분석은 Ikemoto와 Miyagawa의 방법[1999]에 의해 균체지방산을 methyl ester화 시켜 추출하여 Microbial Identification System(MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, NJ)을 이용하여 분석하였고, Isoprenoid quinone 분자중의 동정은 Collins 등[1979]의 방법을 사용하였다. DNA-DNA hybridization 실험은 photobiotin-labelled DNA probe 와 micro-dilution wells을 이용하여 Ezaki 등[1989]에 의해 기술된 방법에 의해 수행하였다. DNA G+C 함량 측정은 HPLC(LC-10AD vp, Shimadzu, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 생리학적 특성은 그람음성 세균의 동정에 사용되는 API 20NE kit(Bio Merieux, Grenoble, France)를 제조회사의 시행방법에 따라 사용하였다. 또한 16S rRNA 염기서열 해석 및 계통수 작성을 위하여 16S rRNA의 부분서열의 상동성은 DDBJ/EMBL/GenBank database의 Blast program을 이용하여 분석 하였으며,

각 염기서열의 alignment는 Cluster X program package (version 1.8)를 이용하여 정렬하였고, 계통도의 작성은 근연결합법에 의거하여 결정되었다.

### 균주 생육 및 효소적 특성

**생육 곡선.** 배양기간에 따른 생균수와 agarase 생성 여부를 확인하기 위하여 선발 균주인 SC-22균을 0.2% agar 함유한 Tryptic soy broth 배지에 배양하여 12시간 마다 흡광도(absorbance) 610 nm에서 배양액의 탁도를 측정함으로써 생육 정도를 확인하였고, 또한 각 시간별 배양액 중의 단백질 함량 및 agarase 생성량을 조사하였다.

**Agarase 활성 측정.** Agarase 활성 측정은 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해된 0.1%(w/v) agar(Difco, Sparks, MD)를 기질로 이용하여 효소의 분해 작용에 의해 기질로부터 생성된 galactose 환원당을 Somogyi 법[1952]으로 측정하였다. Agarase 효소의 활성도는 1분간 1  $\mu$ mol의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였으며, 표준곡선은 galactose를 이용하여 작성하였다. 또한 단백질 함량은 Lowry 법[1951]에 의해 정량하였다.

**Agarase의 분리 및 정제.** Agarase의 정제를 위해서 Pharmacia Biotech 사의 GRAD-FRAC™ 기기(Optical Unit UV-1, Mixer 24 V 50-60 Hz 5 MPa, Valve V-7, HiLoad pump P-50, Uppsala, Sweden)를 사용하였으며, 겔 여과 크로마토그래피용 column은 Sephacryl S-200겔을, 이온 교환 column은 Resource™Q(1 mL, 6.4×30 mm, GE Healthcare, Princeton, NJ)을 사용하였다.

**황산암모늄 침전.** 분리균주를 최적배양조건에서 3일간 진탕 배양한 후 10,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 배양 상층액을 회수하였다. 회수된 배양 상층액을 75% ammonium sulfate로 침전시킨 뒤 투석막(Seamless cellulose tubing, size: 20/32 100 ft, 三光純藥, Tokyo, Japan)을 이용하여 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 24시간 투석한 후 농축튜브(Ultrafree-CI, Millipore, Billerica, MA)로 농축하였다.

**겔 여과.** 효소를 정제하기 위해서 Sephacryl S-200 겔(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)을 충전한 column(1.6×60 cm; bed volume, 115 mL)에 1 mL의 투석농축액을 주입한 후, GRAD-FRAC™ 기기를 이용하여 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 용출(1 mL/min)하면서 test tube에 2.5 mL씩 분획 수집하였다.

**이온교환수지.** 앞의 겔 여과 과정에서 얻은 활성분획 농축액 0.5 mL를 미리 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 안정화시킨 음이온교환겔 Resource™ Q(Pharmacia, Uppsala, Sweden)에 주입하여 효소를 완전히 흡착시킨 후 NaCl을 0.5 M까지 농도구배를 주면서 NaCl 농도의 증가에 따라 생성된 단백질 peak를 2 mL/tube씩 분획 수집하였고, 각 분획의 단백질량과 효소활성을 측정하였다. 활성분획만을 회수하여 Millipore 농축튜브(Ultrafree-MC, Amicon, Millipore Co.)로 농축한 후 SDS-PAGE로 통해 분리된 단백질 band를 확인하였다.

**분자량 및 Zymogram 측정.** 정제과정 중의 효소 정제도 및 정제된 단백질의 분자량은 단백질 영동장치(ATTO, Tokyo,

Japan)를 이용하여 SDS-PAGE법에 의해 확인하였다. 또한 각 분획별 단백질의 효소활성을 확인하기 위하여 zymogram test를 수행하였다. 분획 단백질 시료를 4×SDS protein sample buffer와 혼합한 시료를 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동한 기질인 1% agarose(Sigma, ST. Louis, MO)겔 위에 평평하게 편 다음 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 Lugol's Iodine solution을 부어 투명환을 형성 여부에 따라 agarase의 활성과 해당 단백질의 분자량을 확인하였다[Na 등, 1972].

**최적 pH 및 최적온도.** 정제된 효소의 최적 pH 및 온도를 검토하기 위하여 최적 pH 실험을 위해 0.2% Bacto-Agar가 함유된 20 mM sodium acetate buffer(pH 3~4), 20 mM sodium phosphate buffer(pH 5~8), 20 mM glycine-NaOH buffer(pH 9~11)를 기질용액으로 하여 효소액과 30분간 40°C에서 반응시켜 Somogyi-Nelson 법에 의해 효소활성을 측정하였다. 또한 최적온도는 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)와 효소 반응액을 20~70°C에서 30분간 반응시켜 동일방법으로 측정하였다.

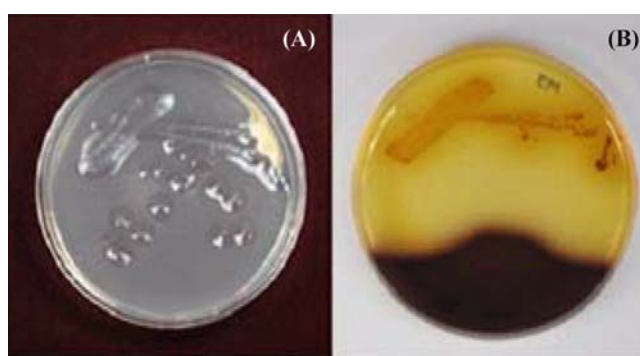
**기질 특이성.** 효소의 기질특이성 조사를 위하여 20 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)의 용액에 다당류인 CMC, alginate, starch, agar, agarose, 및 xylan을 각각 0.1%(w/v) 첨가하여 잘 용해시킨 후, 각 기질에 대한 효소활성도를 측정하였다.

**금속이온 효과.** 각 금속이온들 LiCl, FeCl<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, 및 MnCl<sub>2</sub>의 반응 최종 농도가 1 mM이 되도록 제조된 반응액에 효소액을 첨가하고 40°C에서 30분간 방치한 후, 잔존효소 활성 분석을 통하여 금속 이온들이 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다.

**올리고당의 TLC 분석.** 0.2% agar가 첨가된 기질과 정제된 효소액을 시간별로 반응시켜 생성된 분해물들을 박층크로마토그래피로 분석하였다. 이때 지지체로는 Merck사의 DC-Plastikfolien Kieselgel 60 F를 사용하였으며, 전개용매는 n-butanol, acetic acid, water를 2:1:1의 부피비로 섞어 사용하였다. 시료를 전개한 후 ethanolic sulfuric acid(375 mL ethanol, 100 mL conc. sulfuric acid)시약을 처리하여 건조시켜 10%(w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 도포한 후 110°C에서 10분간 가열하여 청자색으로 발색되는 한천 올리고당을 확인하였다[Duckworth 등, 1970]. 이때 한천올리고당 표준물질로 단당류 galactose(Across, Morris Plains, NJ)와 이당류 lactose(Sigma, ST. Louis, MO)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**한천 분해균의 분리.** 산업적으로 그 이용가치가 점점 확대되고 있는 한천분해 미생물과 고효율 agarase 생성균을 분리하기 위하여 본 연구에서는 대부분의 한천 분해 미생물들이 가장 높은 활동을 보이는 일년생 해조류들이 포자 방출 후 해조체가 녹아내리는 시기인 여름철에 우리나라 제주도해안과 대전 대청댐 부근 담수에서 약 40여종의 해조 샘플을 채취하여 한천 분해 균주를 분리하였으며 이 과정에서 약 10여종의 균주를 1차 분리하였다. 이들 중 높은 한천 분해 활성을 보이는 담수 세균



**Fig. 1.** Staining of the isolate using Lugol's iodine solution on agar medium plate. (A) Agar-degrading bacteria SC-22 on agar medium plate and (B) activity staining of SC-22 with Iodine solution.

SC-22를 선별하여 이들의 분류학적 특성 및 효소학적 특성을 알아보았다.

한천 분해능을 보이는 균주들은 일반 한천 고체 배지에서 배양할 때 콜로니를 중심으로 함몰 현상을 보이거나 고체 배지 자체를 액화시키는 활성을 보이므로 본 실험에서도 SC-22의 한천분해능을 확인하기 위하여 분리균을 한천평판배지에 streaking하여 배양한 후 Lugol's Iodine solution을 뿌려 함몰 및 염색 정도를 확인하였다. Fig. 1에서처럼 SC-22는 분화구처럼 배지를 파먹고 들어가는 특징(A)을 보였으며, 콜로니 주변에 폭넓게 요오드 용액에 의해 염색 되지 않은 부분이 많은 것(B)으로 보아 agarase 활성이 상당히 크다는 사실을 확인 할 수 있었다.

또한 분리균 SC-22는 pH 8.0 부근과 70~80%의 해수가 포함된 배지에서 잘 성장하는 전형적인 해양 세균과는 달리 일반 세균이 잘 자라는 pH 7.0 과 0.05% 이하의 낮은 NaCl 농도에서 잘 자라는 특성을 보였다.

### 한천분해균 SC-22의 동정

**균체지방산 조성과 G+C 함량.** 한천분해균 SC-22 균주의 균체지방산을 분석하기 위하여 methy ester에 대한 MIDI 분석 결과 주요지방산 포화지방산인 C16:1(39.80%)과 불포화지방산인 C18:1(31.50%)을 함유하고 있었으며, 주요 인지질은 phosphatidylethanolamine(63.1%)이었다. 또한 SC-22균주의 DNA G+C 함량은 보고된 *Cellvibrio*속 type 균주와 비슷한 52.6(mol%) 수준이었다.

**유전학적 계통분석.** SC-22 균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 BLAST 프로그램을 이용하여 계통학적 위치를 검토한 결과, SC-22 균주는 *Cellvibrio mixtus* subsp.와 98.9%의 유사성을 보였고, DNA-DNA relatedness 실험에서도 *Cellvibrio mixtus* subsp. ACM 2601과 90%의 상동성을 나타냄으로서 *Cellvibrio mixtus* 로 동정되었다(Fig. 2).

**생육곡선 및 효소활성.** SC-22균주를 기본배지인 0.2% agar를 함유하는 Tryptic soy broth에 접종하여 30°C에서 배양하면서 매 12시간마다 흡광도(탁도)를 측정하여 생육정도를 확인하였다. 분리균은 배양 12시간 이후 생육이 급격히 증가하여 배양 36시간에 생육 최대치를 나타내었고 그 이후에는 서서히 감소하였다(Fig. 3). 또한 배양기간에 따라 분리균에 의하여 분비되

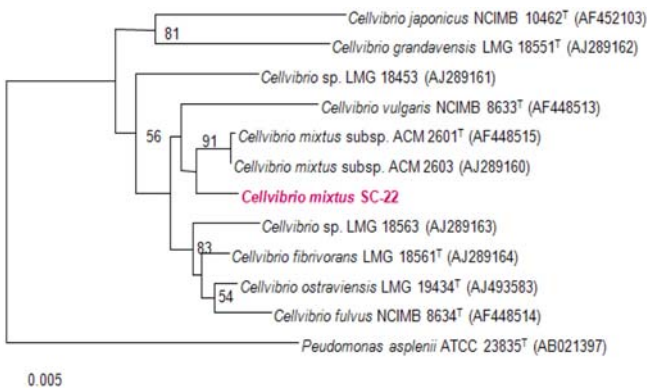


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationship of the strains *Cellvibrio mixtus* SC-22. The tree is based on 16S rRNA sequence data and was constructed by using the neighbour-joining method.

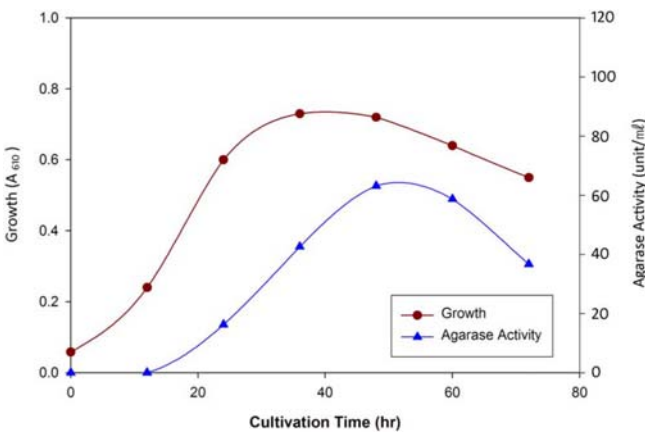


Fig. 3. Growth curve and agarase activity of *C. mixtus* SC-22.

는 agarase 효소 활성도를 조사한 결과 배양 48시간에 58.5 U/mL의 최대 agarase 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이는 기존에 보고되어진 한천분해 미생물 *Vibrio* sp. JT0107의 66.0 U/mL [Sugano, 1995] 보다는 다소 낮으나, *Microbulbifer salipaludis*의 45 U/mL [Ohta 등, 2004] 및 *Pseudomonas* sp.의 46.5 U/mL [Morrice 등, 1983]과 비교했을 때 그 생성량이 높은 수준이었다.

**Zymogram 시험.** 분리균주는 세포내 또는 세포외 agarase 효소를 생성하였으며 분리균이 생성하는 세포내 및 세포외 agarase 효소의 종류와 분자량을 확인하기 위하여 zymogram 시험을 수행하기 위하여 각 균주의 배양 여액, 배양 여액의 acetone 침전액, 그리고 균체를 초음파분쇄하여 원심분리 한 상정액을 농도별로 비변성 SDS-PAGE 조건에서 전기영동한 후 zymogram을 통해 활성 agarase 단백질을 확인하였다. SC-22균주는 해양세균유래 agarase 효소 [Aoki 등, 1990; Suzuki 등, 2003; Lakshmikanth 등, 2009]보다 다소 분자량이 작은 세포내 효소 P1(55 kDa), P2(29 kDa), P3(20 kDa) 크기의 isoenzyme들을, 세포외 효소로는 P2와 P3 단백질을 생성하였고 이들 중 주요 agarase 효소는 P2(29 kDa)에 해당하는 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

**Agarase 분리 및 정제.** 한천 분해균 SC-22를 기본배지에 접

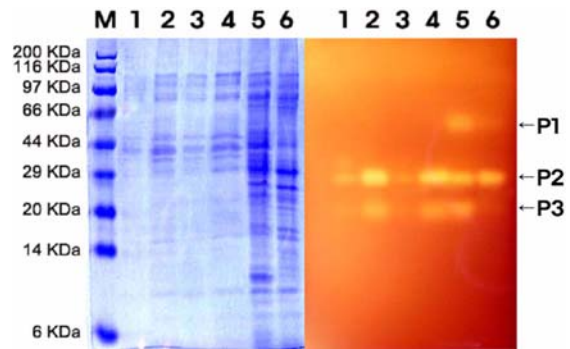


Fig. 4. Zymogram analysis of agarase activity from *C. mixtus* SC-22. Lane M: Protein marker (Myosin 200,000 Da;  $\beta$ -galactosidase 116,000 Da; phosphorylase B 97,200 Da; serum albumin 66,409 Da; ovalbumin 44,287 Da; carbonic anhydrase 29,000 Da; trypsin inhibitor 20,100 Da; lysozyme 14,300 Da; aprotinin 6,500 Da). Lane 1: concentrated culture filtrate (3  $\mu$ L), Lane 2: concentrated culture filtrate (6  $\mu$ L), Lane 3: acetone-precipitated culture filtrate (3  $\mu$ L), Lane 4: acetone-precipitated culture filtrate (6  $\mu$ L), Lane 5: Intracellular agarase (3  $\mu$ L), Lane 6: Intracellular agarase (6  $\mu$ L).

종하여 3일간 배양한 다음 원심분리하여 얻어진 배양여액 500 mL을 75% 포화도로 황산암모늄을 첨가하여 효소단백질을 침전시키고 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)을 이용하여 투석, 농축하여 5 mL의 조효소액을 얻었다. 조효소액 1 mL를 Sephacryl S-200 column을 통과시켜 분획한 결과, 두 개의 peak가 분리되었으며 분자량이 큰 두 번째 분획에 대부분의 효소활성이 존재하였으므로 이 분획을 모아 농축하였다(data not shown). 상기 겔여과법에 의해 얻어진 활성 분획물 0.5 mL를 Resource Q 음이온 교환수지에 흡착시키고, NaCl 농도구배에 의하여 용출시켜 단백질을 분리하여 음이온 수지에 약하게 결합하여 낮은 이온강도에서 용출되는 첫 번째 peak에 대부분의 효소활성이 존재하여 이 활성분획을 최종 정제효소로 사용하였다.

**효소의 분자량 확인.** 정제된 활성분획을 SDS-PAGE 법을 이용하여 효소의 정제도 및 분자량을 확인한 결과, 정제효소의 분자량은 zymogram 시험을 통해 확인된 주 agarase 단백질인 P2(29 kDa)보다 다소 작은 25 kDa로 확인되어 비변성 조건의 결과와는 다소 차이가 있었으나, Fig. 5(B)에서 처럼 25 kDa에 해당하는 정제효소는 zymogram 시험을 통해 확인된 주 단백질인 P2(29 kDa)과 동일한 단백질로 판명되었다(Fig. 5).

**효소의 특성 및 금속이온 효과.** 정제효소의 최적 pH는 대부분 pH 8 이상에서 최대 활성을 보인 해양세균 유래 agarase와는 달리 pH 7.0에서 최대활성을 보였고 pH 9.0 이상에서는 급격히 활성이 떨어졌다(Fig. 6). 실제로 균의 생육도 pH 8.0의 배지에서는 생육 및 효소 생성량이 급격히 저하됨으로서 약알칼리 환경에서 매우 민감한 생육 특성을 나타냈다. 또한 최적 온도는 비교적 높은 온도인 50°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 7). 금속이온은 효소반응에 있어서 상승작용 또는 저해작용을 유발하는 인자가 될 수 있으므로 정제효소에 대한 각종 금속 이온의 영향을 조사하였다. 최종 1 mM 농도의 각종 금속이온에 대한 효과를 확인한 결과, SC-22 균주의 경우  $Fe^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  이온 mM은 무 첨가구에 비해 상대적으로 효소 활성

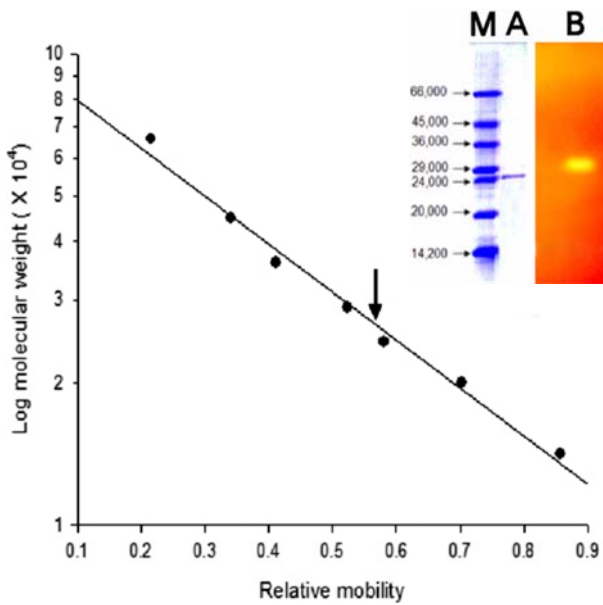


Fig. 5. Determination of molecular weights of *C. mixtus* SC-22 agarase (25kDa) by SDS-PAGE. A: purified agarase, B: zymogram of purified agarase. Bovine serum Albumin 66,000 Da; Ovalbumin 45,000 Da; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 36,000 Da; carbonic anhydrase 29,000 Da; trypsinogen, PMSF treated 24,000 Da; trypsin inhibitor 20,000 Da; a-lactalbumin 14,200 Da.

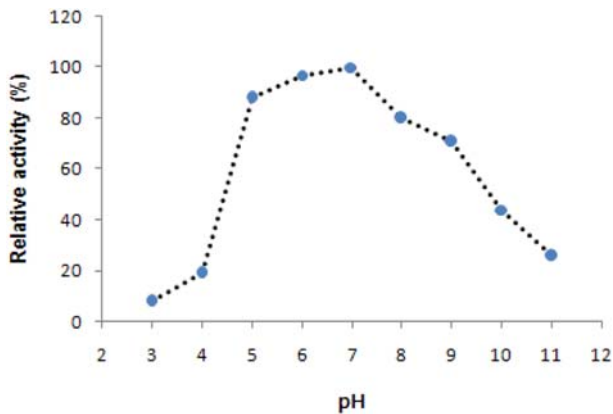


Fig. 6. Optimal pH of *C. mixtus* SC-22 agarase

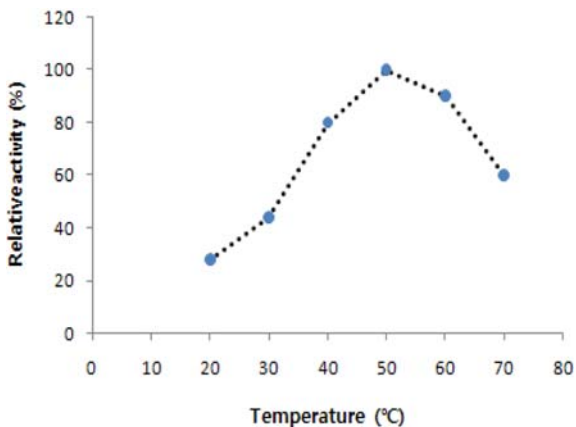


Fig. 7. Optimal temperature of *C. mixtus* SC-22 agarase

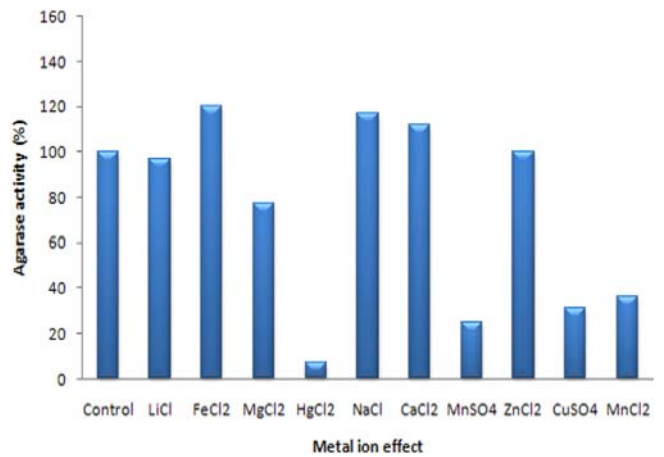


Fig. 8. Effect of various metal ions on *C. mixtus* SC-22 agarase activity. The agarase activity was measured with various metal ions at 1 mM concentration by the analysis condition mentioned in Method.

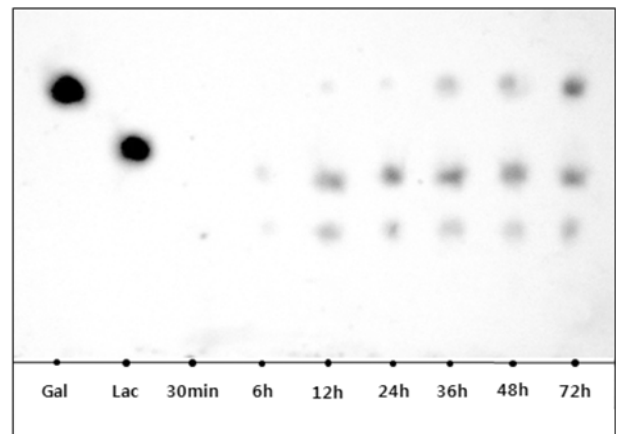


Fig. 9. TLC analysis of the oligosaccharide products hydrolyzed from agar by *C. mixtus* SC-22 agarase. Gal: galactose; Lac: lactose.

을 10~20% 증가시키는 것으로 나타났으나, Mg<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>와 Cu<sup>2+</sup> 이온들은 효소의 활성을 크게 저해시키는 것으로 나타났다(Fig. 8).

생성 올리고당의 TLC 분석. 정제효소에 의한 agar의 분해산물을 조사하기 위하여 20 mM sodium phosphate buffer에 용해된 agar 기질용액과 정제된 SC-22 균주의 효소액을 혼합하여 40°C에서 각각 30분, 6, 12, 24, 36, 48, 72시간 반응시킨 후 생성된 올리고당을 TLC 분석을 통해 확인하였다. 표준물질로서 단당류인 galactose와 이당류인 lactose를 사용하여 확인한 결과, 정제효소는 단당류와 이당류를 주 분해산물로 생성하였으며, 시간이 경과될수록 최종생성물로 이당류보다는 단당류인 galactose당의 생성량이 증가하는 경향을 보임으로써 Duckworth 등[1970]의 결과와 유사한 β-agarase 형태의 작용양식을 보였다(Fig. 9). 또한 각 종 다당류인 CMC, alginate, starch, agar, agarose 및 xylan에 대한 정제효소의 분해능 검토를 통한 기질 특이성을 확인한 실험한 결과, 정제효소는 agar와 agarose외에 다른 기질은 분해하지 못하였고, agar보다는 agarose에서 더 높은 활성을 나타내었다(data not shown).

## 초 록

한천분해세균 SC-22균을 대전 대청담부근의 담수에서 분리하였다. 생화학적 분석 및 16S rRNA 염기서열 분석을 통한 계통학적 분류를 통해 SC-22는 *Cellvibrio mixtus*로 동정되었다. 분리균의 생육 및 agarase 효소 생성능을 검토한 결과, SC-22는 탄소원으로 0.2% agar를 첨가한 배지에서 배양 36시간에 최대 생육을, 배양 48시간에 58.5 units/mL의 최대 효소활성을 나타내었다. 분리균은 세포외 및 세포내 agarase를 생성하였으며, zymogram 실험에 의해 P1, P2 및 P3의 isoenzyme을 분비하는 것으로 확인 되었다. 배양여액으로부터 겔여과법과 이온교환수지법을 단계적으로 이용하여 SC-22 균주로부터 SDS-PAGE에 의해 25 kDa의 효소를 정제하였으며, 정제효소는 zymogram에서 확인된 주 단백질인 P2(29 kDa)과 동일한 단백질임이 확인되었다. 또한 정제한 agarase의 효소학적 성질을 검토한 결과, 효소의 최적 pH와 최적온도는 pH 7.0과 50°C이었으며, 금속이온 효과의 경우 1 mM 농도의 수준에서도 Fe<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 이온 등은 정제효소의 활성을 10-20% 증가시킨 반면 Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 및 Cu<sup>2+</sup> 이온들은 효소 활성을 크게 저해하였다. 또한 TLC 분석을 통해 정제효소는 한천 분해 올리고당으로 주로 당당류와 이당류를 생성하므로 β-agarase의 작용특성을 보였다. 기질특이성 실험에서는 정제효소는 agar와 agarose만을 이용 하였고 유사 해조 다당류인 alginate는 물론 다른 다당류를 분해하지 못하였다.

**Key words:** agarase, characterization, *Cellvibrio mixtus* SC-22, isozymes, purification

## 감사의 글

이 연구는 2008년도 충남대학교 학술연구비 지원에 의한 논문으로 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Aoki T, Araki T, and Kitamikado M (1990) Purification and characterization of a novel β-agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur J Biochem* **187**, 461-466.
- Belas R, Bartlett D, and Silverman M (1988) Cloning and gene replacement mutagenesis of a *Pseudomonas atlantica* agarase gene. *Appl Environ Microbiol* **54**, 30-37.
- Buttner MJ, Fernley IM, and Bibb MJ (1987) The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2); nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol Gen Genet* **209**, 101-109.
- Collins MD, Goodfellow M, and Minnikin DB (1979) Isoprenoid quinones in the classification of coryneform and related bacteria. *J Gen Microbiol* **110**, 127-136.
- Duckworth M and Yaphe W (1970) Thin-layer chromatographic analysis of enzymic hydrolysate of agar. *J Chromatogr* **49**, 482-487.
- Ezaki T, Hashimoto Y, and Yabuuchi E (1989) Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in micro-dilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 224-229.
- Flament D, Barbeyron T, Jam M, Potin P, Czjzek M, Kloareg B, and Michel G (2007) Alpha-agarases define a new family of glycoside hydrolases, distinct from beta-agarase families. *Appl Environ Microbiol* **73**, 4691-4694.
- Ikemoto A, Kobayashi T, Emoto K, Umeda M, Watanabe S, and Okuyama H (1999) Effect of docosahexaenoic and arachidonic acids on the synthesis and distribution of aminophospholipids during neuronal differentiation of PC12 cells. *Arch Biochem Biophys* **364**, 67-74.
- Lakshmikanth M, Manohar S, Lalitha J (2009) Purification and characterization of β-agarase from agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. *Proc Biochem* **44**, 999-1003.
- Lakshmikanth M, Manohar S, Souche Y, and Lalitha J (2006) Extracellular β-agarase LSL-1 producing neoagarobiose from a newly isolated agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. *World J Microbiol Biotechnol* **22**, 1087-1094.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Morrice LM, McLean MW, Long WF, and Williamson FB (1983) β-Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. substrate specificities. *Eur J Biochem* **137**, 149-154.
- Na NMK, Kin Y, and Yaphe W (1972) Properties of agar: Parameters affecting gel-formation and the agarose-iodine reaction. *Carbohydr Res* **25**, 379-385.
- Ohta Y, Nogi Y, Miyazaki M, Li Z, and Hatada Y (2004) Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β-agarase from the novel marine isolate, JAM-A94. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 1073-1081.
- Ohta Y, Hatada YY, Miyazaki M, Nogi Y, Ito S, and Horikoshi K (2005) Purification and characterization of a novel α-agarase from a *Thalassomonas* sp. *Curr Microbiol* **50**, 212-216.
- Somogyi M (1952) Notes in sugar determination. *J Biol Chem* **195**, 19-23.
- Stosz SK, Weiner MR, and Coyne EV (1996) Agarase enzyme system from *Alteromonas* strain 2-40. *Biotechnol Adv* **14**, 356-360.
- Sugano Y, Nagae H, and Inagaki K (1995) Production and characteristics of some new β-agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J Ferment Bioeng* **79**, 549-554.
- Suzuki H, Sawai Y, and Suzuki T (2003) Purification and characterization of an extracellular β-agarase from *Bacillus* sp. MK03. *J Biosci Bioeng* **95**, 328-334.
- Tao X, Jing W, Kim KS, Yu Z, and Lee YC (2008) Cloning, expression and characterization of β-agarase gene from a marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. JT-6. *Kor J Life Science* **18**, 625-630.
- Van der Meulen HJ and Harder DC (1975) Production and characterization of the agarase of *Cytophaga flevensis*. Antonie van Leeuwenhoek. *J Microbiol* **41**, 431-447.
- Young KS, Bhattacharjee SS, and Yaphe W (1978) Enzymic cleavage of the α-linkages in agarose, to yield agarooligosaccharide. *Carbohydr Res* **66**, 207-211.