

해양한국발전프로그램(KSGP)연구개발사업

연 구 보 고 서

**한천의 고부가가치화를 위한 agarospectin
sulfatase의 대량생산
(Overproduction of agarospectin sulfatase
for the production of agarose)**

2004 . 8 . 30 .

부경대학(교) SG연구사업단

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 "한천의 고부가가치화를 위한 agarpectin sulfatase의 대량생산"에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 30 일

주관연구기관명: 부경대학교	:	부경대학교
사업단장	:	김 동 수
연구팀장	:	김 형 락
참여교수	:	변 대 석
동의대학교	:	남 수 완

요 약 문

I. 과 제 명

한천의 고부가가치화를 위한 agaropectin sulfatase 대량생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

가. Agaropectin sulfatase 유전자를 cloning하여 chaperone과 공발현시켜 수용성 및 활성형 효소를 *E. coli*에서 과발현하여 경제적으로 대량생산하고자 한다.

나. 대량생산된 agaropectin sulfatase를 이용하여 한천을 agarose로 전환시킴으로써 해조다당류의 고부가가치화를 추구하여 해조류 양식산업을 활성화하여 어민의 소득 증대를 추구하고자 한다.

다. 해양미생물의 유전자를 이용한 효소의 대량생산 시스템을 개발함으로써 해양유전자원을 이용한 생물벤처산업에 기여하고자 한다.

라. 본 연구를 수행함으로써 대학원생들에게 해양생물에 대한 흥미를 유발하고, 미래의 생물산업에 대한 해양유전자원의 무한한 잠재성을 부각시킨다.

2. 연구개발의 필요성

가. 우리나라의 한천생산량은 연간 563톤 (1997, 수산년감)이며, 이중 60-70%는 외국으로 수출되며, 수출된 식용한천은 재가공되어 미생물 배지용 또는 agarose로 제조되어 역수입되고 있다.

나. 원료 조제의 원가는 kg당 약 1 천원이고, 분한천, 실한천으로 조제할 경우 kg당 18,000원 내지 20,000원 가량이며, agarose 제조기술의 미비로 고품질의 의약품 및 연구용 agarose는 전량이 수입되고 있다.

다. 수입되는 agarose의 단가는 용도에 따라 다르나 kg당 1,250 - 10,000\$ 가량으로 원료에 비해 부가가치는 1,000 - 2,000배 가량이며 연간 60억원 가량 수입되고 있는 생명공학용 agarose를 대체함으로써 외화유출을 방지할 수 있으며, 수출로 인한 외화획득이 가능하다.

라. 종래의 agarose를 생산하는 방법은 유기용매에 의해 한천 중의 agaropectin을 분리·제거하여 agarose의 순도를 높이는 방법으로 장시간의 공정을 요하므로 보다 단순한 생산공정이 필요하다.

마. 한천으로부터 유기용매로써 agarose를 분리할 경우 유기용매 사용에 따른 폐수 처리, 유기용매 회수장치, 공정의 복잡성 등으로 인해 최종 제품의 수율이 낮고 산업폐기물이 다량 파생되므로 보다 고수율의 환경친화적인 agarose 생산공정이 필요하다.

바. Agaropectin sulfatase를 산생하는 미생물의 유전자를 PCR로 검색하여 균주와 유전자의 지적소유권을 확보함으로써 본 효소 또는 유사효소에 대한 국제적인 유전자 독점권을 확보할 필요가 있다.

사. 분리된 유전자를 이용하여 재조합 agarase 효소를 활성형으로 과발현·생산하기 위해 *E. coli*에서 chaperone 공발현계를 개발할 필요가 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. Agaropectin sulfatase 생산균의 분리

해수로부터 agaropectin sulfatase 생산능이 있는 해양미생물을 Zobell's 22165E 배지를 사용하여 분리하였다. 분리균의 효소활성은 먼저 plate 상에서 p-nitrophenyl sulfate 분해능을 검정한 후에 한천중의 황산기 분해능을 액체배양을 통해서 검정하였다. 분리균의 동정을 위하여 생화학 실험, 세포막 지방산 조성 및 16S rDNA 서열을 분석하였으며, 유산균과의 상관성을 밝히기 위하여 계통도를 작

성하였다. 그리고 균체의 성장과 효소생산능을 밝히기 위하여 배양온도, 염요구도, pH 및 발효시간을 확립하였다.

2. Agarpectin sulfatase의 정제 및 특성

발효기를 이용하여 agarpectin sulfatase 생산균을 대량배양하였다. 대량배양된 분리균주를 초음파파쇄기로 파쇄한 후 균체내 효소를 추출하였다. 추출된 조효소를 일련의 양이온교환크로마토그래피와 겔여과에 의하여 정제 하였으며 정제효소의 분자량, 반응최적 pH, 온도, 동력학적 상수, 기질특이성 등을 규명하였다.

3. Agarpectin sulfatase 대량생산을 위한 발현 system 개발

Pseudoalteromonas carrageenovora 유래 agarpectin sulfatase를 genomic DNA로부터 PCR를 통해 984 bp의 유전자를 증폭하였다. Vector (pET21a)에 agarpectin sulfatase 유전자를 subcloning하여 plasmid (pAST-A1) 확보하고 *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1 형질전환 균주선별 및 발현 system을 사용하였다. Vector (pHCE-IA)에 agarpectin sulfatase 유전자를 subcloning하여 plasmid (pHCE-AST) 확보하고, *E. coli* BL21(DE3)/ pHCE-AST 형질전환 균주 선별 및 발현 system을 사용하였다. 이때 선별배지는 LB + ampicillin (30 mg/ml)과 LB+ampicillin (30 µg/ml) + MUFS (4-methyl umbelliferyl sulfate)를 사용하였다. 유도적 system인 BL21/pAST-A1의 최적조건을 위해 IPTG 농도와 유도물질의 첨가시기 등을 결정하였다. 구성적 system의 발현 정도를 배지에 따른 활성 측정을 하였다. Charperon plasmid의 유도물질인 아라비노즈, 테트라사이클린 농도를 정하고, 첨가시기 등을 결정하였다. 회분식발효에 의하여 재조합균으로 최대 4 unit/ml 이상의 agarpectin sulfatase를 생산하였다.

IV. 연구개발결과 및 활용계획

1. 연구개발결과

가. Agarpectin sulfatase 생산균의 분리

p-Nitrophenyl sulfatate와 한천의 황산기를 분해할 수 있는 해양세균을 분리하여 AS6330으로 명명하였다. 분리균주는 호기성, Gram-음성의 간균으로 운동성이 있었다. 분리균은 NaCl 농도 1.5-3.5% 범위내에서 잘 증식하였고 Octadecanoic acid가 주요 지방산 성분이었다. 16S rDNA 서열을 분석한 결과 *Sphingomonas* 속들의 균들과 96% 가량의 유사성을 나타내었다. 균체성장과 효소생산을 위한 최적배양조건은 30°C, pH 7.0이었으며 배양 48시간d[효소생산성이 최대가 되었다.

나. Agarpectin sulfatase의 정제 및 특성

Sphingomonas sp. 5990균으로부터 이온교환, 소수성 및 겔 크로마토그래피에 의하여 agarpectin sulfatase를 정제하여TT다. 정제도는 12,800배로 증가하였고, 수율은 19.1%로 나타났다. 정제효소는 monomer상의 활성형을 띄었으며 SDS-PAGE에 의한 분자량은 62 kDa로 나타났다. NPS와 agar의 황산기 분해능은 pH 7.0, 45°C에서 최대를 나타내었으며, 최적 반응조건에서 NPS분해반응의 비활성은 97.2 U/mg 그리고 한천의 황산기 분해반응 비활성은 3.93 U/mgdm로 나타났다. 정제효소는 porphyran, fucoidan 및carrageenan에 비해 한천에 대하여 높은 효소활성을 나타내었다. 정제효소의 NPS 분해반응에 있어서 K_m 치와 V_{max} 값은 각각 54.9 μ M와 113 mM/min로 나타났다. 45°C에서 200 gram의 한천을 100 U의 효소와 8시간 반응시킨 결과 겔강도는 2.44배 증가하였고, agarose 수율은 97%로 나타났다.

다. Agarpectin sulfatase 대량생산을 위한 발현 system 개발

재조합 대장균에서 *P. carrageenovora* 유래 agarpectin sulfatase를 대량 생산하는데 있어 유도적 발현계 pAST-A1 (6.4 kb)와 구성적 발현계 pAST-A1 (4.8 kb)의 plamid를 구축하고, 대장균에 형질 전환하여 *E. coli* DH5 α /pHCE-AST의 OD₆₀₀=0.8~1.0일 때 10 μ M일 때 가장 높은 활성이 나타났고, *E. coli* BL21/pHCE-AST의 경우 Maxy-Broth 배지에서 16 시간 배양했을 때 활성이 가장 높게 5.88 unit/ml로 나타났다. Chaperone plasmid과 sulfatase 발현 plasmid와 co-transformation하였다. agarpectin sulfatase 발현 및 균체 증식이 좋지 못하였으며, 반면 arabinose를 유도물질로 사용했을 때는 *GroEL/ES*에 비해 *dnaK/J/E*

발현시 agarpectin sulfatase 발현율이 더욱 높았다. pAST-A1 단독 발현 (0.41 unit/ml · OD)과 pG-KJE6와 pAST-A1 공발현 (0.52 unit/ml · OD)로 균체 당 agarpectin sulfatase 발현량이 증가한 것을 알 수 있었다.

2. 활용계획

본 연구결과로 얻은 효소는 저가의 한천으로부터 고가의 agarose를 생산하기 위한 생물공정용 효소로 개발할 필요가 있다. 이러한 효소의 개발은 해양생명공학의 발전은 물론 우리나라 연안에서 생산되는 저가의 황산다당류를 고부가가치화하기 위한 수단이 될 것으로 예상된다.

V. 기대효과

- 1) Agarpectin sulfatase를 대량생산함으로써 해조류의 고부가가치화를 추구한다.
- 2) 고순도 agarose를 국산화함으로써 agarose의 수입비용을 절감하고, agarose 생산 설비를 간소화함으로써 공정비를 절감한다.
- 3) 고품질의 agarose를 수출하여 외화를 획득함으로써 어촌 경제를 활성화할 수 있으며, 홍조류 (우뭇가사리, 꼬시래기 등) 양식 산업의 활성화를 기대한다.
- 4) Agarpectin sulfatase 생산 미생물을 검색하여 유전자원을 확보함으로써 다수의 논문과 특허출원이 가능하다.
- 5) Agarpectin sulfatase의 생리적인 역할을 규명함으로써 해양에서의 황산염의 동화작용을 규명한다.
- 6) 해양 미생물로부터 유용단백질의 대량생산 기술을 확립함으로써 해양유래 유용단백질 생산 기반기술로 활용할 수 있다.
- 7) 생물공학적으로 agarose를 제조할 수 있는 효소를 대량생산할 수 있는 기술을 확보함으로써 해양생물자원을 이용한 바이오벤처 기업화에 기여한다.

S U M M A R Y

(영문 요약문)

Agar is composed of about 70% of agarose and about 30% of agaropectin which has sulfate groups in its molecule. Low portion of agaropectin in agar improves physical properties of agar, such as gel strength, gelling temperature, and electroendosmosis. Enzymatic hydrolysis of sulfate groups in agaropectin results in improvement of the physical properties of agar with little waste water. The isolated *Sphingomonas* sp. AS6330 from South coast in Korea produced agaropectin sulfatase and reaction conditions of the enzyme were established using agar as a substrate. The objective of this research is to identify agaropectin sulfatase producing microorganism and establish a fermentation condition for agaropectin sulfatase production, and characterize enzymatic properties of the agaropectin sulfatase produced from *Sphingomonas* sp. 6330. Furthermore expression system for overproducing recombinant agaropectin sulfatase was established using *Pseudoalteromonas carrageenovora*.

A bacterial strain capable of hydrolyzing sulfate ester bonds in p-nitrophenyl sulfate (NPS) and agar was isolated from the Southeast coast in Korea. The isolated strain (*Sphingomonas* sp. AS 6330) is aerobic, gram-negative, rod-shaped, and motile. The organism was grown optimally at NaCl concentration of 1.5-3.5%. Octadecanoic acid was the major cellular fatty acid in the isolate. The sequence similarity of the 16S rDNA with those of known *Sphingomonas* spp. was found to be at most 96%, implying that the isolate was a new *Sphingomonas* species. Optimum culture conditions were determined to be 30°C and pH 7.0 for 48 hr fermentation using a laboratory fermentor under constant culture conditions. Partially purified agaropectin sulfatase through Q-Sepharose and phenyl-Sepharose chromatographies catalyzed hydrolysis of sulfate ester bonds in agar and 97% of sulfates in agar were removed after 4 hr reaction at 45°C and pH 7.0. The agaropectin sulfatase from

the isolated bacterium might be useful for the removal of sulfate groups in agar.

agarose sulfatase was purified from *Sphingomonas* sp. AS6330 through ionic exchange, hydrophobic, and gel chromatographies. The purity increased 12,800-fold with approximately 19.1 % yield against cell homogenate. The enzyme was a monomeric protein with apparent molecular weight of 62 kDa as determined by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and 41 kDa as determined by gel filtration. The enzyme had optimum reaction condition for hydrolysis of sulfate ester bond in agar and *p*-nitrophenyl sulfate (NPS) at pH 7.0 and 45°C and had a specific activity of 3.93 and 97.2 U, respectively. The enzyme showed higher activity for agar than other sulfated marine polysaccharides such as porphyran, fucoidan and carrageenan. The K_m and V_{max} of the enzyme for hydrolysis of NPS were 54.9 μ M and 113 mM/min, respectively. With the reaction of 200 g of agar with 100 U of agarose sulfatase for 8 hr at 45°C, gel strength increased to 2.44 fold and 97.7% of sulfate in agar was hydrolyzed.

Inducible agarose sulfatase expression plasmid, pAST-A1 (6.4 kb) and constitutive agarose sulfatase expression plasmid, pHCE-AST (4.8 kb), were constructed with *astA* gene of *P. carrageenovora* and *E. coli* expression vectors (pET21a and pHCE-IA vector). The *E. coli* transformants on LB plate showed the hydrolyzing activity for 4-methylumbelliferyl-sulfate and *p*-nitrophenyl-sulfate. Most of agarose sulfatase activity was found in the cell lysate, but at 50 ~ 5000 μ M IPTG concentration the activity was found both in the culture supernatant and the cell lysate. The optimal IPTG concentration for the agarose sulfatase expression was found to be 10 μ M. 10 μ M IPTG addition at OD600 = 0.8~1.0 (mid-exponential phase) gave the highest expression level of agarose sulfatase with 5.5 unit/ml. When *E. coli* BL21(DE3)/ pHCE-AST was grown on LB medium containing 0.4% glycerol, agarose sulfatase activity reached about 7.08 unit/ml after 25 hr culture. The molecular weight of the recombinant enzyme was estimated to be 34 kDa by SDS-PAGE.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Summary (Korean)	1
I. Title	1
II. Objective and importance of the research	1
1. Objective of the research	1
2. Importance of the research	1
III. Content and scope of the research	2
1. Isolation of agarose sulfatase producing microorganisms	2
2. Purification and characterization agarose sulfatase	3
3. Coexpression of agarose sulfatase by molecular chaperone	3
4. Design of expression vector for overexpression of agarose sulfatase	3
IV. Results and application of the research	3
1. Results of the research	3
1) Isolation of agarose sulfatase producing microorganism	3
2) Purification and characterization agarose sulfatase	4
3) Design of expression vector for overexpression of agarose sulfatase	4
2. Application of the research	5
V. Achievements and contribution of the research	5
Summary (English)	6
Contents (English)	8
Contents (Korean)	12
Chapter 1. Introduction	16
Chapter 2. Scientific backgrounds of the research	20
Chapter 3. Contents and results of the research	23
1. Contents and methods of the research	23

1) Isolation of agaropectin sulfatase producing bacterium	23
(1) Materials for isolation of bacterium	23
(2) Isolation of agaropectin sulfatase producing bacterium	23
(3) Identification of isolated <i>Sphingomonas</i> sp. AS6330	23
① Characterization of phynotype of isolate	23
② Analysis of fatty acid from isolate	24
③ DNA amplification and sequencing of 16S rDNA	24
④ Phylogenetic analysis	24
(4) Fermentation conditions for the producing agaropectin sulfatase	25
① Determination of agaropectin sulfatase activity	25
② Determination of agaropectin sulfatase activity using synthetic substrate	25
2) Purification and characterization of agaropectin sulfatase	26
(1) Purification of agaropectin sulfatase	26
(2) Determination of molecular weight	26
(3) Determination of optimal reaction conditions	27
(4) Determination of substrate specificity	27
(5) Determination of kinetic parameters	27
(6) Other analytical methods	28
① Determination of sulfate contents	28
② Determination of EEO (Electroendosmosis)	28
③ Determiantion of gel strength	28
④ Determiantion of gelling temperature	28
⑤ Determiantion of meting temperature of gel	29
3) Overproduction of agaropectin sulfatase	29
(1) Overexpression system design and transformation	29
(2) Design of expression plasmid	29
(3) Design od constitutive overexpression system	30
(4) Co-expression with chaperone	30
2. Results of the research	31

1) Isolation of agarose sulfatase producing bacterium	31
(1) Identification of isolated <i>Sphingomonas</i> sp. AS6330	31
① Isolation of agarose sulfatase producing bacterium	31
② Characterization of phenotype of isolate	31
③ Analysis of fatty acid from isolate	31
④ DNA amplification and sequencing of 16S rDNA	33
⑤ Phylogenetic analysis	33
(2) Fermentation conditions for the producing agarose sulfatase	36
① Optimum pH	36
② Optimum temperature	36
③ Optimum salt concentration	36
④ Optimum fermentation time	39
2) Purification and characterization of agarose sulfatase	44
(1) Purification of agarose sulfatase	44
(2) Determination of molecular weight	48
(3) Determination of optimal reaction conditions	55
① pH dependence of agarose sulfatase	55
② Temperature dependence of agarose sulfatase	55
(4) Determination of kinetic parameters	58
(5) Effects of inhibitors	58
(6) Determination of substrate specificity	61
(7) Physicochemical properties of agarose prepared with agarose sulfatase	61
3) Cloning of agarose sulfatase and design of expression plasmids	67
(1) Design of inducible expression plasmid	67
① PCR of agarose sulfatase and subcloning	67
② Design of expression plasmid	67
(2) Design of constitutive expression	69
(3) Overexpression of agarose sulfatase in <i>E. coli</i>	70
① Inducible expression	70

② Constitutive expression	72
(4) Co-expression with chaperone	76
(5) Analysis of recombinant agarpectin sulfatase with Zymogram	76
Chapter 4. Achievements and contribution of the research	80
Chapter 5. Application of the research	81
1. Environmental effects	81
2. Economic effects	81
Chapter 6. International information obtained through the research	84
Chapter 7. References	85

목 차

요 약 문	1
I. 과 제 명	1
II. 연구개발의 목적 및 필요성	1
1. 연구개발의 목적	1
2. 연구개발의 필요성	1
III. 연구개발 내용 및 범위	2
1. Agaropectin sulfatase 생산균의 분리	2
2. Agaropectin sulfatase의 정제 및 특성	3
3. Agaropectin sulfatase 대량생산을 위한 발현 system 개발	3
IV. 연구개발결과 및 활용계획	3
1. 연구개발결과	3
가. Agaropectin sulfatase 생산균의 분리	3
나. Agaropectin sulfatase의 정제 및 특성	4
다. Agaropectin sulfatase 대량생산을 위한 발현 system 개발	4
2. 활용계획	5
V. 기대효과	5
영문요약	6
영문목차	8
국문목차	12
제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	23
제 1 절 연구내용 및 방법	23
1. Agaropectin sulfatase 생산균주의 분리 및 동정	23
가. 균주분리용 시료 및 배지	23
나. Sulfatase 생산 균주의 분리	23
다. <i>Sphingomonas</i> sp. AS6330의 동정	23

1) 형태학적인 특성	23
2) 분리균의 지방산분석	24
3) DNA 증폭과 서열결정	24
4) 계통학적 분석	24
라. Agarpectin sulfatase 생산 발효조건	25
1) Agarpectin sulfatase 활성의 측정	25
2) 합성기질을 이용한 효소활성	25
2. Agarpectin sulfatase의 정제와 특성 분석	26
가. 효소의 정제	26
나. 분자량 측정	26
다. 효소의 반응최적조건	27
다. 기질특이성	27
라. 효소의 반응속도	27
마. 기타 분석방법	28
1) 황산기 함량	28
2) EEO (Electroendosmosis)	28
3) 겔 강도	28
4) 겔화 온도	28
5) 겔 용점	29
3. agarpectin sulfatase 대량생산	29
가. agarpectin sulfatase 유전자의 과발현계 구축 및 형질전환	29
나. 발현 plasmid 구축	29
다. 구성적 과발현계 구축	30
라. Chaperone과 공발현	30
제 2 절 연구결과	31
1. Agarpectin sulfatase 생산균주의 분리 및 동정	31
가. Sphingomonas sp. AS6330의 동정	31
1) 효소생산균의 분리	31
2) 형태학적인 특성	31
3) 분리균의 지방산분석	31

4) DNA 증폭과 서열결정	33
5) 계통분석	33
나. Agarpectin sulfatase 생산 배양조건	36
1) 최적 pH	36
2) 최적 온도	36
3) 최적 염농도	36
4) 최적 발효시간	39
2. Agarpectin sulfatase의 정제와 특성 분석	44
가. 효소의 정제	44
나. 분자량 측정	48
다. 효소의 반응최적조건	55
1) Agarpectin sulfatase의 pH 의존성	55
2) Agarpectin sulfatase의 온도 의존성	55
라. 동력학적 상수	58
마. 저해제의 영향	58
바. 기질 특이성	61
사. Agarpectin sulfatase로 제조된 agarose의 물리화학적 특성	61
3. Agarpectin sulfatase 유전자의 cloning 및 유도성/구성적 과발현계 구축	67
가. 유도성 과발현계 구축	67
1) agarpectin sulfatase 유전자 증폭 및 subcloning	67
2) 발현 plasmid 구축	67
나. 구성적 과발현계 구축	69
다. 재조합 대장균에서 agarpectin sulfatase의 과발현	70
1) 유도적 발현계	70
2) 구성적 발현계	72
라. Chaperone과 공발현	76
마. 재조합 agarpectin sulfatase의 Zymogram 분석.	76
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	80
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	81
1. 환경성 개선효과	81

2. 경제성 개선효과	81
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	84
제 7 장 참고문헌	85

제 1 장 연구개발과제의 개요

우리나라의 한천생산량은 연간 600여 톤으로 전 세계 생산량의 12%를 차지하며, 이중 60-70%는 외국으로 수출되고, 나머지는 식품가공용으로 국내에서 소비된다 (수산연감, 2004). 수출되는 한천의 전량이 단순가공 처리된 제품이고, agarose 제조기술의 미비로 고품질의 의약품, 미생물배지 및 연구용 agarose는 전량이 수입에 의존하고 있으며, 특히 국내산 한천의 품질 우수성으로 agarose의 주요 제조회사인 미국의 FMC 등이 국내산 한천을 수입하여 전기영동용 agarose 및 의약품의 고가품을 제조하고 있다.

한천은 홍조류에 함유되어 있는 점질성의 다당류이며, galactose 중합체로 구성된 agarose(약 70%)와, 이들에 황산기가 부착된 상태의 agaropectin(약 30%)으로 구성되어 있다 (윤과 박, 1984). Agarose는 이당류인 agarobiose가 연속적으로 결합된 형태이나, agaropectin은 agarose에 황산기, pyruvic acid 및 uronic acid 잔기를 함유하고 있다 (Mackie and Preston, 1974). 한천에 결합되어 있는 산성기는 실질적으로 음전하를 띠고 있으므로 전기장하에서 물질의 이동에 영향을 줄 뿐만 아니라 켈강도를 약화시킨다 (Duckworth and Yaphe, 1971). 따라서 전기영동용으로 사용되는 한천의 제조법은 여러단계의 유기용매 분획을 통하여 한천중의 agaropectin을 제거함으로써 agarose의 순도를 높여 의학과 생명공학분야에 사용되고 있다.

최근 생명공학의 발달과 더불어 산업적으로 유용한 효소를 개발하기 위한 신규 미생물자원에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 식품과 의약공업에 사용되는 대부분의 효소는 육상 유래 미생물로부터 개발되었다. 지구 표면적의 70%를 차지하는 해양은 전 생물종의 약 절반 가량인 300만 내지 500 만 정도의 생물종이 분포하는 것으로 알려져 있다 (deVries and Beart, 1995). 육상과는 다른 해양의 서식환경은 다양한 생물종의 주요한 자원으로 인지되어 여러 가지 유전자원의 보고로 알려져 있다. 현재까지 알려진 바로는 해양으로부터 이용되는 자원은 전체의 1% 이하인 것으로 알려져 있다 (Colwell, 1993). 해양생물로부터 유래되는 대부분의 효소는 육상 생물 유래 효소와 유사하다. 그러나, 해양에 서식하는 해조류의 분해와 해조류중의 특정 화학기를 수식하거나 가수분해하는 효소들은 육상 생물에는 존재하

지 않는 것으로 보고되고 있다 (Chandrasekaran, 1997). 이러한 해양생물 유래 효소와 신물질의 개발은 향후 의약과 식품산업에 있어서 중요한 자원으로 평가되고 있다 (Hard, 1998).

세균 등의 미생물에서 agaropectin sulfatase (arylsulfate sulfohydrolase EC 3.1.6.1)의 생산은 기질의 존재에 의해 유도되고 (Fitzgerld 등, 1979; Fitzgerld와 Cline, 1977) sulfate나 cysteine 합성 전구체, 세포증식에 필요한 함황물질에 의해 효소생산이 조절된다 (Dodgson 등, 1982; Kertesz 등, 1993). *Pseudomonas puida*, *Escherichia coli*, 및 *Staphylococcus aureus*의 배양시 배지에 sulfate를 첨가함으로써 세포내에서 생성이 억제되는 단백질이 2차원 전기영동에 의해 확인되었으며, 이 단백질이 순수 분리되어 동정되지는 않았으나 sulfate 대사에 관여하는 agaropectin sulfatase로 추정되는 것으로 알려져 있다 (Kertesz 등, 1993). 세균의 agaropectin sulfatase 생성에 관한 연구로는 *Klebsiella aerogenes*가 대표적이며, sulfate 또는 cysteine에 의해 agaropectin sulfatase의 생산이 억제되고 tyramine의 첨가에 의해 agaropectin sulfatase의 생산이 증가되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 효과는 agaropectin sulfatase와 monoamine oxidase의 operon이 공동 조절되기 때문인 것으로 알려졌다.

Agaropectin sulfatase는 arylsulfate ester 결합을 분해하여 phenol group과 무기황을 생산한다. agaropectin sulfatase는 미생물에서 포유동물에 이르기까지 다양하게 분포하지만 그들의 1차구조는 유사성이 대단히 높은 것으로 알려져 있다 (Kertesz, 1999). 미생물 arylsulfatase에 관한 대부분의 연구는 *Klebsiella pneumoniae* (Miech 등, 1998), *Salmonella typhimurium* (Henderson과 Milazzo, 1979), *Pseudomonas aeruginosa* (Beil 등, 1995) 및 *Escherichia coli* (Jansen 등, 1999)와 같은 병원성 미생물이 산생하는 효소에 관하여 국한된 실정이다. 그러나 *Streptomyces griseorubiginosus*가 생산하는 arylsulfatase는 암치료제로써의 가능성이 있는 것으로 보고되고 있다 (Uki 등, 1995a; 1995b).

이상과 같이 sulfatase에 대한 연구는 극히 제한적이지만 sulfatase 생산균에 관한 연구는 모두가 토양으로부터 분리된 세균에 국한된 실정이다. Sulfate 중 arylsulfate는 특히 해조류에 다량으로 함유되어 있는 화합물이다. 대부분의 갈조류와 홍조류의 세포벽을 구성하고 있는 다당류는 arylsulfate로 구성되어 있다. 해조류를 섭취하는 해양동물 중에는 소화효소의 일부로써 agaropectin sulfatase가 분포하

는 것으로 알려져 있으며 식이 중에 함유되어 있는 다당류의 sulfate ester 결합을 분해하여 해조 다당류의 체내 이용도를 높이고 (Milanesi와 Bind, 1972; Hoshi와 Moriya, 1980) 특히 해조류에서는 황의 동화와 이화작용에 관여하는 것으로 알려져 있다 (DeHost 등, 1988). 여러 가지 연체동물의 소화관은 arylsulfatase의 활성이 높은 것으로 알려져 왔다 (Dhevendaran 등, 1980). 어류, 갑각류, 해양 미생물 등 여러 가지 해양생물로부터 agaropectin sulfatase의 분포에 대하여 몇몇 연구가 시도되었으나 (Dhevendaran, 1984; Dhevendaran 등, 1980; Maya 등, 1990), agaropectin sulfatase의 활성이 해양동물의 소화효소로 분비되는지, 소화관에 상존하는 세균에 의한 것인지에 대한 자료는 미미한 정도이다. 최근 수종의 어류, 새우류 및 조개류를 대상으로 소화관과 소화관내 내용물을 취하여 agaropectin sulfatase 활성을 측정 한 결과 생물의 식습관과 관련이 없는 것으로 나타났으며, 소화관에 상존하는 세균수와 agaropectin sulfatase의 활성과는 상관관계가 없는 것으로 나타났다 (Dhevendaran과 Maya, 1998). Arylsulfatase를 생산하는 해양미생물이 분리되어 *Alteromonas carrageenovora*로 동정되었으며 (Akagawa-Matsushita 등, 1992), arylsulfatase 유전자가 cloning되었다 (Barbeyron 등, 1995). *A. carrageenovora*의 arylsulfatase는 arylsulfatase의 활성뿐만 아니라 부분적으로는 carrageenan의 분해에도 관여하는 것으로 보고되고 있으나, 재조합 효소의 특성에 관한 연구는 보고되고 있지 않고 있다.

본 연구의 선행연구로써 해양 미생물을 대상으로 agaropectin sulfatase 생산균주를 분리하기 위한 검색방법을 개발하여 많은 미생물을 대상으로 검색한 결과 agaropectin sulfatase 활성이 높은 균주를 선발하여 동정하였다. 본 균주에서 생산된 agaropectin sulfatase는 해조다당류의 glycoside 결합을 분해하지 않고 해조류 중의 sulfate기만을 가수분해하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 이러한 효소는 한천중의 sulfate기를 선택적으로 분리 제거함으로써 저가의 한천을 원료로 고가의 전기영동용 agarose를 제조할 수 있는 다당류 수식효소로서의 이용가능성이 높은 것으로 밝혀졌다.

따라서 해양으로부터 분리된 agaropectin sulfatase 생산능이 강한 균주를 대상으로 agaropectin sulfatase 생산을 향상시키기 위한 발효조건을 확립하고, 대량 발효를 통하여 균체로부터 agaropectin sulfatase를 정제하여 효소의 생화학적 특성을 규명함으로써 산업적인 활용을 위한 기초자료를 확보하고자한다. 그리고 *A.*

*carrageenovora*로부터 agaropectin sulfate 유전자를 cloning하여 재조합 단백질의 대량생산을 위한 발현 system을 개발하여 한천중의 agaropectin의 황산기를 효과적으로 분해함으로써 생물공학적인 agarose의 생산을 위한 기초자료를 확보하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내의 한천 및 agarose에 관한 연구는 계절과 지역에 따른 한천 원조의 성분변화 (Kim 등, 1995), 한천을 추출하기 위한 전처리 조건 그리고 한천의 성분 조성에 관한 연구가 대부분이다 (Do, 1997; Lee 등, 1975; Park 등, 1985). 한천으로부터 agarose 및 고순도 agarose의 정제법에 관한 기술 현황은 국내의 연구는 전무하며 홍조류로부터 한천의 제조에만 국한되어 있는 실정이다.

외국의 경우, 의학, 생명공학의 발달과 더불어 agarose 수요의 급증으로 한천중의 황산기를 제거하기 위한 많은 연구가 진행되었다 (Duckworth와 Yaphe, 1971; Laas 1972; Guiseley 등, 1993; Marinho-Sorino 등, 2001). 한천의 알칼리 처리는 galactose 잔기의 황산기를 효과적으로 제거할수 있는 간단한 공정이지만 (Guiseley, 1970), 알칼리 처리에 의하여 제품의 갈변과 겔강도의 저하를 초래한다 (Lonnerdal과 Laas, 1976). 전통적인 agarose의 분리는 acetylation 후에 chloroform으로 분리하거나 (Araki, 1937), polyethylen glycol로 분획한 후에 (Flemingger 등, 1990), 이온교환 수지에 의하여 흡착 분리하는 방법이다 (Duckworth와 Yaphe, 1971). 유기용매추출과 이온교환 수지에 의한 병용 분리방법은 원래의 agarose에 비해 agarose의 겔강도가 향상되고 전하밀도가 감소한다 (Duckworth와 Yaphe, 1971). 그러나 이러한 방법에 의해 제조된 agarose에서도 agaropectin의 혼입으로 말미암아 상당한 양의 황산기가 함유되어 있다. 반복된 유기용매에 의한 분획과 이온교환 수지에 의한 agarose의 분리는 수율의 감소는 물론 공정비의 상승과 대규모의 생산에는 적당하지 않다 (Duckworth와 Yaphe, 1971). Polyethylene 침전후 isoprophy alcohol에 의한 겔강도가 향상되고 황산기의 함량이 감소되나 양 30% 가량의 회수율을 나타내고 있다 (Guiseley 등, 1993). 이러한 이온교환 크로마토그래피에 의한 agarose의 분리는 DEAE-Sephadex (Duckworth와 Yaphe, 1971)와 Dowex 1x2 (Izumi, 1970)를 사용했을때도 각각 25와 28%의 낮은 수율을 나타내고 있으므로 산업적인 공정에는 부적합한 것으로 판명되었다. 그리고 유기용매에 의한 agarose의 정제법은 공정비가 과도하게 소요될 뿐만 아니라, 고가의 장비와 이에 따른 고도의 기술을 요구하고 있으며, 유기용매의 사용에 따른 여러 가지 용매회수 장치의 시설과 열악한 작업환경, 과도한 산업폐기물의 파생으로 정제한천의 생산은 후진국의

뭍이 되고 있다.

한천으로부터 agarose의 제조는 agaropectin과 agarose의 용해도를 이용한 분별침전에 의해 제조되고 있으며, 대부분의 기술이 외국의 agarose 제조사에 의해 특허로 등록되어 있다. 현재까지 agarose를 생산하기 위하여 한천에 존재하는 agarose를 분리하는 연구에 치중하여 왔다. Agarose를 생산하기 위한 주된 연구는 유기용매 또는 양이온 계면활성제를 사용하여 agarose 또는 agaropectin을 선택적으로 침전시켜 분획하는 과정으로 유기용매와 계면활성제의 사용에 의한 폐수처리 비용이 과중하다. 그리고 유기용매를 회수하기 위한 증류장치의 설비, 작업환경의 악화, 공정에 대한 여러 가지 위험요소들을 내포하고 있다.

Arylsulfatase는 포유동물로부터 세균에 이르기까지 광범위하게 분포하며, 생물종에 따라 그 기능은 다르나 효소의 1차(Franco 등, 1995; Parenti 등, 1997) 및 3차 구조(Lukatela 등, 1998; Bond 등, 1997)는 높은 상동성을 지닌다. 게다가 원핵세포와 진핵세포의 sulfatase의 활성부위에는 formylglycine(FGly)이 존재하며 효소의 촉매활성에 주요한 역할을 한다(Dierks 등 1997; Miech 등 1998; Schmidt 등, 1995; Selmer 1996). 이러한 점은 FGly가 촉매활성 잔기로 작용시 황산 ester 결합을 절단하는 촉매 메카니즘에 중요한 역할을 담당하는 것을 의미한다(Recksi 등 1998). FGly 잔기의 부재는 sulfatase 활성의 소실을 의미하며 lysosome의 기능에 치명적인 것으로 알려져 있다(Kolodny 와 Fluharty, 1995; Schmidt 등, 1995). 진핵세포에 있어서 sulfatase의 FGly은 endoplasmic reticulum에서 cysteine 51번 잔기의 산화에 의해 생성되며(Dierks 등, 1998; 1997) cysteine의 산화는 ER로 translocation 중에 일어나는 것으로 알려져 있다.

진핵세포의 cytosol에 존재하는 cysteine-type sulfatase와는 달리, 원핵세포의 arylsulfatase인 *Klebsiella pneumoniae* agaropectin sulfatase (Murooka 등, 1990)는 periplasm에 존재하는 serine-type sulfatase로 FGly는 serine이 산화되어 생성된다 (Miech 등, 1998). 특히 *Klebsiella pneumoniae*의 agaropectin sulfatase의 FGly는 serine 72번 잔기의 번역후 수식에 의해 일어난다. *Klebsiella* agaropectin sulfatase를 대장균에서 발현시킬 경우 활성형을 지니기 때문에 serine 잔기의 FGly로의 전환은 *E. coli*에 의해서도 촉매됨을 알 수 있다 (Murooka 등, 1990). 게다가 이 균은 *P. aeruginosa*의 cysteine-type sulfatase를 대량으로 발현시킬 때 cysteine 51을 FGly로 정량적으로 산화시킨다 (Dierks 등, 1998). 그러나 *Pseudomonas*

sulfatase의 cysteine 51을 serine으로 대체시킨 mutant를 발현시킬 때 FGly의 수식은 일어나지 않는다 (Dierks 등, 1998). 이러한 결과는 *E. coli*가 2 종의 FGly 생산 시스템을 지니고 있음을 의미한다.

한편 *Pseudomonas aeruginosa*를 여러 가지 배양조건에서 배양시켰을 몇 종류의 다른 agaropectin sulfatase 활성이 나타나는 것으로 보고되고 있다. 이러한 효소 중 하나는 arylsulfate가 sulfur 원으로 공급될 때 나타나나 다른 황산기가 sulfur 원(sulfate, sulfite, thiosulfate, cysteine)으로 공급될 때는 억제되는 것으로 알려져 있다. 그리고 *Pseudomonas aeruginosa* PAO로부터 분리된 agaropectin sulfatase를 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 분자량은 57 kDa으로 밝혀졌으며, 최적 활성은 57°C와 pH 8.9에서 나타났으며, 이전의 보고와는 달리 함황물질에 의해 유도되거나 억제되는 agaropectin sulfatase는 나타나지 않고 오직 한 종의 agaropectin sulfatase 만이 존재하는 것으로 보고되고 있다 (Beil 등, 1995). 최근 들어 *Pseudomonas testosteroni*로부터 새로운 sulfatase를 분리하여 이 효소의 생화학적 특성을 보고하였으며, 3-hydroxy-5-cholenic acid 3-sulfatate의 sulfate ester 결합의 가수분해에 특이성이 높은 것으로 보고되고 있다(Tazuke 등, 1998).

이상과 같이 agaropectin sulfatase에 관한 연구는 주로 계면활성제의 분해에 관한 연구로써 해조다당류중의 황산기를 분해시켜 보다 고가의 다당류 유도체의 생산에 관한 연구는 현재까지 이루어지지 않고 있다. 따라서 온화한 효소반응 조건 하에서 agaropectin의 sulfate기를 제거함으로써 agaropectin을 agartose로 전환시키는 연구는 agarose 제조에 관련된 연구는 보고되고 있지 않고 있다.

제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과

제 1 절 연구내용 및 방법

1. Agaropectin sulfatase 생산균주의 분리 및 동정

가. 균주분리용 시료 및 배지

Agaropectin sulfatase 생산 균주분리하기 위하여 해조류가 많이 서식하는 여수지역의 해역으로부터 해수를 채취하였다. 해수의 경우는 0.45 um의 공극을 가지는 여과막을 사용하여 해수를 1,000배 농축하여 사용하였다. 균주 분리용 배지는 Zobell's 2216E medium (beef extract, 10 g; peptone, 10 g; sea water, 750 ml; tap water, 250 ml; agar 20g)을 사용하였다. 그리고, agaropectin sulfatase 생산 균주 분리용 배지는 위의 배지에 sulfatase 활성을 확인하기 위하여 10 mM p-nitrophenyl sulfate 용액 50 ul를 도말하여 발색정도를 관찰하여 확인하였다.

나. Agaropectin sulfatase 생산 균주의 분리

위에서 기술한 균주분리용 시료를 사용하여 균주분리용 배지에 도말하여 sulfatase 생산 균주를 분리하였다. 즉, 시료를 5 ml의 soft agar에 십진희석법으로 각각 희석하여 미리 준비된 균주분리용 배지에 중층을 형성시켜 굳혔다. 이를 30°C의 배양기에 2일간 배양하여 colony 주위에 황색의 환이 생성된 균주를 순수 분리하였다.

다. *Sphingomonas* sp. AS6330의 동정

1) 형태학적인 특성

세포의 형태는 Gram-staining한 후 현미경으로 직접 관찰하였으며, 분리균의 운동성은 wet mount 법으로 관찰하였다. Oxidase 활성은 Kovacs (1956)의 방법으로, peroxidase 활성은 colony를 직접 0.5% 과산화수소수와 반응시켜 측정하였다. 탄수화물의 동화작용은 Biolog GN microtiter plates (BIOLOG Inc., Hayward, CA)

를 사용하여 분석하였다.

2) 분리균의 지방산분석

Zobell's 2216E 배지를 이용하여 30°C 에서 24시간 배양된 분리균을 원심분리하여 균체를 얻었다. 균체에 1.0 ml의 saponification 시약 (15 g NaOH, 50 ml methanol, 50 ml water)을 가하고 100°C에서 30 분간가열하여 비누화 시킨 후 2 ml의 methylation 시약 (325 ml 6 N HCl, 275 ml methyl alcohol)을 가하여 80°C에서 10 분간 가열하여 메틸화시켰다. 냉각후 동량의 증류수를 가하여 지방산 methyl esters를 n-hexane으로 추출하였다. 추출된 지방산 methyl esters는 gas chromatography로써 분석하였다.

3) DNA 증폭과서열결정

분리균의 genomic DNA는 Sambrook 등 (1989)의 방법에 따라 분리하였다. 분리된 genomic DNA를 주형으로 대장균의 16S rDNA의 primer 8F (positions 8-27)와 primer 1492R (1492-1510)를 사용하여 16S rDNA를 증폭하였다 (Edward 등, 1989; Wilson 등, 1990). 증폭된 16S rDNA는 primer 8F (positions 8-27), primer 330F (330-348), primer 515R (515-535), primer 803R (803-785), primer 927R (9270942), primer 1107F (1107-1088) 및 primer 1492R (1492-1510)를 이용하여 증폭하였다. 증폭산물은 Wizard PCR prep (Promega, Madison, USA)을 이용하여 정제하였다. DNA sequence는 BigDye terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, Foster City, USA)를 이용하여 결정하였으며 data는 ABI Prism 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Foster City, USA)로 분석하였다.

4) 계통학적 분석

16S rDNA 서열을 GenBank databases의 *Sphingomonas* 속과 alignment하여 Fitch-Margoliash (Fitch와 Margoliash, 1967)와 neighbor-joining (Saitou와 Nei, 1987) 방법에 따라 Phylogenetic trees를 작성하였다. Neighbor-joining과 Fitch-Margoliash 방법의 진화도는 Jukes와 Cantor (1969)의 방법에 따라 결정하였

다. *Erythrobacter longus* 를 outgroup 지표로 사용하였으며 data 분석은 PHYLIP package (Felsenstein, 1993)를 사용하였다. Neighbor-joining tree는 bootstrap 분석에 따라 (Felsenstein, 1985) 평가하였다.

라. Agaropectin sulfatase 생산 발효조건

Zobell's 2216e 배지의 초기 pH를 4-9.5의 범위내에서 pH 0.5 단위로 조정 한 후 멸균하여 pH에 따른 균체성장과 효소생산을 측정하였다. 그리고 최적의 pH로 조정된 배지를 멸균한 후 발효온도를 20, 25, 30, 35, 40 및 45°C로 조정한 후 균체성장과 효소생산을 측정하였다. 그리고 균체성장과 효소생산에 미치는 염농도의 영향을 분석하기 위하여 배지에 0-7%의 NaCl을 가하여 균체를 접종한 후 발효시켜 염농도에 따른 균체성장과 효소생산을 분석하였다. 상기의 최적조건하에서 발효조를 이용하여 발효시간에 따른 균체성장과 효소생산을 측정하여 최적조건을 확립하였다. 확립된 발효조건하에서 생산된 효소를 정제용 효소시료로 사용하였다.

1) Agaropectin sulfatase 활성의 측정

Agaropectin sulfatase 활성은 p-nitrophenyl sulfate (NPS)로부터 p-nitrophenyl이 유리되는 양으로 측정하였다. 효소용액 1 ml과 25 mM NPS (pH 7.0) 250 ul를 포함하는 반응액을 45°C에서 30분간 반응시켰다. 반응후 0.5 M NaOH 용액 1 ml을 첨가하여 반응을 정지시키 후 생성된 p-nitrophenyl의 양을 410 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

한천에 대한 agaropectin sulfatase 활성은 Dodson과 Price (1963)의 방법에 따라 행하였다. 효소용액 1 ml (0.2 M Tris-HCl, pH 7.0)과 9 ml의 5% agar 현탁액을 45°C에서 60분간 반응시킨 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후 상등액 0.9 ml에 0.2 ml의 진한 염산과 0.6 ml의 침전용액 (13.3% 염화바륨 - 2.67% Tween #80 용액)을 가하여 혼합 후 상온에서 30분간 방치 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 합성기질을 이용한 효소활성

Agaropectin sulfatase 활성은 p-nitrophenyl sulfate (NPS)로부터

p-nitrophenyl이 방출되는 것으로 측정하였다. 효소용액 1 ml과 25 mM NPS, pH 7.0, 250 ul를 포함하는 반응액을 45°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응은 0.5 M NaOH 용액 1 ml을 첨가하므로써 정지시켰다. 그리고 생성된 p-nitrophenyl은 410 nm에서 흡광도를 측정하여 그 양을 확인하였다.

2. Agarpectin sulfatase의 정제와 특성 분석

가. 효소의 정제

10 L 발효조에서 2일간 배양된 *Sphingomonas* sp. AS6330을 원심분리 (8,000 x g , 20 min)하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체를 1 mM PMSF와 0.1% Triton X-100이 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)로 현탁시킨 다음, 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄하여 원심분리 (10,000 x g, 20 min)하였다. 상등액을 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)으로 평형화된 Q-Sepharose 칼럼 (2.5 x 12 cm)에 흡착시켜 칼럼에 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후, 흡착된 효소를 0.1-0.5 M NaCl을 함유하는 동일 완충용액 (400 ml)으로 직선상 농도구배법으로 용출시켰다. Sulfatase 획분을 모아서 ammonium sulfate (A. S.)농도가 2.0 M이 되게 조정하였다. 이 효소용액은 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)에 1.0 M A.S.가 함유된 완충액으로 평형화된 phenyl-sepharose 칼럼에 적용되었다. 효소는 1 M-0 M A.S.을 함유하는 동일완충용액 (300 ml)으로 직선상 농도구배법을 이용하여 용출하였다. Sulfatase 획분을 모아서 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)을 이용하여 4배 희석하였으며, 희석된 효소는 Mono Q 칼럼에 흡착되었다. Mono Q에 의한 효소정제는 2회 반복하였으며, 효소획분을 마지막으로 GPC 칼럼을 이용하여 정제하였다. 정제효소의 검정은 SDS-PAGE로 행하였다.

나. 분자량 측정

분리된 agarpectin sulfatase의 분자량은 OHpak KB-805 HQ GPC 칼럼 (Shodex사, 일본)을 이용하여 겔여과로 분석하였다. 겔여과시의 완충액은 0.1 M NaCl을 함유한 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)용액을 사용하였다. 칼럼의 void volume 은 Dextran 2,000을 사용하여 측정하였으며, 분자량계산을 위한 표준단백질은

tyroglobin (670 kDa), bovine gamma globulin (158 kDa), ovalbumin (44 kDa), myoglobin (17 kDa) 및 vitamin B-12 (1.35 kDa)를 사용하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli (1970) 방법에 따라 10% polyacrylamide 겔을 사용하였다. 분자량 계산을 위한 표준 단백질은 phosphorylase (97.4 kDa), BSA (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa) 및 lactalbumin (14.2 kDa)를 사용하였다.

다. 효소의 반응최적조건

최적 pH: 효소의 최적 반응 pH를 결정하기 위한 완충액은 0.1M citrate/0.2 M sodium phosphate (pH 4.0-7.0), 0.1M Tris-HCl (pH 7.0-9.0), 및 0.1M sodium carbonate buffer (pH8.8-10.1)를 사용하였다.

최적 온도: 각 효소용액에 대하여 반응온도별로 반응시켜 유리되어 나오는 생성물의 양을 측정함으로써 효소활성의 온도의존성을 구하였다.

라. 기질특이성

정제효소의 기질특이성을 분석하기 위하여 대표적인 황산다당류인 porphyran, fucoidan, k-carrageenan 및 한천을 사용하였다. 황산다당류를 0.3%의 농도로 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0)에 녹인 후 45°C에서 30분간 반응시킨 후 유리된 황산기 함량을 Dodgson과 Price의 방법 (1963)에 따라 결정하였다. 즉, 효소용액 1 ml (0.2 M Tris-HCl, pH 7.0)과 9 ml의 5% 황산다당류 현탁액을 45°C에서 60분간 반응시킨 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 시킨 후 상등액 0.9 ml에 0.2 ml의 진한 염산과 0.6 ml의 침전용액 (13.3% 염화바륨 - 2.67% Tween #80 용액)을 가하여 혼합 후 상온에서 30분간 방치 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 효소의 반응속도

Michaelis-Menten 정수 (K_m')와 최대반응속도 (V_{max})는 각 농도의 기질 용액에 대하여 반응온도 45°C에서, 반응시간 (분)당 유리되어 나오는 생성물의 양을 측정하여 Lineweaver-Burk식에 따라 구하였다 (Dixon과 Webb, 1979). 촉매정수 (K_{cat})는 효소 1mole이 1분간 유리시키는 반응생성물의 양으로 계산하고, 효소의

촉매효율 (Kcat/Km)도 구하였다.

바. 기타 분석방법

1) 황산기 함량

황산기의 측정은 시료를 가열하여 녹여 유리관에 부어 건조시킨다. 건조후 생성된 박막을 infrared (IR) spectrophotometer로 흡수과장을 측정하였다. 이때 표준품으로는 이들 함량이 알려진 상용의 agarose를 구입하여 사용하였다.

2) EEO (Electroendosmosis)

EEO는 agarose내에 황산기 또는 pyruvate 잔기의 수를 측정하는 방법으로 음전하를 띠는 물질이 agarose 겔에 존재함으로써 DNA와 같은 물질의 전기이동을 방해한다. 따라서 EEO의 측정은 agarose의 순도를 나타내는 지표가 되며, EEO의 측정은 dextran과 albumin을 동시에 전기영동하여 측정한다. 이때 EEO는 dextran의 이동거리(OD)를 dextran과 albumin(OA)의 총 이동거리(OD+OA)로 나누어준 값으로 나타내었다 (FMC 규격).

$$-M_r = \frac{OD}{OD + OA}$$

3) 겔 강도

각 시료의 겔 강도의 측정은 JIS 규격에 따른다. 즉, 한천, agarose, 고순도 agarose 및 agarose 유도체의 겔 강도는 1.0 및 1.5%의 농도가 되도록 증류수에 시료를 첨가하여 가열하여 녹인다 (105, 10분의 autoclavor를 사용해도 무방함). 이를 비이커 또는 petri dish에 붓고 20에서 15시간 방치하여 gel화시킨 후 텍스터미터를 사용하여 측정하였다.

4) 겔화 온도

각 시료의 겔화 온도의 측정은 JIS 규격에 따른다. 즉, 1.5% 농도가 되도록 녹인 시료를 시험관(2 x 20 cm)에 넣어 굳기 전에 온도계를 넣어서 수시로 온도계

를 들어올려 온도계와 시험관이 같이 올라오는 시점의 온도를 측정하여 겔화 온도로 하였다.

5) 겔 용점

각 시료의 겔이 녹는 온도의 측정은 JIS 규격에 따른다. 즉, 1.5% 농도가 되도록 녹인 시료를 시험관(2 x 20 cm)에 넣어 굳기 전에 온도계를 넣어서 겔화시킨 후, 수조에 넣어 열을 가하면서 온도계와 시험관이 분리되는 시점의 온도를 측정하여 겔용점으로 하였다.

3. Agaropectin sulfatase 대량생산

가. Aaropectin sulfatase 유전자의 과발현계 구축 및 형질전환

Sulfated polysaccharide의 탈황을 촉매 하는 것으로 알려진 *Pseudomonas carrageenovora* 유래 agaropectin sulfatase를 genomic DNA로부터 PCR를 통해 984 bp의 유전자를 증폭하였다 [Bond 등, 1997; Dhevendaran 등, 1980]. 이 때 사용한 primer는 forward: 5'-CGGGATCCCATGCAAAAAATTAGTATTATA-3' (underline: *Bam*H I) reverse (2중): 5'-CCAAGCTTTTAGCGTTTTAGTTCGTAAC-3'(underline :*Hind* III), 5'-CCAAGCTTGCGTTTTAGTTTCG TAAC-3'를 사용하여 구축하였다.(underline :*Hind* III). 대장균에서 발현시키기 위해서 PCR 증폭한 agaropectin sulfatase 유전자 (*astA*)를 대장균 cloning vector인 pBluescript II SK(+)에 삽입하였다 (pBlue-ast).

나. 발현 plasmid 구축

pBlue-ast plasmid의 약 1 Kb의 agaropectin sulfatase 유전자 단편을 제한 효소 (*Hind*III, *Bam*H I) 이용하여 pET21a vector에 삽입하고 *E. coli*에 형질전환하였다. 형질전환용 host 균은 *E. coli* DH5a와 *E. coli* BL21(DE3)을 사용하였다. 형질전환균의 선별배지는 LB 배지에 30 ug/ml의 ampicillin과 1 mM의 IPTG 및 50 mM의 4-methylumbelliferyl-sulfatase를 함유하여 sulfatase 유전자를 포함하는 형질전환균을 선별할 수 있게 하였다.

다. 구성적 과발현계 구축

구성적 발현계를 구축하기 위해 유도적 발현계 plasmid pAST-A1에 제한 효소 (*Bam*HI, *Hind*III)로 처리된 agarosectin sulfatase DNA fragment를 pHCE-IA vector에 subcloning 하였다. 구축된 재조합 plasmid가 대장균에서 발현되는지를 확인하기 위해 plate 상에서 발현을 확인하였다. 이때 배지는 기본적인 대장균 배양용 배지인 LB agar배지에 ampicillin (30 μ g/ml)과 4-methylumbelliferyl sulfate (50 mM) 첨가하였다. 구성적 발현의 경우는 IPTG를 첨가하지 않은 배지를 사용하였다.

라. Chaperone과 공발현

pGro11 (5.9 kb)의 *groEL/ES* 발현 plasmid로써 selection marker로 tetracycline chloramphenicol (Cm)을 가지고 있으며, *groEL/ES* 발현 유도물질로 tetracycline을 사용하였다. pGro7 (5.9 kb)는 pGro11와 같으나 발현 유도물질로 arabinose를 사용하는 것이 다르다. pG-KJE6 (9.9 kb)는 *groEL/ES* 발현을 위해 tetracycline을 사용하며, 또 다른 chaperone인 *dna K/dnaJ/grpE*의 공발현 plasmid이다. *dnaK/dnaJ/grpE*의 발현을 위해 arabinose를 사용하였다.

이들 구축된 chaperone plasmid 는 pAST-A1 함께 *E. coli* BL21(DE3)에 co-transformation하여 선택배지 (LBACm)를 사용하여 형질전환된 균주를 선별하였다. Chaperone plasmid과 sulfatase 발현 plasmid와 co-transformation하였다. co-transformation된 대장균 세포는 ampicillin (30 μ g/ml) 과 chloramphenicol (14 μ g/ml, chaperone 발현 plasmid의 선별)이 첨가된 배지에서 선별하였다.

제 2 절 연구결과

1. Agaropectin sulfatase 생산균주의 분리 및 동정

가. *Sphingomonas* sp. AS6330의 동정

1) 효소생산균의 분리

Agaropectin sulfatase를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 여수, 부산, 통영 및 완도 인근 해역으로부터 해수를 채취하여 p-nitrophenylsulfate가 5 mM의 농도로 첨가된 Zobell's 2216e 배지에 시료를 도말한 후 30°C에서 2일간 배양 후 콜로니 주변에 황색환을 생산하는 3종의 균주를 분리하여 AS6330, AS6331 및 AS6332로 명명하였다. 그중에서도 AS6330 균주가 NPS의 분해능이 가장 높게 나타났으며 액체배양에 의해 한천중의 황산기 분해능을 측정하여 agaropectin sulfatase 활성을 확증하였다.

2) 형태학적인 특성

분리균의 Gram 염색결과 은 Gram-negative로 판명되었으며 형태는 간균으로 관찰되었다. 그리고 분리균은 운동성이 있었으며, oxidase와 catalase-양성을 나타내었다 (Table 1). 분리균은 ZoBell 2216E 한천배지와 tryptic soy 한천배지를 이용하여 30°C에서 3일간 배양한 결과 황색의 colony를 형성하였으며 배양기간이 증가함에 따라 진한황색으로 변하였다. Biolog GN plates를 이용한 탄수화물의 동화작용을 분석한 결과 L-arabinose, cellobiose, D-galactose, gentiobiose, D-glucose, L-rhamnose 등을 분리균이 이용하였다.

3) 분리균의 지방산분석

분리균의 지방산을 분석한 결과 14-18 개의 탄소원자를 지니는 지방산 15종이 분석되었으며 그중에서 octadecenoic acid (C18:1)가 중요한 지방산으로 판명되었다. 그리고 2-hydroxymyristic acid (C14:0 2OH)가 hydroxyl화된 주요지방산으로 판명되었다.

Table 1. Cellular fatty acid composition and phenotypic properties of isolated AS6330

Fatty acid	Composition (%)
C14:0	1.29
C15:0	0.26
C14:0 2OH	8.50
C16:1w5c	2.23
C16:1w7c/C15:0 iso 2OH	7.27
C16:0	7.74
C15:0 2OH	0.26
C17:1w6c	3.00
C16:1 iso 3OH	0.51
C16:0 2OH	0.42
C18:1w7c	62.5
C18:1w5c	2.74
C18:0	0.30
11 methyl 18:1w7c	2.68
C18:1 2OH	0.32
Phenotypic properties	
Morphology	Rods
Motility	+
Oxidase	+
Catalase	+
Color of colony	Deep yellow

4) DNA 증폭과 서열 결정

전세계적으로 축적되어 있는 미생물 동정 데이터베이스가 Ribosomal DNA 유전자의 ITS(Internal transcribed spacer) 및 Large ribosomal RNA의 D1-D2 부분에 대하여 이루어져 왔기 때문에, 이 두 부분을 기본 단위로 염기서열을 분석하는 16S rDNA 유전자 분석에 크게 의존하고 있다. 현재까지 알려진 세균의 종은 수만 종으로, 이들 중 상당수 종의 표준 균주에 대하여 16S rDNA 유전자의 염기서열이 분석되어 있으므로 동정하고자 하는 균주의 16S rDNA 유전자를 분석하면, 이 균주가 전체 세균중에서 어느 종에 가까운지를 알 수 있게 된다. 따라서 분리된 균주를 보다 정확하게 동정하기 위하여 16S rDNA의 염기서열을 분석하기 위하여 *E. coli*의 16S rDNA의 보존적인 구간을 primer로 사용하여 생성된 PCR 산물을 DNA sequencer로 1차 구조를 분석하였다. 분리된 균주를 동정하기 위하여 사용된 primer는 Table 2에 나타난 바와 같다. Table에 나타난 primer를 사용하여 분석된 16S rDNA의 서열은 Fig. 1에 나타내었다.

5) 계통분석

분석된 16S rDNA의 1429 bp (Fig. 1)를 Genebank의 BLAST search를 통하여 분석한 결과 24종의 *Sphingomonas* spp.의 16S rDNA 서열과 높은 상동성을 나타내었다. 16S rDNA를 분석한 결과 분리균은 *Sphingomonas* species로 판명되었으며 24종의 *Sphingomonas* species와 outgroup 미생물로서 *Erythrobacter longus* 균주를 이용한 계통학적인 분석을 하였다. 분석결과 분리균은 *Sphingomonas*에 속하였으며 (Fig. 2), 가장 근접도가 높은 *Sphingomonas xenophaga* DSM6383균주와의 상동성은 96.35%로 나타났다 (Table 3). 현재 국제적인 합의에 의해 1차 구조를 이용한 정확한 염기서열을 분석후에 유사도가 97% 이내이면 다른 종으로 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서 분리된 *Sphingomonas* sp. AS6330은 새로운 종으로 판단되었으며, *Sphingomonas* sp. AS6330으로 명명하여 생명공학원에 균주를 기탁하였으며, 유전자는 GenBank에 등록하였다 (accession No. AY206698).

세균의 16S rDNA 서열에 의한 균의 동정은 최근 분자생물학의 발달에 따라 보편화된 방법이다 (Woes, 1987). 16S rDNA 유전자의 상동성이 97% 이하인 경우 DNA reassociation 값은 60% 이하이며 (Stackebrandt와 Goebel, 1994), 서로 다른 종으로 인정되고 있다 (Wayne 등, 1987). 분리균의 지방산 조성은

Table 2. List of primers for amplification and sequencing of 16S rDNA region of *Sphingomonas* sp. AS6330

Primer	Type	Sequence(5'-3')	Tm	Ori.
prok1 8-27	PCR & Sequencing	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	60.4	Forward
prok3 330-348	Sequencing	CGGYCCAGACTCCTACGGG	63.4	Forward
prok4 515-535	Sequencing	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	71.5	Reverse
prok5 803-785	Sequencing	CTACCAGGGTATCTAATCC	52.4	Reverse
prok6 927-942	Sequencing	GGGCCCGCACAAAGCGG	72.1	Reverse
prok7 1107-1088	Sequencing	GCTCGTTGCGGGACTTAACC	68.9	Forward
prok8 1477-1492	PCR & Sequencing	GGTTACCTTGTTACGACTT	53	Reverse

CGAACGCTGGCGGCATGCCTAACATGCAAGTCGAACGATCCCTTCGGG
GATAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCCGG
ATAACGTCGGGAAACTGACGCTAATACCGGATGATGACGTAAGTCCAAA
GATTTATCGCCCAGGGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT
AAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATATTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGA
TGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCAGAGATGATAATGACAGT
ATCTGGGGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGC
GGCGATTTAAGTCAGAGGTGAAAGCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCT
TTGAGACTGGATTGCTTGAATCCGGGAGAGGTGAGTGAATTCCGAGTGT
AGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
CACTGGACCGGCATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGATAACYAGCTGCCGG
GGCACATGGTGTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGG
GGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCTGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA
ACGTTTGACATCCTCATCGCGATTTCCAGAGATGGATTTCTTCAGTTCGG
CTGGATGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGA
TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGC
ATTTGGTTGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGT
GGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGTTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCGACCTCGCGAGGGGGAGCTAATCT
CCAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAG
GCGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
AGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGATTCACTCGAA
GGCGTTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGGCGACCACAGTGGGTTTAGCGAC
TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA

Fig. 1. Full sequence of 16S rDNA of *Sphingomonas* sp. AS6330.

Sphingomonas paucimobilis (Yabuuchi 등, 1999)와 유사하였으나, 본 연구에 사용된 미생물 동정시스템에 있는 database와는 일치하지 않았다. 따라서 분리균을 보다 정확하게 동정하기 위하여 16S rDNA 서열을 분석한 결과 *S. xenophaga*와 가장 높은 상동성 (96.35%)을 나타내었다. 24종의 *Sphingomonas* 종과 분리균의 16S rDNA 서열을 비교, 분석한 결과 97% 이하의 상동성을 나타내었기 때문에 본 연구에서 발견한 분리균은 *Sphingomonas*속의 신균으로 판단되었다.

나. Agarpectin sulfatase 생산 배양조건

1) 최적 pH

초기의 pH를 4.0 - 9.0으로 조절한 기초배지에 분리균주를 접종한 후 30°C에서 150 rpm으로 교반하면서 72 시간 동안 배양한 결과 세포성장은 중성영역에서 높게 나타났으며, 효소생산은 pH 7.0에서 가장 높게 나타났다 (Fig. 3). 효소생산은 pH 7.0까지 pH 증가에 따라 증가하였으며, 알칼리 영역에서 낮게 나타났다. 그리고 세균의 증식은 알칼리영역에서 영향을 받지 않았으나, 효소생산은 알칼리 영역에서 급격히 낮아졌다.

2) 최적 온도

분리균의 배지를 pH 7.0으로 조절한 후 20, 25, 30, 35 및 40°C에서 3일간 배양한 후 균증식과 효소생산능을 측정하였다, 그 결과 균증식과 효소생산은 배양 온도 30°C까지는 비례적으로 증가하였으나 35°C이상에서는 균증식은 다소 저하되었으나, 효소활성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

3) 최적 염농도

현재까지 분리된 수많은 해양세균들은 *Proteobacteria* α -subclass에 속하며, 이들균의 분포는 염도의 감소에 따라 감소하며, 염도가 낮거나 담수에는 분포하지 않는 것으로 보고되고 있으며, 분리된 *Proteobacteria* α -subclass들은 성장에 염을 필수적으로 요구하는 것으로 알려져 있다 (Gonzalez와 Moran, 1997). 따라서 분리균의 NaCl 의존성을 측정한 결과 NaCl 0.5% 이하에서는 증식이 일어나지 않았

Table 3. Result of similarity analysis using BLAST

Strain	%Similarity	nucleotide compared
<i>Sphingomonas xenophaga</i> DSM 6383T	96.35	1426
<i>Sphingomonas chlorophenolica</i> ATCC 33790T	96.15	1428
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> GIFU 9882T	95.94	1428
<i>Sphingomonas herbicidovorans</i> DSM 11019T	94.68	1429
<i>Sphingomonas suberifaciens</i> IFO 15211T	94.54	1393
<i>Sphingomonas parapaucimobilis</i> IFO 15100T	94.32	1373
<i>Sphingomonas sanguinis</i> IFO 13937T	94.14	1382
<i>Sphingomonas rosa</i> IFO 15208T	94.03	1357
<i>Sphingomonas asaccharolytica</i> IFO 10564T	93.97	1426
<i>Sphingomonas adhaesiva</i> GIFU 11458T	93.95	1421
<i>Sphingomonas mali</i> IFO 10550T	93.68	1423
<i>Sphingomonas pruni</i> IFO 15498T	93.61	1423
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> GIFU 2395T	93.40	1424
<i>Sphingomonas subarctica</i> DSM 10700T	93.34	1426
<i>Sphingomonas ursincola</i> DSM 9006T	93.14	1429
<i>Sphingomonas trueperi</i> LMG 2142T	92.92	1426
<i>Sphingomonas capsulata</i> GIFU 11526T	92.91	1424
<i>Sphingomonas natatoria</i> DSM 3183T	92.89	1407
<i>Sphingomonas aromaticivorans</i> DSM 12444T	92.86	1386
<i>Sphingomonas subterranea</i> DSM 12447T	92.67	1392
<i>Sphingomonas macrogoltabidus</i> IFO 15033T	92.51	1388
<i>Sphingomonas stygia</i> DSM 12445T	92.44	1297
<i>Sphingomonas terrae</i> IFO 15098T	92.43	1374
<i>Sphingomonas echinoides</i> DSM 1805T	92.18	1420

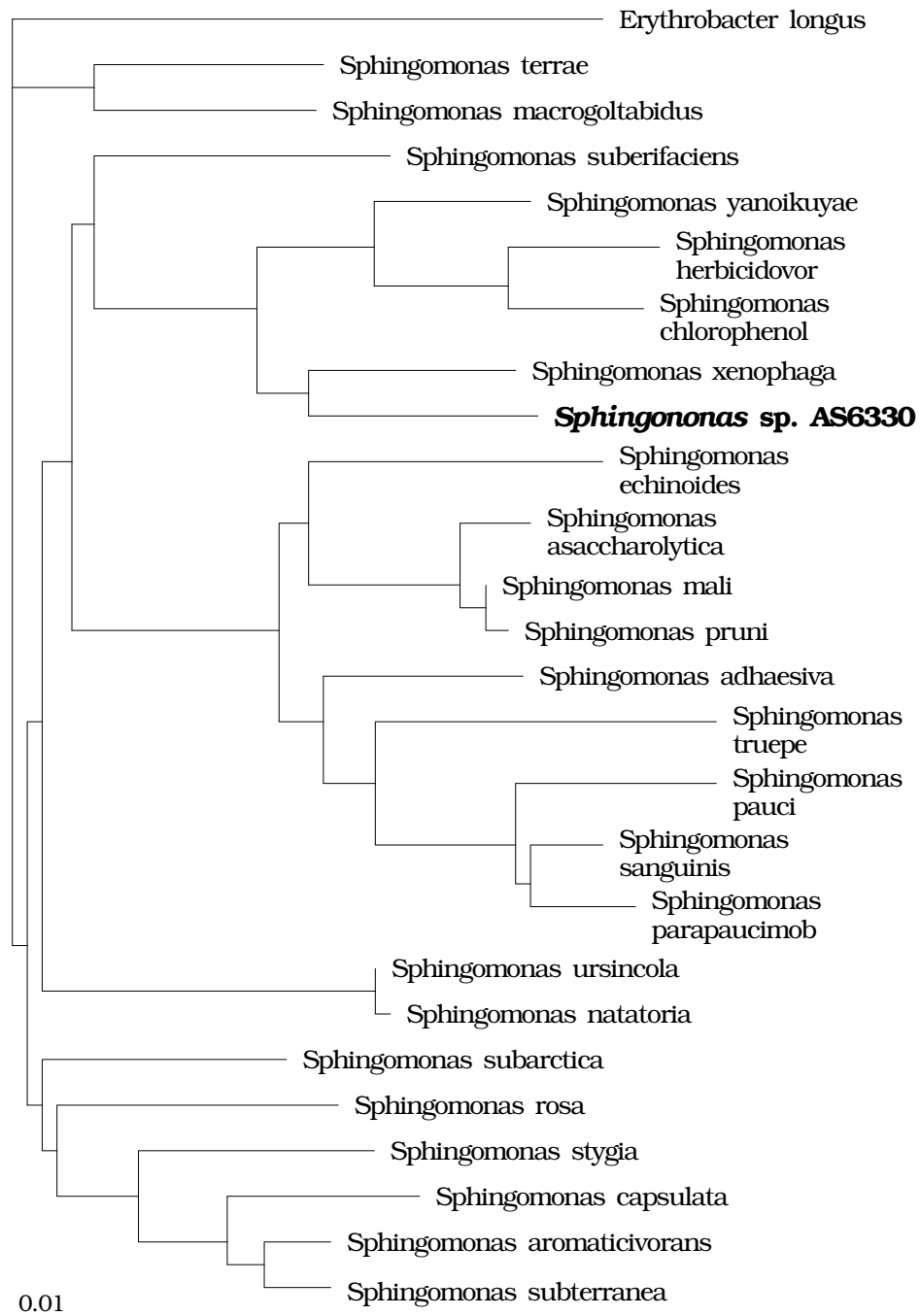


Fig. 2. Phylogenetic neighbor-joining tree obtained from the 16S rDNA sequence analysis.

으며 효소활성 또한 전혀 없었다. 증식을 위한 분리균의 최적 NaCl 농도는 1.5- 3.5%로 나타났으며, 효소생산을 위한 최적 NaCl 농도는 2.0- 3.5%로 나타났다 (Fig. 5). 해양으로부터 분리된 호염성세균은 성장을 위한 염요구도에 따라 간편하게 분리된다. 저호염세균은 2-3%의 NaCl 농도대에서, 중호염세균은 5-20%의 NaCl 농도대에서, 고호염세균은 NaCl 포화농도대에서 정상적인 성장이 된다. 본 연구에서 분리된 균은 저호염세균으로 증식과 효소생산을 위하여 1.5-3.0%의 NaCl 을 요구하는 것으로 판단되었다.

4) 최적 발효시간

이상과 같은 발효조건에서 발효시간에 따른 균체증식과 효소생산을 측정하기 위하여 50 ml로 전배양된 균체를 10 L의 발효조에 접종하여 pH 7.0, 30°C에서 4 일간 배양하면서 균체 증식과 효소생산을 측정하였다. Fig. 6에 나타난바와 같이 균체증식과 효소생산은 발효 48시간대에 최대로 나타났으며, 발효시간을 연장하더라도 효소활성의 저하는 나타나지 않았다.

수많은 해양미생물들은 지구환경의 생화학적인 면에서 주요한 역할을 담당하며, 특히 이러한 미생물로부터 유래되는 효소들은 환경정화나 생물공학에서 많은 이용가능성이 제기되고 있다 (Gonzalez와 Moran, 1997). 해양으로부터 분리된 *Proteobacteria*의 α -subclass는 lignin 분해능 (Gonzalez 등, 1997), 호기적 황산화 (Sorokin, 1995), 유기황 분해 (Ledyard 등, 1993), polyaromatic hydrocarbon 분해 (Chung과 King, 2001) 등의 다양한 대사기능이 있는 것으로 밝혀졌다. 그리고 일련의 *Proteobacteria* α -subclass들은 해양에서 해조류의 주요성분인 황의 순환에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Gonzalez and Moran, 1997). 본 연구에서 분리된 균은 해양에서 한천과 같은 황산다당류의 분해에 주요한 역할을 할 것으로 예상된다.

해양미생물들은 다양한 효소활성을 지니기 때문에 여러가지 생화학적인 반응에 촉매역할을 할 수 있으며, 미생물효소에 의한 함황물질의 분해는 Kertesz (1999)에 의해 체계적으로 보고되고 있다. 해양미생물에 의한 황산다당류의 이용은 먼저 황산다당류는 다당류분해효소에 의해 황산 disaccharide로 분해되고, 탈황반응과 disaccharide의 분해 후에 단당류형태로 최종적으로 분해되어 미생물의 영양원으로 이용되고 있다. 이와는 달리 mucin에 존재하는 미생물 carbohydrate hydase

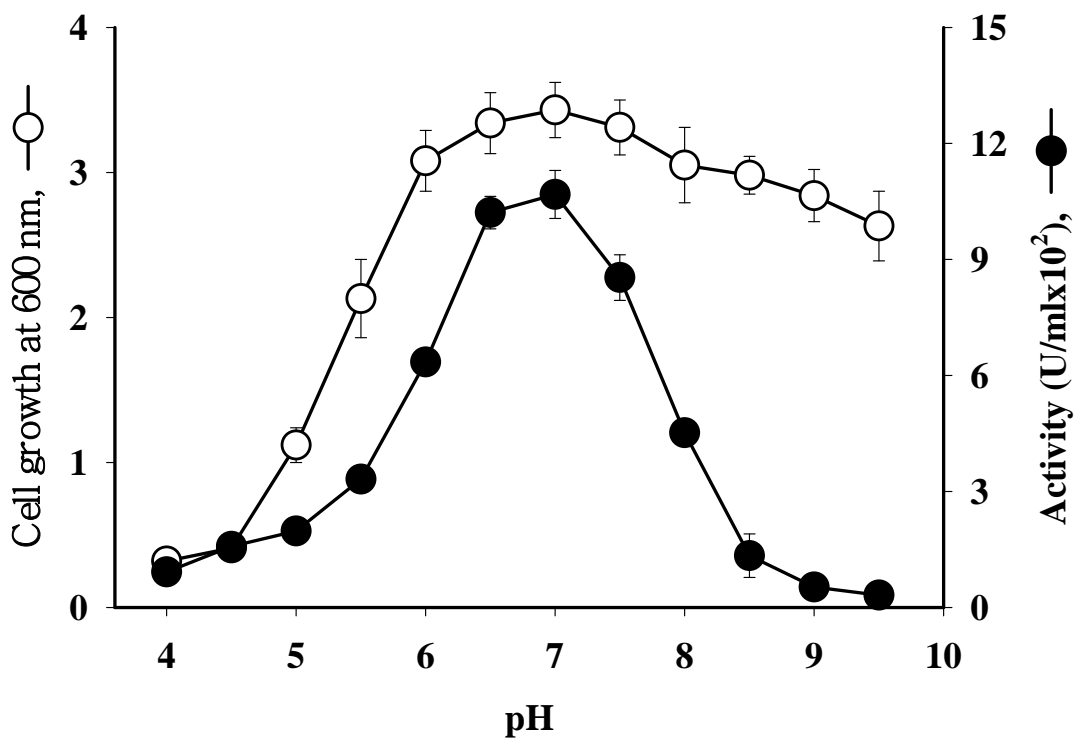


Fig. 3. Effect of initial medium pH on the growth of AS6330 and sulfatase activity. Basal media adjusted to 4.0-9.5 were sterilized and incubated at 30°C with 150 rpm shaking after inoculation of glycerol stock. Cell growth and enzyme activity were determined after incubation for 3 days.

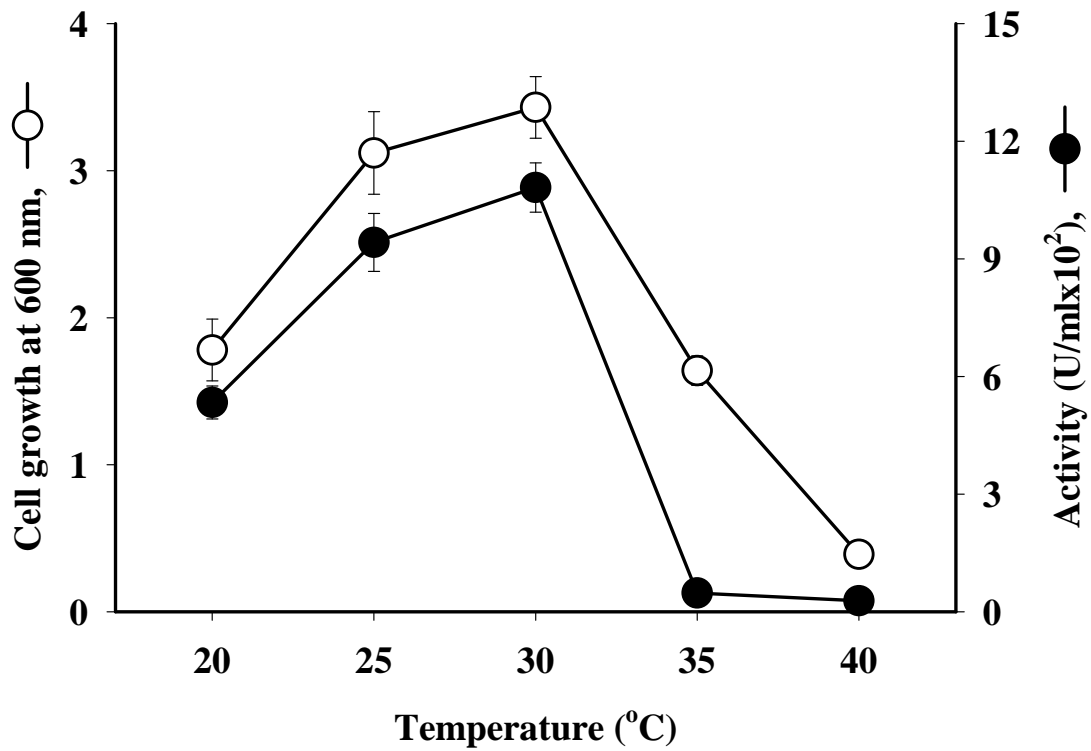


Fig. 4. Effect of incubation temperature on the growth of AS6330 and sulfatase activity. Basal media adjusted to pH 7.0 were sterilized and incubated at indicated temperature with 150 rpm shaking after inoculation of glycerol stock. Cell growth and enzyme activity were determined after incubation for 3 days.

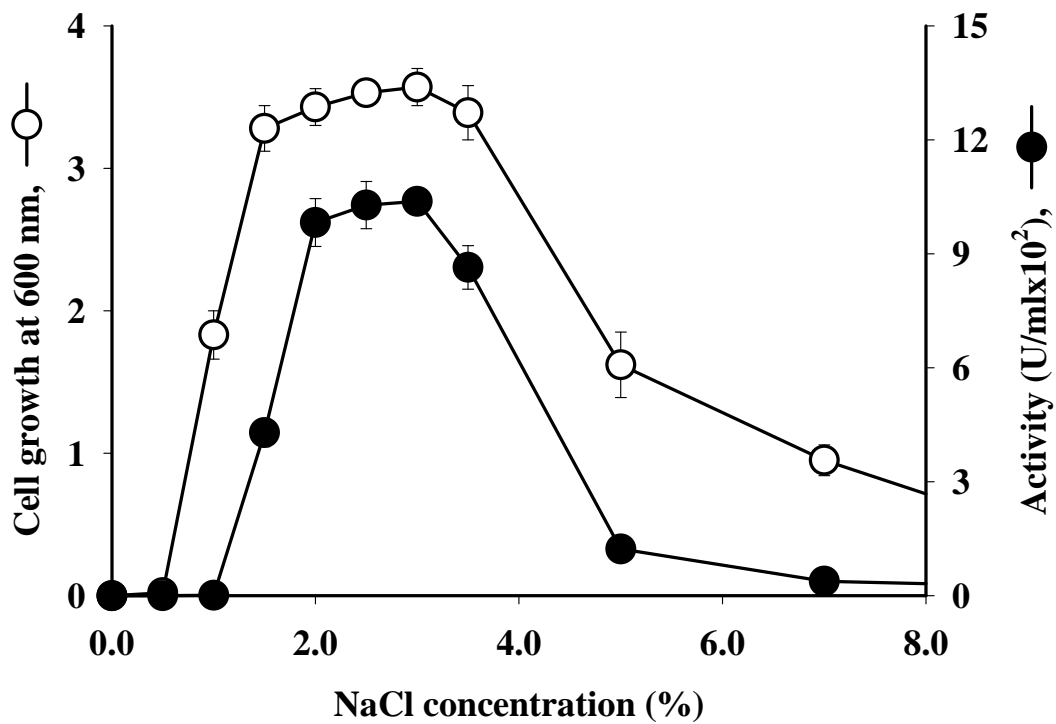


Fig. 5. Effect of NaCl concentration on the growth of AS6330 and sulfatase activity. Basal media (pH 7.0) containing different concentration of NaCl were sterilized and incubated at 30°C with 150 rpm shaking after inoculation of glycerol stock. Cell growth and enzyme activity were determined after incubation for 3 days.

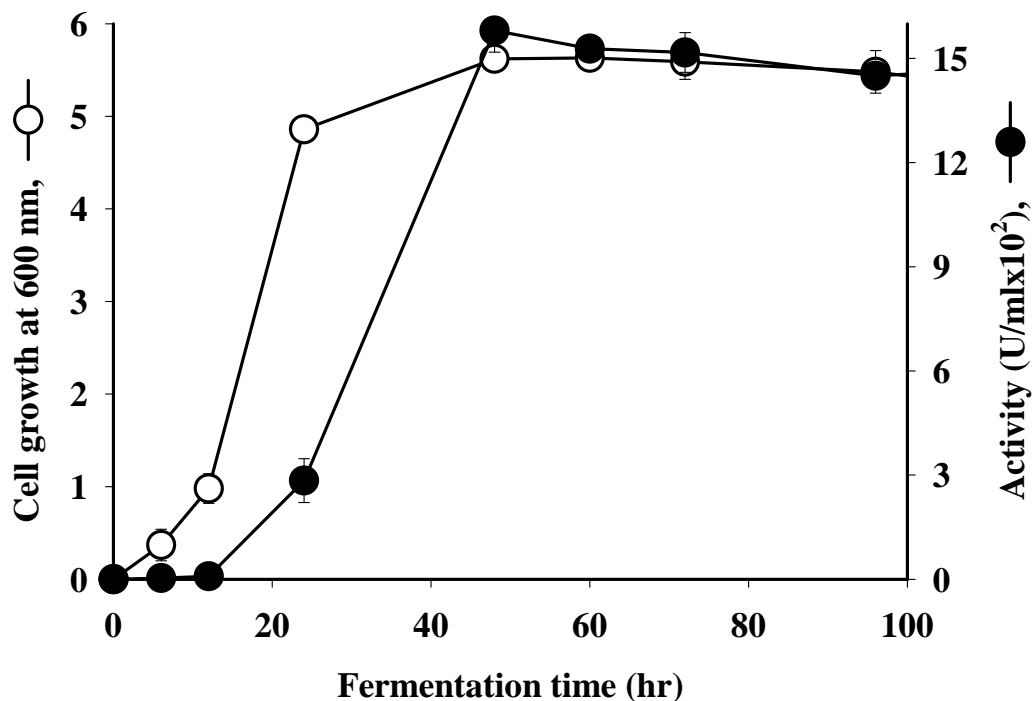


Fig. 6. Effect of fermentation time on the growth of AS6330 and sulfatase activity. Basal medium (pH 7.0) containing 2.5% NaCl was sterilized and inoculated with overnight culture of AS6330. Fermentation was performed at 30°C with 250 rpm and 1.0 v.v.m aeration. Cell growth and enzyme activity were determined at indicated times.

mucin에 작용하여 mucin의 분해없이 carbohydrate hydase에 의 황산만이 제거된다 (Robertson와 Wright, 1997). 또한 *Alteromonas carrageenovora*로부터 분리된 carbohydrate sulfatase는 갈조류의 황산다당류 분해에 주요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Barbeyron 등, 1995). 대부분의 세균성 carbohydrate sulfatase들은 탄소원으로써 다당류의 분해에 주로 관여한다. 그러나 본연구에서 분리된 균주는 한천의 glycoside 결합의 분해없이 황산기만 특이적으로 제거하는 것으로 나타났다.

2. Agaropectin sulfatase의 정제와 특성 분석

가. 효소의 정제

Agaropectin sulfatase 생산을 위한 *Sphingomonas* sp. AS6330의 최적발효조건을 이미 확립하였으며, 확립된 효소생산 조건하에서 50 L 발효조를 이용하여 48시간 배양한 결과 *Sphingomonas* sp. AS6330 균체 400 g을 얻었다. 균체에 5배량의 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)을 가하여 초음파 파쇄기로 세포막을 파쇄한 후 원심분리한 결과 1.800 ml의 조효소액을 얻었다. 조효소액에 2 g의 streptomycin을 가하여 DNA를 제거한 후 Q-Sepharose 칼럼 (3x10 cm)에 단백질을 흡착시켰다. 비흡착된 단백질을 loading 완충액으로 씻은 후 0.1-0.5 M NaCl 용액으로 직선농도 구배에 의하여 수지에 흡착된 단백질을 분리한 결과, 0.3-0.4 M NaCl 농도대에서 agaropectin sulfatase 활성이 있는 획분이 분리되었다 (Fig. 7). 분리된 sulfatase 활성이 있는 획분을 모아 2.0 M 황산암모늄 용액을 동량 가하여 최종농도를 1.0 M로 조정하였다.

황산암모늄 용액으로 조정된 효소용액을 phenyl-Sepharose 칼럼 (1.5 x 15 cm)에 흡착시킨 후 1.0-0 M의 황산암모늄이 함유된 완충 용액으로 효소를 분획하였다. 그 결과 agaropectin sulfatase는 황산암모늄의 농도가 거의 0에 가까운 획분에서 분리되었다 (Fig. 8). 분리된 agaropectin sulfatase를 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 용액으로 4배로 희석시킨 후 FPLC에 부착된 Resource-S 칼럼을 통과시켜 고분자량의 비효소 활성부분을 제거시켰다. Resource-S 칼럼을 통과한 효소용액을 FPLC에 부착된 Mono-Q 칼럼에 흡착시킨 후 직선 농도구배법에 의하여 효소의 정제도를 향상시켰다. Mono-Q 칼럼 크로마토그래피에 의하여 agaropectin sulfatase

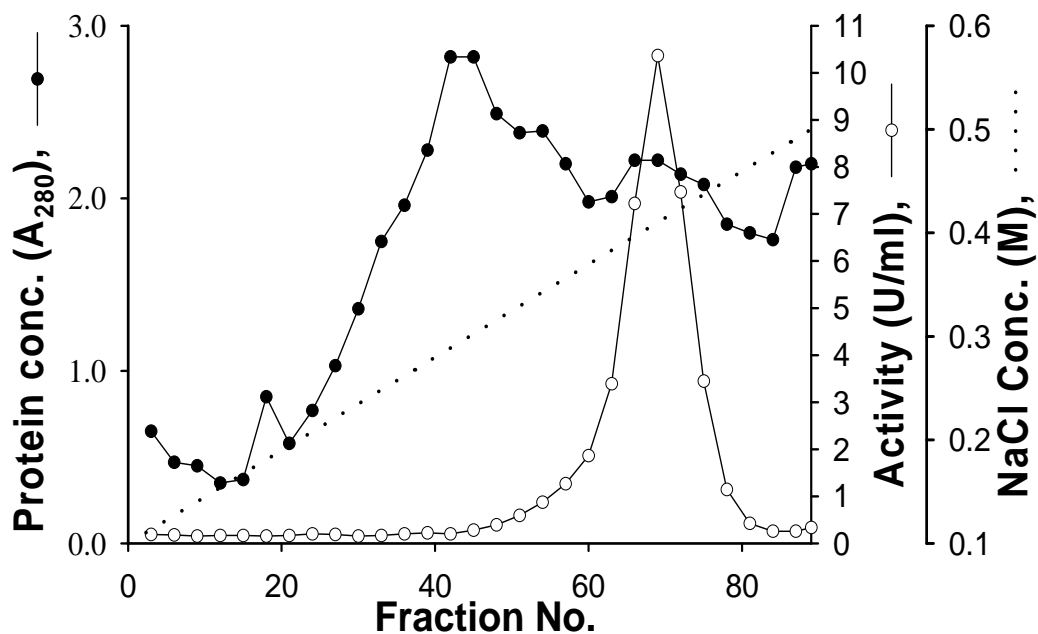


Fig. 7. Q-sepharose chromatogram of the crude extract from *Spingomonas* AS6330. Flow rate was 120 ml/hr and the fraction volume was 5 ml/tube. The agarpectin sulfatase was eluted with a linear gradient of 0.1 – 0.5 M NaCl in 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.0). The A₂₈₀ was measured after 150 ul of each fraction was diluted 10 times with the eluent.

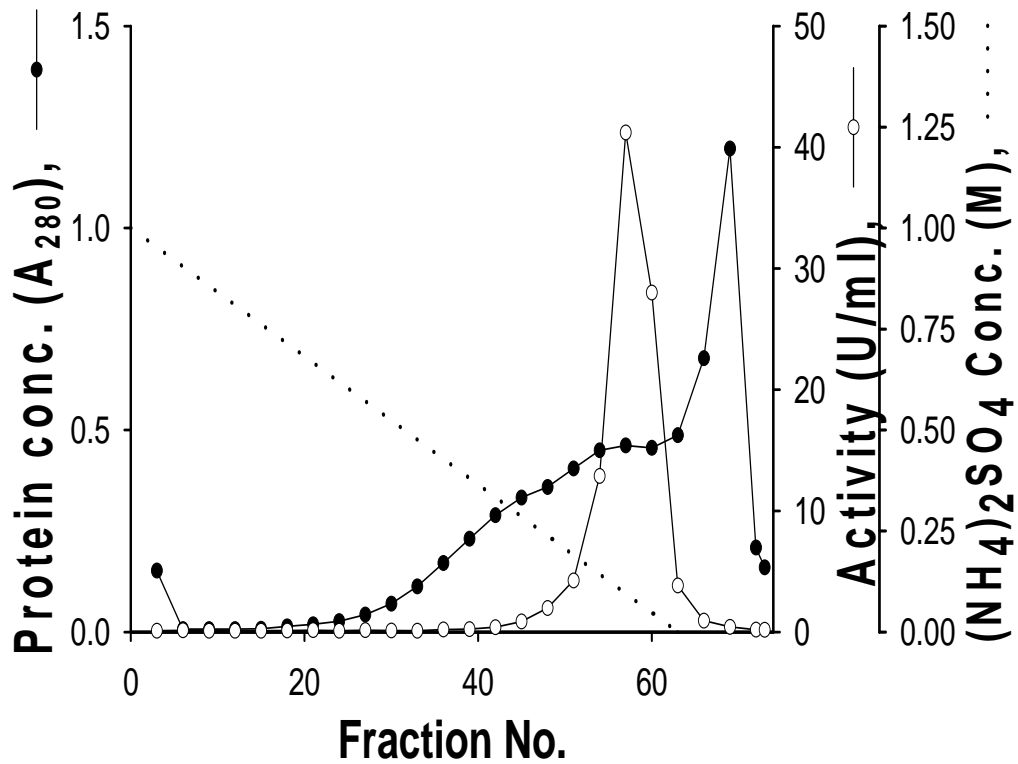


Fig. 8. Phenyl-Sepharose chromatogram of sulfatase fraction from Q-sepharose chromatography. The flow rate was 60 ml/hr and the volume of each fraction was 5ml/tube. The agarpectin sulfatase was eluted with a gradient of 1.0 - 0 M (NH₄)₂SO₄ in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.0. The A₂₈₀ was measured after 150 ul of each fraction was diluted 10 times with the same buffer.

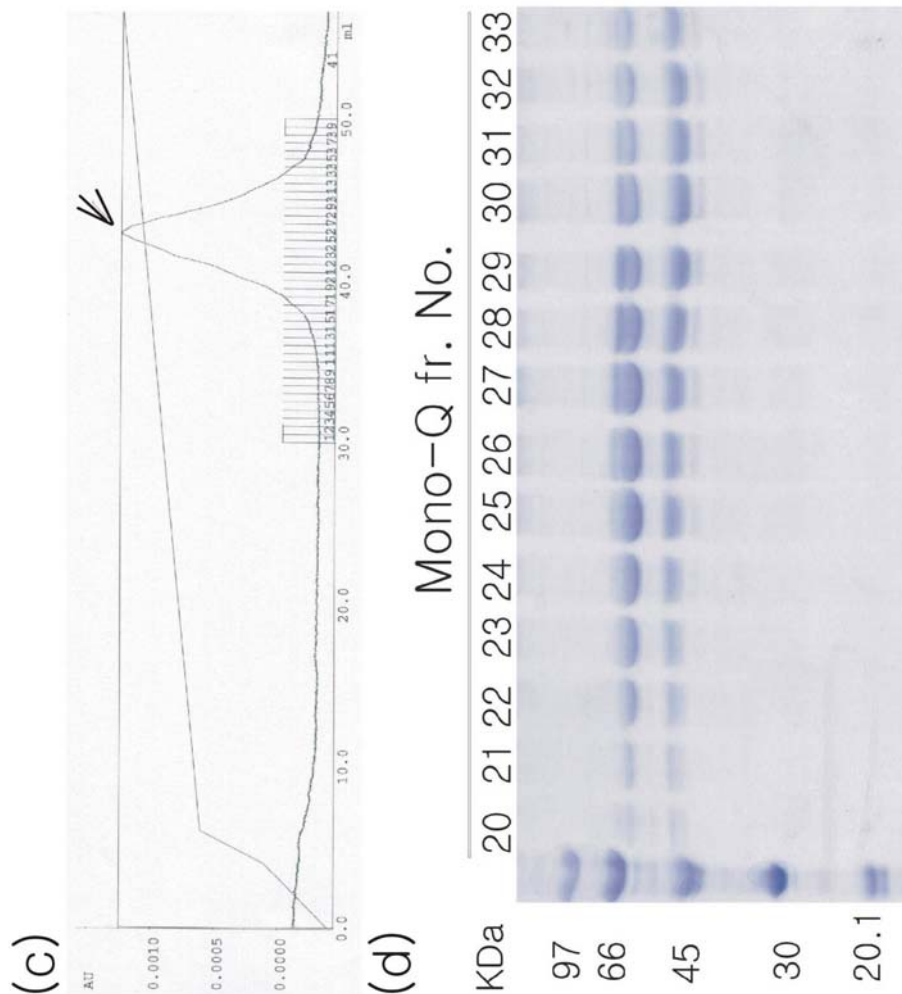


Fig. 9. Mono-Q chromatograms of sulfatase fraction from phenyl-Sepharose chromatograph.

Flow rate was 0.5 ml/min and the fraction volume was 0.5 ml/tube. When the AU at y axis is 1, the protein concentration equals 0.6 mg/ml. ml at x axis is the volume of eluants. The arrows indicate the peak where the fraction with the most strong activity appeared. In every case, the fractions with agarosectin sulfatase activity were found at 0.3 to 0.4 M NaCl concentration.

(a) Proteins was eluted with a fast gradient. (b) The active fractions from figure 4-a was diluted 5 times with 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) and loaded onto the column again. Proteins were eluted with a slow gradient so that the peaks could be identified more clearly. (c) The active fractions from figure 4-b were diluted 5 times with 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.0) and loaded onto the column again. Proteins were eluted with a slow gradient. The peak finally appeared as one. (d) 100 ul of samples were taken from the active mono-Q fractions of figure 4-c, concentrated by TCA precipitations and then loaded onto 15 % SDS-PAGE. Although mono-Q chromatogram showed a single peak, samples appeared as four bands.

는 염농도 0.3-0.4 M 부근에서 용출되었다. FPLC를 이용한 Mono-Q column으로부터 분리한 효소용액을 한번더 반복하여 효소의 정제도를 높였다. Fig 9에 나타난바와 같이 분리된 효소는 대부분의 혼재된 단백질이 제거되었으며 2종의 단백질이 전기영동상으로 존재하는 것을 알 수 있었다. 이러한 2차 Mono-Q 크로마토그래피에 의하여 66 kDa 이상되는 단백질은 효과적으로 제거되었으며, 45 kDa와 63 kDa의 단백질 밴드만이 남았다. 따라서 정제도를 높이기 위하여 효소획분을 겔여과한 결과 단일 단백질 피크를 얻을 수 있었다 (Fig. 10). 겔여과로 얻은 효소획분을 전기영동한 결과 단일밴드의 단백질을 얻었으며 (Fig. 11), 이 획분을 -80°C에 저장하면서 특성실험을 행하였다.

이상과 같은 일련의 정제과정에 의하여 최종적으로 얻은 agarpectin sulfatase의 정제도는 12,800배로 증가하였으며 수율은 19.1%로 나타났다. 각각의 정제단계에 따른 단백질 농도, 활성, 비활성, 순도 및 수율은 Table 4에 나타난바와 같다. 정제된 효소의 비활성은 45°C pH 7.0에서 97.2 U로 나타났다.

Sphingomonas sp. AS6330 균주를 48시간동안 발효후에 agarpectin sulfatase 활성을 측정한 결과 균체내와 균체내에서 활성이 나타났다. 그러나 대부분의 효소활성은 균체내에서 나타났으므로 효소정제를 위한 시료는 발효후의 균체를 사용하였다. 이러한 효소의 존재는 *A. carrageenovora*의 agarpectin sulfatase는 periplasmic-space 또는 external-membrane에 존재한다는 보고와 일치하고 있었다 (Barbeyron 등, 1995). 정제효소의 분자량은 겔여과에 의해 41 kDa로 나타났으며, SDS-PAGE에 의해 계산된 분자량보다 훨씬 낮게 나타났다. 측정방법에 따른 분자량의 차이는 단백질 분자의 소수성 특성때문인 것으로 판단된다. phenyl-Sepharose column chromatography한 결과 효소단백질은 ammonium sulfate의 농도가 거의 없을 때 용출된 현상과 일치하고 있음을 알 수 있었다.

나. 분자량 측정

Sphingomonas sp. AS6330로부터 정제된 agarpectin sulfatase를 SDS-PAGE로 전기영동한 결과 분자량은 64 kDa으로 확인되었으며 (Fig 12), GPC로 분석한 결과 분자량은 41 kDa로 규명되었다 (Fig. 13). 이러한 분자량의 차이는 phenyl-Sepharose 크로마토그래피에서 나타난바와 같이 효소분자가 지니고 있는

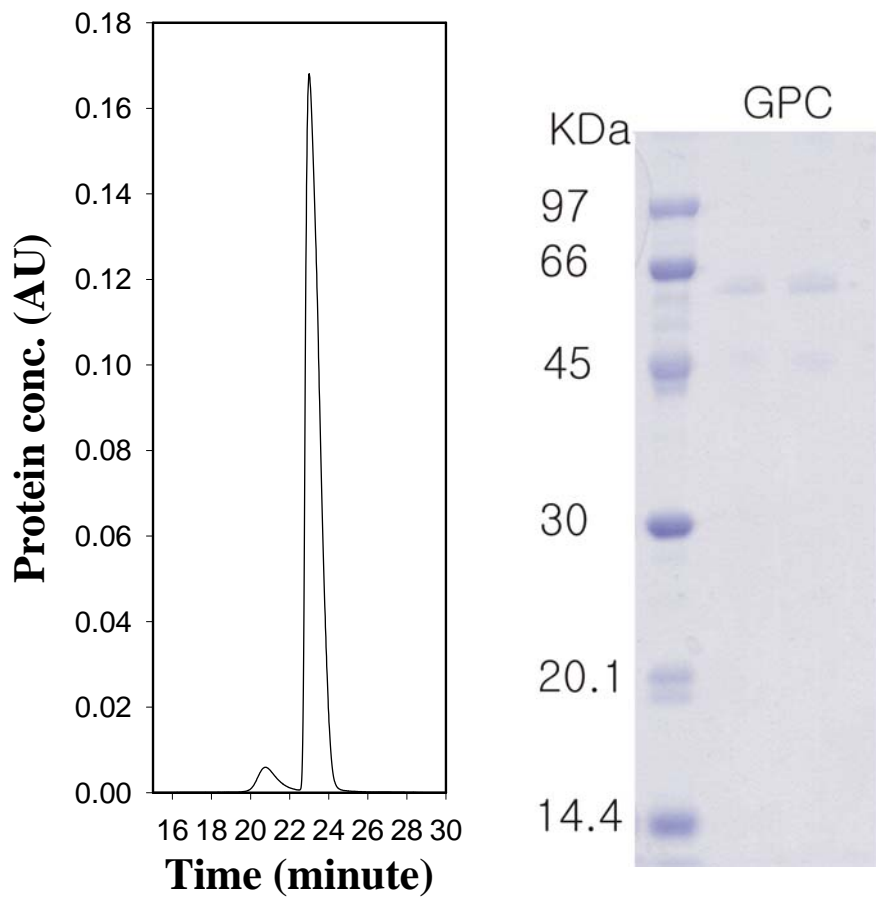
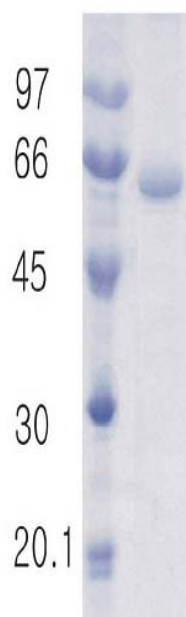


Fig. 10. GPC chromatogram of Mono-Q chromatography. 100 μ l of an active mono-Q fraction from figure 3-(c) were loaded onto GPC column. The small peak indicates agarosepectin sulfatase and it appeared at the position of 64 kDa in SDS-PAGE.



M 1

Fig. 11. SDS-PAGE of the purified agarpectin sulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330. Lane 1, agarpectin sulfatase after gel filtration; lane M, marker proteins.

Table 4. Purification of agaropectin sulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330

Fraction	Volume (ml)	Protein conc. (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Purity (%)	Yield
Cell homogenate	2,600	3.86	0.0294	0.00762	1.0	100
Q-Sepharose	158	1.86	0.416	0.224	29.4	86.0
Phenyl-Sep	60	0.27	0.655	2.430	319	52.1
1'st Mono-Q	10	0.18	3.09	17.2	2,260	40.4
2'nd Mono-Q	3	0.16	8.14	50.9	6,680	31.9
GPC	3	0.05	4.86	97.2	12,800	19.1

Enzyme activities were determined with 5 mM NPS at 45 °C and at pH 7.0.

Phenyl-Sepharose fraction was divided into 5 aliquots and run 5 times giving the 1'st Mono-Q chromatographies. A 2'nd Mono-Q fraction was divided into 6 aliquots and run 6 times for the 2'nd Mono-Q chromatographies.

소수성 때문인 것으로 추정된다. 특히 GPC용으로 Superose gel을 사용하여 분자량을 측정할 경우 칼럼내에서 단백질분자의 이동이 지체되기 때문에 실제적인 분자량보다 낮게 나타난다고 보고되고 있다 (Edwards 등, 1993; Beil 등, 1995). 본 연구에서 사용된 GPC용 칼럼 (Shodex OHpak KB-865, 일본)도 Superose와 유사한 현상이 일어났다.

높은 소수성을 지닌 단백질인 경우 겔여과시 겔 수지와 결합함으로써 효소의 용출이 실제 보다 늦어져서 실제의 분자량 보다 낮은 값으로 계산된다는 보고와 일치하고 있었다 (Edwards and Dubin 1993). 즉, *P. aeruginosa*로부터 정제된 agaropectin sulfatase의 경우 SDS-PAGE에 의해 분자량은 57 kDa로 계산되었으나, 겔여과에 의해 분자량은 39 kDa로 보고되고 있다 (Beil et al. 1995). 본 연구에 있어서의 agaropectin sulfatase의 분자량 측정시 겔여과법은 많은 오차를 제시하고 있음을 알 수 있었으나, 현재까지의 결과에 의하면 분리된 효소는 다른 세균성 agaropectin sulfatase (Beil et al. 1995; Ueki et al. 1995a; 1995b) 와 마찬가지로 monomer로써 활성형을 가짐을 알 수 있었다. 본 연구에서 사용된 GPC용 칼럼 (Shodex OHpak KB-865, 일본)도 Superose와 유사한 현상이 일어난 것으로 예상된다. *Sphingomonas* sp. AS6330으로부터 분리된 agaropectin sulfatase의 분자량은 *Pseudomonas aeruginosa*로부터 분리된 60 kDa의 agaropectin sulfatase (Beil 등, 1995) 및 *Klebsiella pneumoniae*로부터 분리된 62 kDa의 분자량과 유사한 것으로 판단된다 (Miech 등, 1997). 그러나 *Streptomyces griseorubiginosus*로부터 분리된 arylsulfatase의 분자량은 보다 낮은 45 kDa로 보고되고 있다 (Ueki 등, 1995).

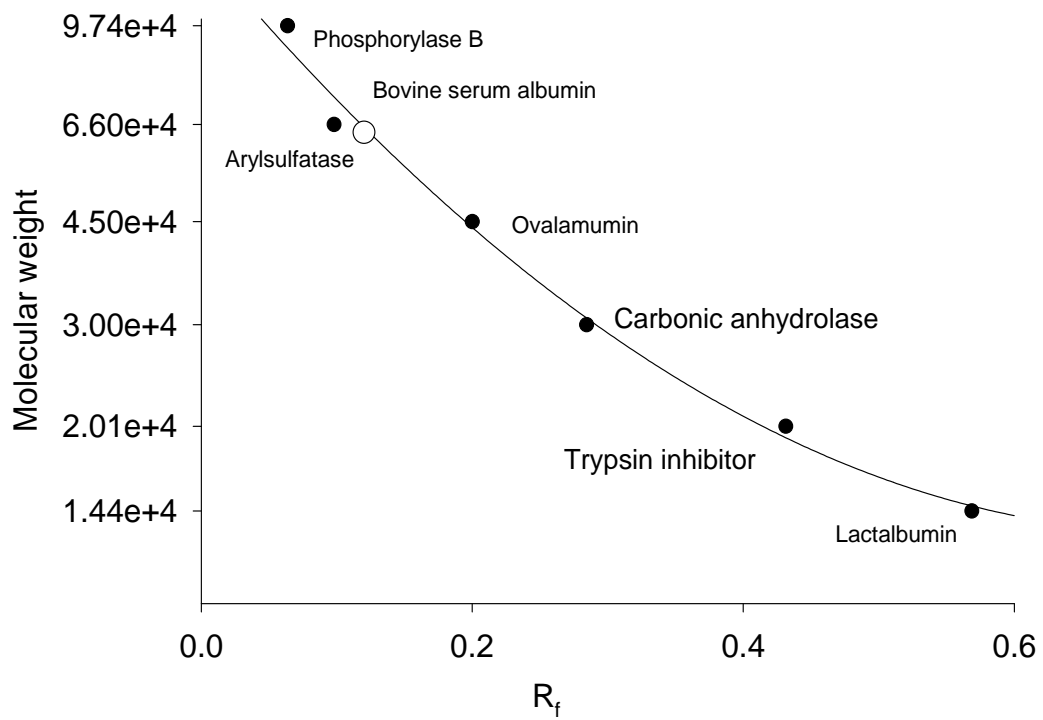


Fig. 12. Determination of molecular weight of purified arylsulfatase from *Sphingomonas AS6330* by SDS-PAGE.

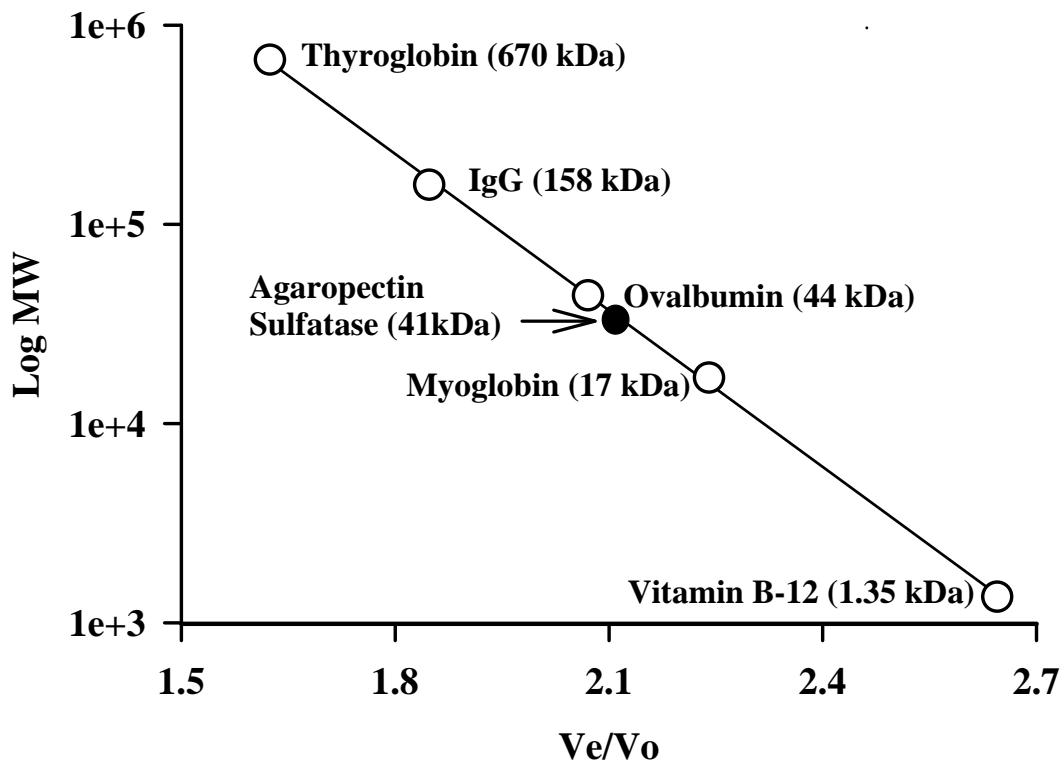


Fig. 13. Determination of molecular weight of the purified agaropectin sulfatase by GPC. GPC was performed with OHpak KB-865 gel permeation chromatography column attached to an HPLC system (HP1050, CA).

다. 효소의 반응최적조건

1) Agaropectin sulfatase의 pH 의존성

Sphingomonas sp. AS6330으로부터 정제된 agaropectin sulfatase의 pH 의존성은 Fig. 14에 나타난바와 같다. 그림에 나타났듯이 한천을 기질로 사용하여 효소활성을 측정된 결과 활성은 pH 6.0에서 8.5까지 넓은 범위에서 나타났으며, 최대활성은 pH 7.0에서 나타났다. pH 5.0 이하의 산성영역에서는 활성은 아주 낮게 나타났으며, 이는 정제효소가 산성영역에서의 비가역적인 변성에 의한 것으로 추정된다. 그리고 정제효소는 pH 9.0에서 원래 활성의 70% 가량을 소실하였다. 한천중의 황산기 분해에 비해 NPS를 사용한 경우의 pH 의존성은 보다 예민하게 나타났다. 그림에 나타난바와 같이 최대활성은 pH-7.5 부근에서 나타났으며, 그이외의 pH 영역에서의 효소활성은 아주 낮게 나타났다.

현재까지 발표된 agaropectin sulfatase에 관한 최적반응 pH는 2가지로 보고되고 있다 (Kertesz 1999). 즉, *Salmonella typhimurium*와 *Klebsilla pneumoniae*로부터 분리된 agaropectin sulfatase와 같이 최적 pH가 6.5-7.1인 것과, *P. aeruginosa* (Beil et al. 1995), *Pseudomonas testosterone* (Tazuke et al. 1998) 및 *S. griseorubiginosus* S980-14 (Ueki et al. 1995a)로부터 분리된 agaropectin sulfatase와 같이 최적 pH가 8.3-9.0인 두 그룹으로 보고되고 있다. 본 연구에서 분리된 agaropectin sulfatase의 최적 pH는 7.0이므로 앞의 그룹과 유사한 최적 pH를 지닌 것으로 평가된다.

2) Agaropectin sulfatase의 온도 의존성

Sphingomonas sp. AS6330으로부터 정제된 agaropectin sulfatase의 온도 의존성은 Fig. 15에 나타난바와 같다. 20-45°C의 온도범위내에서 효소활성은 온도 상승에 따라 증가하였으며, 최대활성은 45°C로 나타났다. NPS를 기질로 사용하였을 때 20°C에서의 효소활성은 최대활성의 약 37% 가량 나타내었으며, 한천을 기질로 하였을 때는 최대활성의 약 60%ffm 나타내고 있었다. 이러한 결과는 본 미생물이 생산하는 효소는 해수온도에서 충분한 활성을 나타냄을 시사하고 있다. 그러나 55°C 이상의 온도에서 효소는 열변성에 의하여 실활함을 알 수 있었다. *Sphingomonas* sp. AS6330로부터 정제된 agaropectin sulfatase의 최적반응 온도는 45°C이며, 이는 *Pseudomonas aeruginosa*로부터

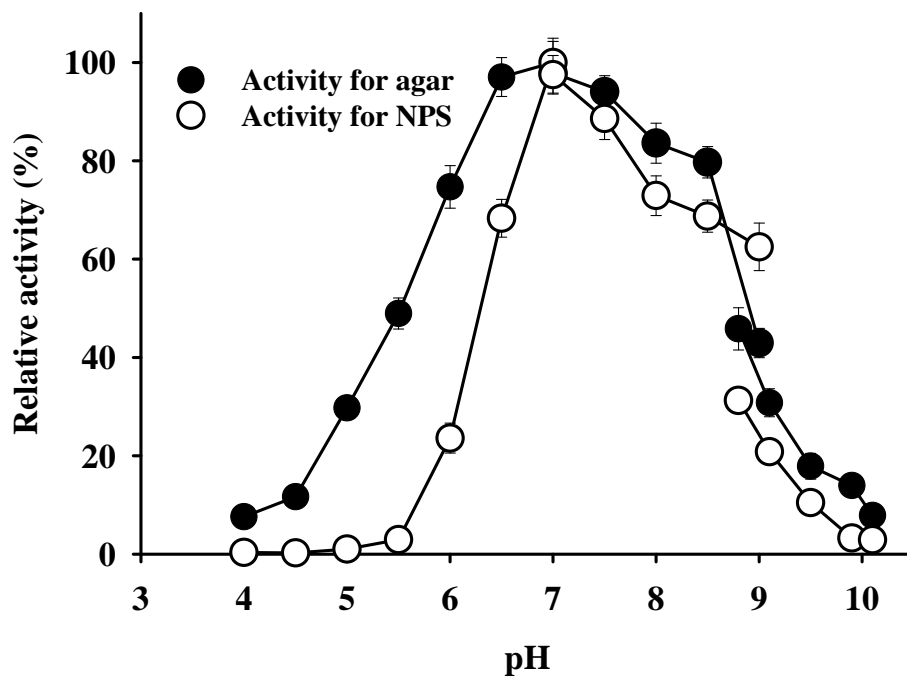


Fig. 14. Effect of pH on sulfatase activities against agar and NPS. Five percent agar and 5 mM NPS were used as substrates dissolved in the various buffer solutions. Reactions were performed at 45°C for 60 min incubation for agar and 30 min incubation for NPS at various pH values. The buffers used were; 0.1 M citrate - 0.2 M Na₂HPO₄ (pH 4.0 - 7.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0 - 9.0), and 0.1 M Na₂CO₃ - 0.1 M NaHCO₃ (pH 8.8 - 10.1).

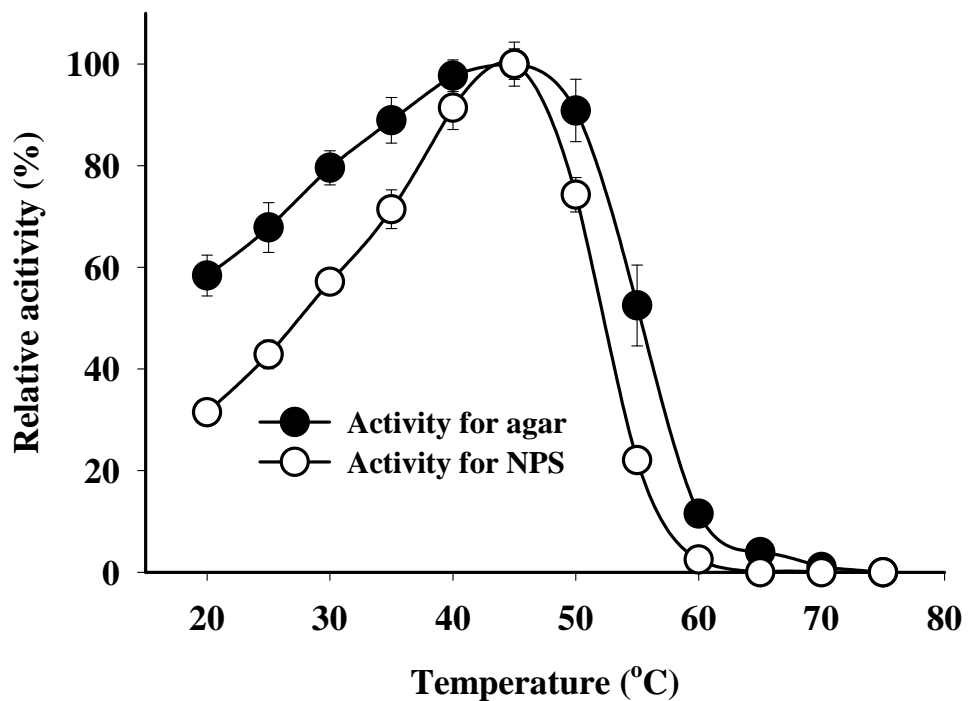


Fig. 15. Effect of temperature on sulfatase activities against agar and NPS. Substrate concentration and reaction time were the same as in Fig. 3. Reactions were performed at pH 7.0 at indicated temperature.

분리된 agaropectin sulfatase의 최적 온도인 57°C보다 다소 낮게 나타났으나 (Beil 등, 1995), 최적온도가 37°C인 *S. griseorubiginosus* S980-14 (Ueki et al. 1995a)와 *Streptomyces* sp. T-109-3 (Ueki et al. 1995b) 의 agaropectin sulfatase보다는 높게 나타났다. .

라. 동력학적 상수

반응온도 45°C와 pH 7.0에서 기질(p-nitrophenyl sulfate)농도를 달리하여 반응속도를 측정된 결과 NPS에 대한 정제효소의 Km과 Vmax는 각각 43 uM and 686000 sec⁻¹로 나타났다 (Fig. 16).

마. 저해제의 영향

Sphingomonas sp. AS6330으로부터 정제된 agaropectin sulfatase의 저해제에 의한 영향을 분석하였다. Table 5에 나타난바와 같이 효소활성은 PMSF, leupeptin, pepstatin, iodoacetate 및 EDTA에 의하여 저해되었다. Leupeptin과 iodoacetate에 의하여 효소활성은 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 0.1 mM의 PMSF에 의하여 agaropectin sulfatase 활성은 55% 가량 감소되었으며, 1 mM의 PMSF에 의하여 대부분의 활성이 실패되었다. 그리고 0.1 mM의 pepstatin에 의하여 agaropectin sulfatase 활성은 18% 가량 감소되었으나, 1 mM의 ppepstin에 의하여 77%의 활성이 감소되었다. 특히 0.1 mM의 EDTA에 의하여 agaropectin sulfatase 활성은 73% 가량 감소되었으나 1 mM의 EDTA에 의하여 80% 가량의 활성이 감소되었다. 이러한 결과는 agaropectin sulfatase의 활성부위에 serine이 관여하며, cofactor로써 2개의 금속이온을 필요로 함을 알 수 있다.

*Streptomyces griseorubiginosus*로부터 분리된 agaropectin sulfatase는 EDTA와 iodoacetate에 의해 각각 83과 100% 저해되었다는 보고는 본 연구결과와 다소 차이가 있음을 알 수 있다 (Ueki 등, 1995). 그러나 *Aerobacter aerogenes*와 *Aspergillus oryzae*로부터 분리된 agaropectin sulfatase는 EDTA에 의해 전혀 영향을 받지 않았으며 *Pseudomonas testosteroni*로부터 분리된 agaropectin sulfatase 또한 EDTA에 의해 영향을 받지 않은 것으로 보고되고 있다 (Tazuke 등, 1998).

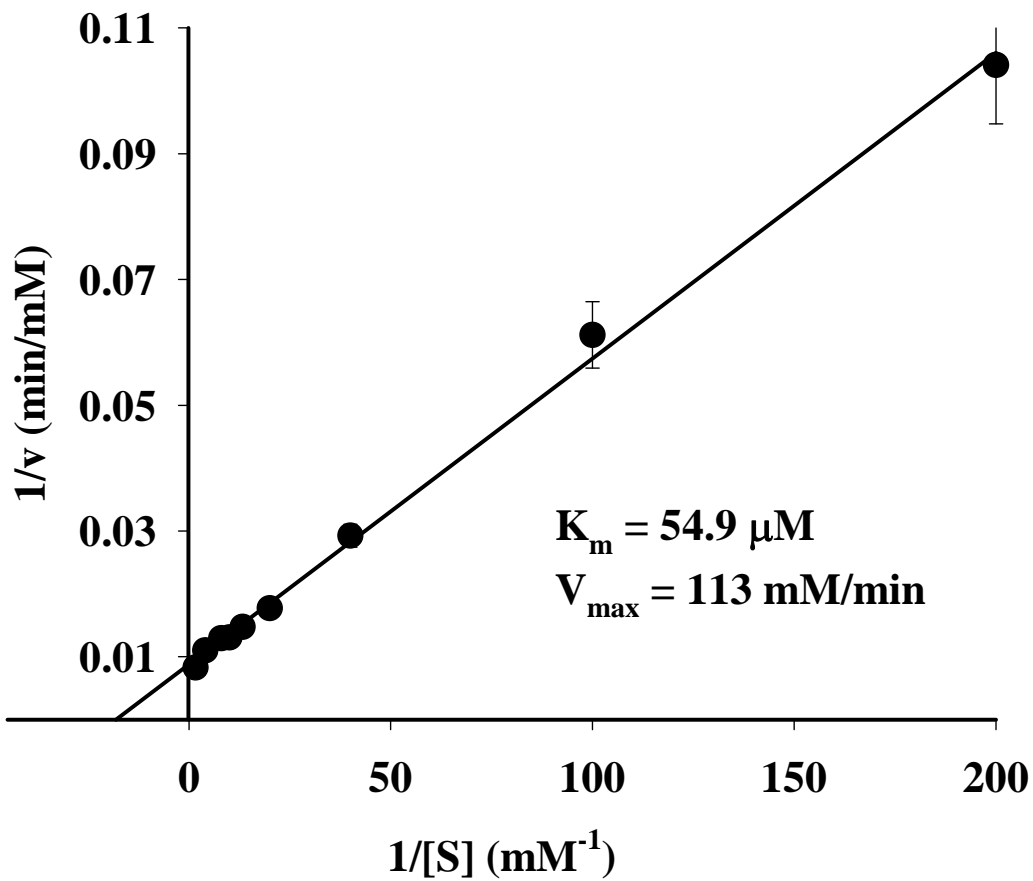


Fig. 16. Lineweaver-Burk plot from *Spingomonas* sp. AS5330. Activities were measured with substrate concentrations of 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.75, 0.1, 0.125, 0.25, and 0.625 mM NPS at pH 7.0 and 45 °C for 30 min.

Table 5. Effect of several inhibitors on agaropectin sulfatase activity from *Sphingomonas* sp. AS6330.

Inhibitors	Conc. (mM)	Relative activity (%)
Control		100
PMSF	0.1	45.5
	1	12.5
Leupeptin	0.1	93.4
	1	78.5
Pepstatin	0.1	81.9
	1	23.3
Iodoacetate	0.1	82.3
	1	85.1
EDTA	0.1	26.7
	1	19.1

바. 기질 특이성

한천, porphyran, fucoidan 및 carrageenan과 같은 황산다당류를 기질로 사용하여 정제효소의 기질특이성을 분석하였다. Table 6에 나타난바와 같이 정제효소는 한천의 황산기 제거반응에 가장 높은 효소활성을 나타내었으나, fucoidan과 carrageenan의 황산기 제거반응에서는 한천의 5% 가량의 활성을 나타내었다. 그리고 porphaaran의 탈황반응은 한천의 약 34% 활성을 나타내었다.

한천, carrageenan, porphyran 및 fucoidan과 같은 해조 황산다당류들은 galactopyranose로 구성된 기본적인 구조적인 유사성이 있으나 fucoidan만이 L-fucose로 구성되어 있다 (Mackie와 Preston 1974). 본 연구에서 분리된 효소는 한천에 대하여 가장 높은 활성이 있었으며, porphyran에 대한 활성은 한천의 24% 정도로 나타났다. Carrageenan과 fucoidan에 결합된 황산기들은 주로 C-2와 C-4 위치에 존재하지만 porphyran에 결합된 황산기들은 한천과 마찬가지로 C-6에 결합된 상태이다 (Mackie와 Preston 1974). 이러한 황산기들의 결합위치의 동질성이 porphyran에 대한 어느 정도의 활성을 나타내는 것으로 예상된다.

사. Agarpectin sulfatase로 제조된 agarose의 물리화학적 특성

Sphingomonas sp. AS6330균으로 부터 정제된 효소를 사용하여 효소적인 방법으로 한천중의 황산기 제거를 위하여 agarose를 제조하기 위하여 효소농도에 따른 반응조건을 검토하였다. 즉, 한천 1 kg에 5배량의 Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)을 가한 후 45°C에서 1시간 동안 교반하여 팽윤시킨 후 agarpectin sulfatase 10 U를 가하여 24시간 동안 반응시켰다. 반응중 일정 시간 간격으로 50 ml의 반응액을 취하여 3배량의 acetone을 가하여 침전시켜 원심분리 후 상등액의 황산염함량과 침전된 한천중의 황산기 함량을 원소분석기로 분석하였다. Fig. 17에 나타난바와 같이 반응시간이 경과함에 따라 반응액중의 황산화합물이 지속적으로 증가한 반면에 한천에 존재하는 황산기 함량을 시간 경과에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 한천중의 황산기는 반응 8시간만에 급격히 감소하였으며 이후 24시간 동안의 반응에 의하여 큰 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 가수분해반응으로 반응액중으로 유리된 황산화합물의 양과 일치하는 것을 보여주고 있다.

Agarpectin sulfatase로 45°C에서 4시간 동안 처리한 한천의 물리적 및 화학적 특성을 분석한 결과를 Table 7에 나타내었다. 효소처리에 의하여 겔강도는 2.3배 증가하였으

Table 6. Substrate specificity of agaropectin sulfatase against marine sulfated polysaccharides.

Substrate	Relative activity (%)
Agar	100 (5.4)
Porphyran	24.3 (2.21)
Fucoidan	2.4 (0.16)
-Carrageenan	3.2 (0.17)

Activities were determined using 5% of different substrates at 45°C and at pH 7.0.

며, 한천중의 황산기 함량은 97% ($p < 0.01$) 가량이 감소되었다. 100U의 agaropectin sulfatase로 처리된 한천의 겔강도, 황산기 함량 및 겔화 온도는 시판되는 DNA 전기영동용 agarose와 유사한 품질 특성을 나타내었으며, 특히 황산기 함량은 상용제품보다 훨씬 낮은 것으로 나타났다. 특이할 만한 결과는 기존의 유기용매에 의한 agarose의 분리시 수율이 25-30% 정도이나, 본 효소반응에 의해서 agarose 생산시 수율은 약 75%로 나타났으며, 이는 산업적인 agarose제조시 제조원가를 현격하게 절감할 수 있을 것으로 평가된다.

한천과 agarose에 있어서 황산기 함량은 전하량을 나타내므로 황산기함량과 EEO는 agarose품질의 주요한 지표이다 (Guiseley 등., 1993). 몇몇 상용되는 agarose의 성분을 분석한 결과 황산기 함량과 EEO는 서로 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Laas, 1972). Agarose 제조를 위한 주요 공정은 분별침전이나 흡착에 의한 agarose를 선별적으로 분리함으로써 황산기의 제거에 관심이 집중되고 있는 실정이다 (Guiseley 등. 1993; Provonchee, 1991). 이러한 공정은 황산기 함량을 효과적으로 감소시킬 수는 있으나 agarose의 수율이 25-30%로 아주 낮은게 단점이다 (Izumi, 1970; Guiseley 등. 1993; Duckworth와 Yaphé 1971). 이러한 관점에서 agaropectin sulfatase는 높은 수율로 한천으로부터 agarose를 생산할 수 있는 훌륭한 분자축매가 될 수 있다.

Agaropectin sulfatase로 처리된 한천 겔을 만들어 1 kb DNA ladder를 전기영동한 결과 시판되는 DNA 전기영동용 agarose와 비교한 결과 DNA 분리능에 있어서 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 18). 오히려 본 효소로 제조된 agarose는 시판되는 DNA 전기영동용 agarose보다 DNA 분리능에 있어서 뛰어난 것으로 평가되었다.

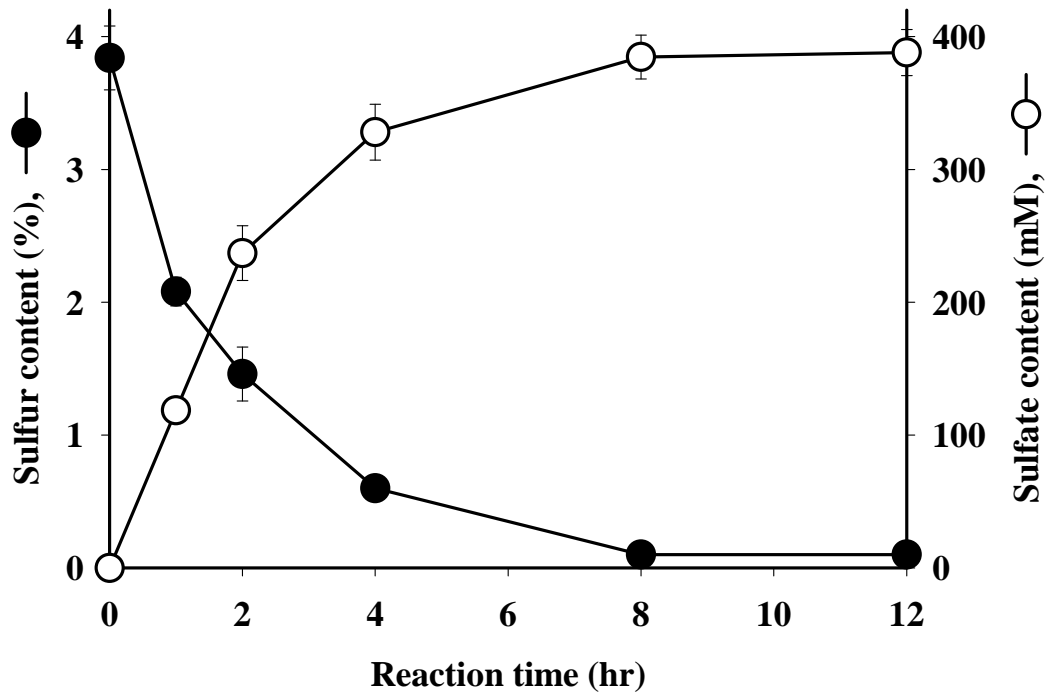


Fig. 17. Progressive change of sulfate in reaction solution and sulfur content in agar during the enzyme reaction. Reaction was performed with 200 g of agar suspended in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) and 50 U of agaropectin sulfatase. The reaction samples were taken from the mixture according to the time course and centrifuged. Sulfate content in the reaction supernatant was measured through the barium precipitation method and sulfur content in the agar was analyzed using a CHNS analyzer.

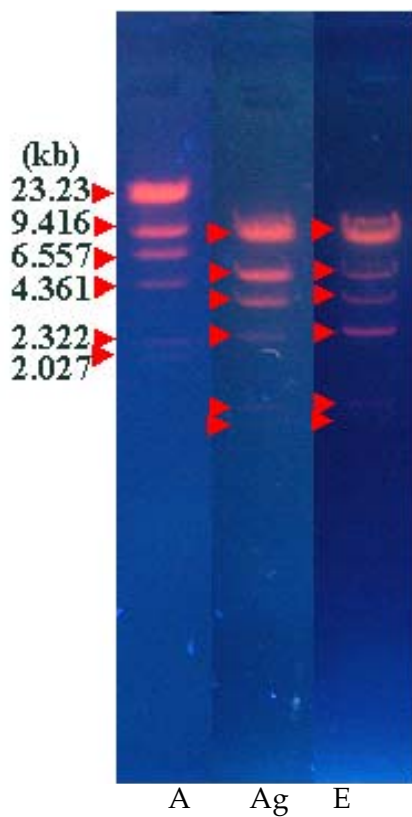


Fig. 18. DNA electrophoresis on gels from commercial agaroses and the agarose produced by the enzymatic method.

A, Junsei agar; Ag, Commercial agarose (Invitrogen Co.); E, agarose produced by the enzymatic method. loading 0.4 g DNA *Hind*III marker in 1% gel.

Table 7. Physicochemical properties of agar prepared with agaropectin sulfatase from *Sphingomonas* sp. AS6330

	Gel Strength (g/cm ²)	Sulfate (%)	Gelling EEO (-mr)	temp (°C)	Yield
Control	462±25	3.9±0.12	0.82±0.08	41±2	100
Enzyme treated agar					
50 U/kg	1,056±28	0.19±0.002	0.12±0.006	36±1	79.3±3.2
100 U/kg	1,128±32	0.09±0.003	0.09±0.004	34±1	77.6±3.3
Commercial agarose	1,110±30	0.19±0.002	0.12±0.006	35±1	ND

Enzyme reaction was performed at 45°C for 8 hr. The reaction mixture was composed of 200 g agar powder, 1,000 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), and indicated U of enzyme solution.

3. Agaropectin sulfatase 유전자의 cloning 및 유도성/구성적 과발현계 구축

가. 유도성 과발현계 구축

1) agaropectin sulfatase 유전자 증폭 및 subcloning

Sulfated polysaccharide의 탈황을 촉매 하는 것으로 알려진 *Pseudomonas carrageenovora* 유래 agaropectin sulfatase를 genomic DNA로부터 PCR를 통해 984 bp의 유전자를 증폭하였다 [Bond 등, 1997; Dhevendaran 등, 1980]. 이 때 사용한 primer는 forward : 5'-CGGGATCCCATGCAAAAAATTAGTATTATA-3' (underline : *Bam*H I) reverse (2종): 5'-CCAAGCTTTTAGCGTTT TAGTTCGT AAC-3'(underline : *Hind* III), 5'-CCAAGCTTGC GTTTTAGTTCG TAAC-3'를 사용하여 구축하였다.(underline : *Hind* III). 대장균에서 발현시키기 위해서 PCR 증폭한 agaropectin sulfatase 유전자 (*astA*)를 대장균 cloning vector인 pBluescript II SK(+)에 삽입하였다 (pBlue-ast).

2) 발현 plasmid 구축

pBlue-ast plasmid의 약 1 Kb의 agaropectin sulfatase 유전자 단편을 제한 효소(*Hind*III, *Bam*H I) 이용하여 pET21a vector에 삽입하고 *E. coli*에 형질전환하였다. (Fig. 19, pAST-A1). 이 대장균 발현계, pAST-A1를 구축하여 *E. coli* DH5a에 형질전환시켰다. 재조합 대장균의 최대 성장이 OD₆₀₀ = 0.3에서 agaropectin sulfatase 활성은 최대 0.3 unit/ml이며, 대부분이 배양액에서 측정되는 것으로 보아 대장균이 *astA* 활성형 단백질 발현에 의해 cell lysis 되는 것으로 보인다 (data not shown). *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환하여 발현 system을 사용하였다. 이때 선별배지는 LB + ampicillin (30 µg/ml)과 LB+ampicillin (30 µg/ml) + IPTG (1mM) + MMUF (4-methyl umbelliferyl sulfate)를 사용하였다.

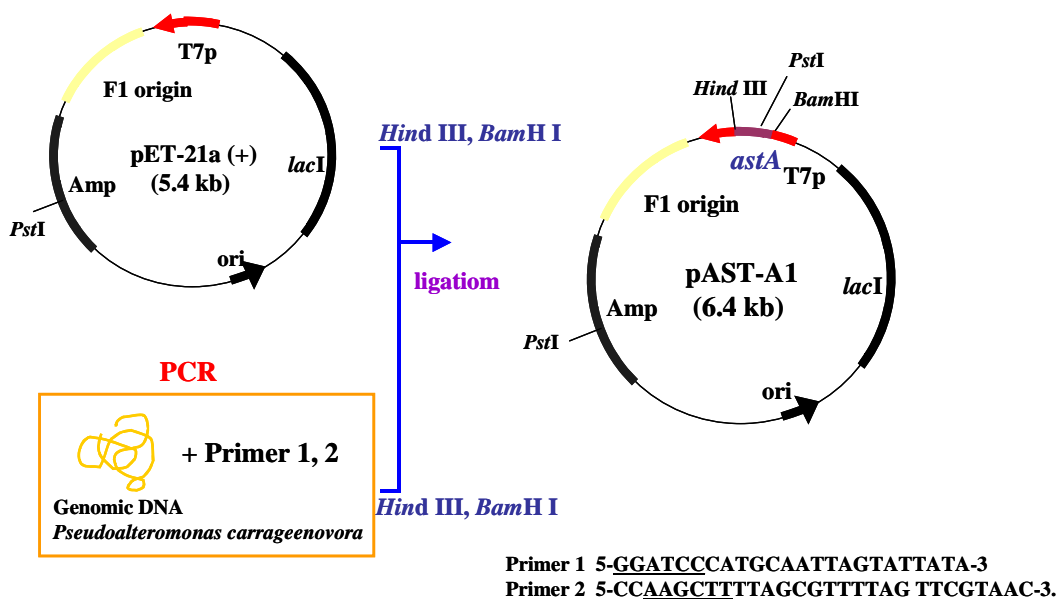


Fig. 19. Constuction of inducible expression plasmid of agaropectin sulfatase, pAST-A1.

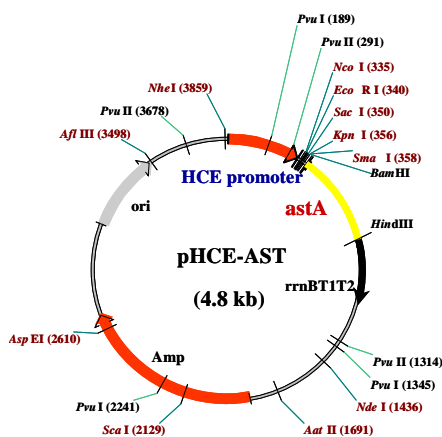


Fig. 20. Constuction of constitutive expression plasmid of agaropectin sulfatase, pHCE-AST.

나. 구성적 과발현계 구축

최근, 새로운 *E. coli* 발현 시스템인 pHCE vector 계열로서, *Geobacillus toebii* 의 D-amino acid aminotransferase (D-AAT) gene의 upstream 유래의 HCE promoter를 사용하여 구성적으로 외래 단백질을 높은 수준으로 발현시킬 수 있다 (Poo 등, 2002). 구성적 발현계를 구축하기 위해 유도적 발현계 plasmid pAST-A1에 제한 효소 (*Bam*HI, *Hind*III)로 처리된 agarosectin sulfatase DNA fragment를 pHCE-IA vector에 subcloning 하였다 (Fig. 20, pHCE-IA). 구축된 재조합 대장균에서 발현되는지를 확인하기 위해 plate 상에서 발현을 확인하였다. 이때 배지는 기본적인 대장균 배양용 배지인 LB agar배지에 ampicillin (30 μ g/ml)과 4-methylumbelliferyl sulfate (50 mM) 첨가하였다. 구성적 발현의 경우는 IPTG를 첨가하지 않은 배지를 사용하였다. 유도적 발현과 구성적 발현에서 모두 형광으로 활성이 나타나는 걸 확인하였다 (Fig. 21).

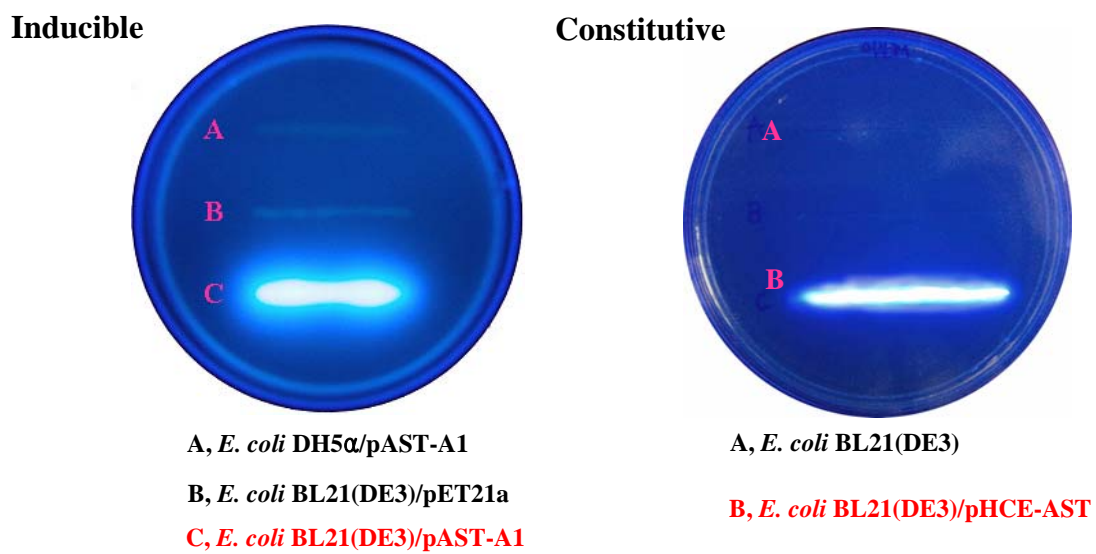


Fig. 21. agarosectin sulfatase activity of *E. coli* transformant. The cells were grown on LB medium containing 100 mM MUFS and 1 mM IPTG

다. 재조합 대장균에서 agarpectin sulfatase의 과발현

1) 유도적 발현계

E. coli BL21(DE3)/pAST-A1로부터 최적 agarpectin sulfatase 생산을 위한 최적 IPTG 농도 결정 실험을 행하였다. 본 재조합 균주를 전배양한 후 10 ml LBA배지 (LB+ampicillin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)가 포함된 test tube에 1% 접종한 후 $\text{OD}_{600} = 0.5$ 에서 IPTG를 첨가하여 4시간, 8시간 후 4 ml sampling하여 실험을 행하였다.

agarpectin sulfatase 효소 활성의 정의는 40°C에서 1분간 1 μmole 의 *p*-nitrophenol (*p*NP)를 방출하는 효소의 량으로 결정 하였으며, *p*NP의 측정은 흡광도 410 nm에서 행하였다. 그 결과 최적 IPTG 농도는 목적에 따라서 5~50 μM 로 사용할 수 있다. 상등액으로 활성형 효소를 생산하는 것을 목적으로 하는 경우 50 μM 의 IPTG 농도, 대장균 성장 및 세포내 활성형 재조합 단백질 생산을 목적으로 하는 경우 5~10 μM 의 IPTG 농도를 사용하여 발현시킬 수 있을 것으로 보인다. 대장균에서 활성형 agarpectin sulfatase 생산 시 성장이 억제 또는 cell lysis되며 발현 되는 것을 앞의 *E. coli* DH5a/pAST-A1에서 확인하였으며, *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1에서도 비슷한 결과를 보이나 IPTG 첨가 전에는 발현되지 않거나 극히 미량 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 50 μM IPTG 농도에서 agarpectin sulfatase를 발현시 4 시간대에서 대장균 생장은 $\text{OD}_{600} = 2.4$ agarpectin sulfatase 발현량은 상등액에서 0.25 unit/ml, 세포파쇄물의 soluble fraction에서 0.852 unit/ml로 나타났으며, 8 시간대는 대장균 생장은 $\text{OD}_{600} = 2.06$, agarpectin sulfatase 발현량은 상등액에서 1.05 unit/ml, 세포파쇄물의 soluble fraction에서 0.803 unit/ml로 나타나는 것으로 보아 활성형 agarpectin sulfatase 발현량에 따라 대장균이 lysis되어 상등액에서 측정되는 것을 알 수 있다. 또한 배양 시간의 증가에 따라 배양 상등액으로 활성형 agarpectin sulfatase 발현이 증가되는 것을 알 수 있었다. 활성형 agarpectin sulfatase 최대 활성은 10 μM IPTG 농도에서 2.04 unit/ml로 가장 활성이 높았다 (Fig. 22).

최대 활성을 나타내는 10 μM IPTG 농도에서 유도시기에 따른 발현 양상을 알아보 았다 (Fig. 5). 그 결과 유도물질 첨가 시기와는 상관없이 일정 수준에서 생산이 정지되는 것으로 보이며, 세포농도에 의존하는 것으로 보여 진다. 따라서 유가

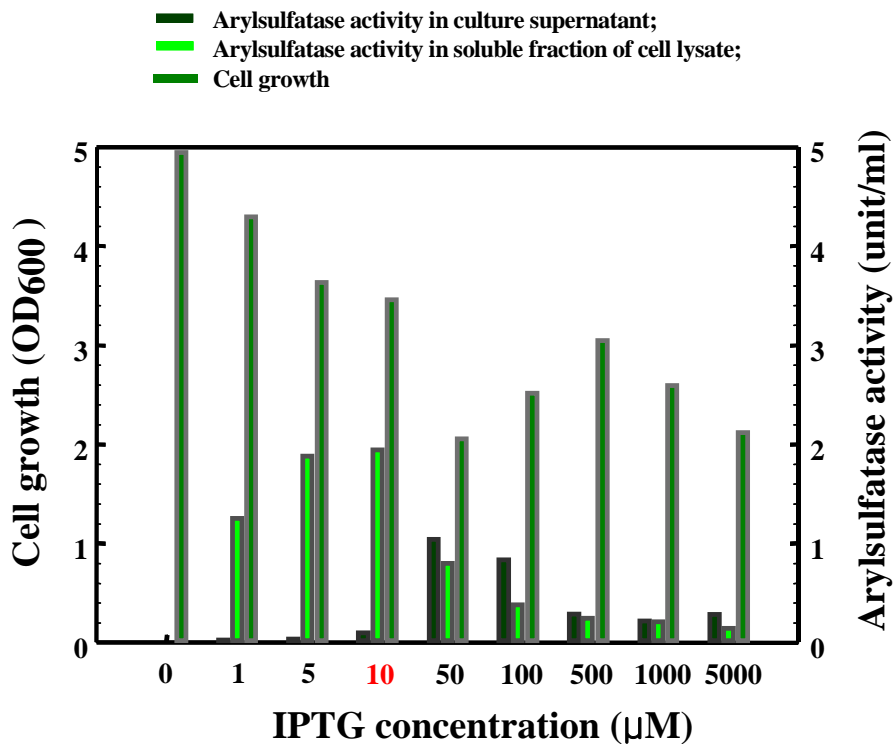


Fig. 22. Cell growth and agaropectin sulfatase activity at 8 h after IPTG induction in *E. coli* BL21 (DE3)/pAST-A1. IPTG solution with various concentrations was added at 2 h and thereafter 8 h the cells were harvested.

배양을 통해 고농도 세포 배양 후 유도물질 첨가를 통해 다량의 agaropectin sulfatase 생산이 가능 할 것으로 사료된다 (Matsumoto 등, 2002).

2) 구성적 발현계

E. coli BL21(DE3)/pHCE-AST로부터 최적 agaropectin sulfatase 생산을 위한 다양한 배지에서 배양하였다 (Fig. 23). 본 재조합 균주를 전배양한 후 50 ml 배지가 포함된 삼각 baffled flask에 1% 접종한 후 3시간 마다 3 ml sampling하여 실험을 행하였다. LB에 0.4% glycerol이 포함된 배지에서 배양시간 20 시간 전에서 상등액의 agaropectin sulfatase 활성이 빠르게 증가하고, 25 시간에서는 7.08 unit/ml로 가장 높은 agaropectin sulfatase 활성을 나타내었다. 유기질소원, 무기염 등 재조합 대장균에 의한 외래 단백질의 필수적인 영양 성분이 보강된 Maxybroth-FC에서는 LB에서보다 1.5배 세포농도가 높아졌고, 활성 또한 2배 정도 증가하여 5.46 unit/ml로 높은 활성을 나타내었다 (Fig. 24). 이는 배지 특성상에 빠른 세포 성장과 유기산 생성 및 catabolite repression 최소화에 따른 것이다. 또한, 두 가지 promoter에 대한 agaropectin sulfatase 발현 영향을 비교하기 위해 유도적 system인 pAST-A1 plasmid 와 구성적 system인 pHCE-AST를 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현 시켰을 때 agaropectin sulfatase의 활성이 *E. coli* BL21(DE3)/ pHCE-AST에서 *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1보다 40% 더 증가하였다 (Table. 8).

구성적으로 발현시킴으로써 몇 가지 이점이 있는데, 첫째는 비싸고 독성이 있는 유도 물질을 사용하지 않아도 되고, 둘째는 발현시킬 때의 유도 물질 첨가 시기, 농도 등의 과정을 생략할 수 있다는 것이다. 현재 구성적 발현을 한 예로는

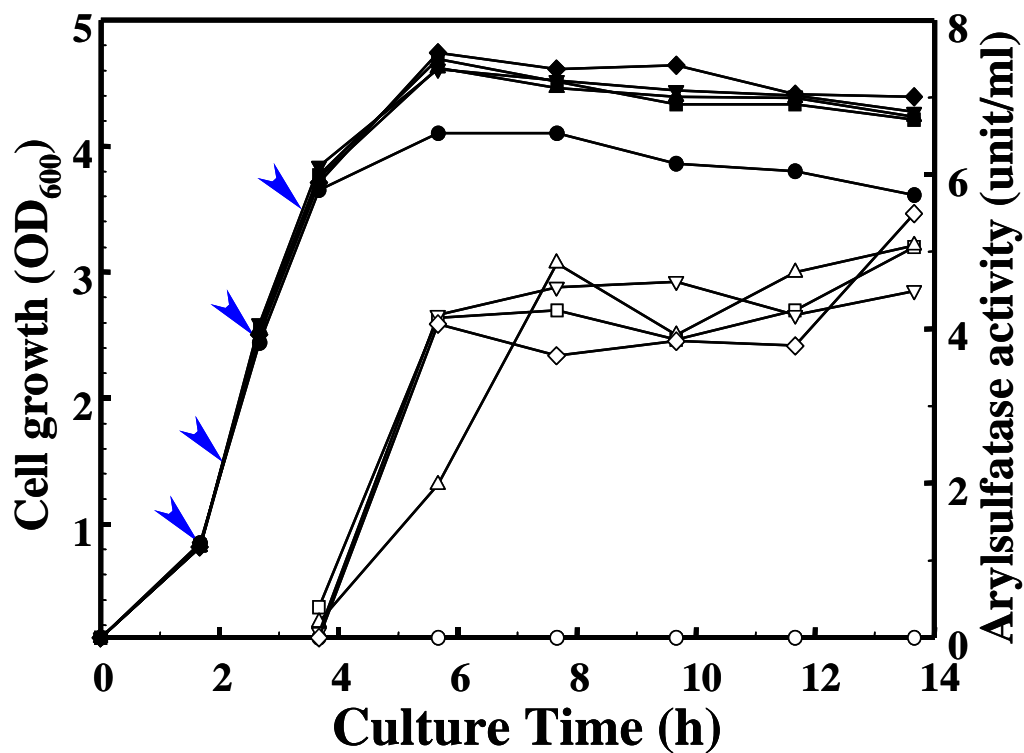


Fig. 23. Effect of IPTG induction time on the cell growth and agaropectin sulfatase activity in *E.*

coli BL21/pAST-A1 and BL21/pET21a. 10 μ M IPTG was added at the OD₆₀₀ = 0.85, 1.5, 2.5, or 3.5 (arrow heads).

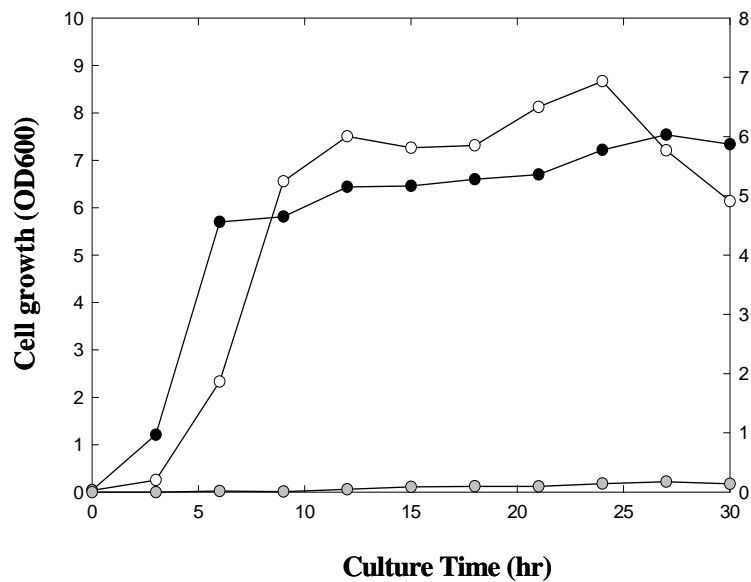
Closed and open symbols indicate cell growth and agaropectin sulfatase activity, respectively.

Symbols : (●,○), BL21(DE3)/pET21a; (■,□), OD₆₀₀=0.85; (▲,△), OD₆₀₀=1.5; (▼,▽), OD₆₀₀=2.5; (◆,◇), OD₆₀₀=3.5

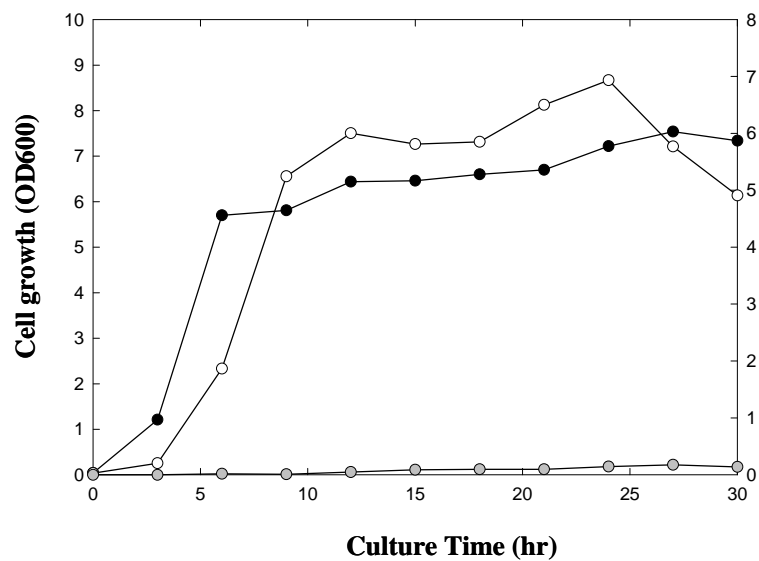
Table. 8. Comparison of cell growth and agaropectin sulfatase production between *E. coli* DH5 α /pHCE-AST and *E. coli* BL21/pHCE-AST

Strains	Culture Condition	Culture time (hr)	Cell growth (OD ₆₀₀)	agaropectin sulfatase activity (Unit/ml)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/pAST-A1	¹⁾ LB + 10 μ M	8	3.5	2.04
	¹⁾ LB + 50 μ M	8	2.1	1.85
<i>E. coli</i> BL21/pHCE-AST	¹⁾ LB	30	4.8	2.73
	¹⁾ LB + 0.4% Glycerol	30	7.5	7.08
	^{1)*} FC	30	7.2	5.46

¹⁾ Flask culture * Maxybroth-FC;



(A) LB medium containing 0.4% glycerol



(B) MaxyBroth -FC medium

Fig. 24. Time profiles of cell growth and agaropectin sulfatase activity in the flask culture of *E. coli* BL21/pHCE-AST. Symbols : Black symbols (●), cell growth; white symbols (○), intracellular activity; gray symbols (●), extracellular activity

Human necrosis factor- α (rhTNF α)을 생산한 것과, human leptin (146 amino acid)가 있다. 유가 배양만으로 높은 효율의 human leptin을 생산한 보고가 있다 (Jeong 등, 2004). 또 다른 예로 Maxybroth-FC 배지의 경우 재조합 esterase와 재조합 levansucrase의 경우는 각각 세포 농도 4배, 3배이고, 발현율은 각각 3배, 2배로 증가하였다. esterase의 경우는 회분식 배양에서 세포농도와 발현율 모두 LB에서 보다 2배 증가한 것으로 나타나 있다.

라. Chaperone과 공발현

pGro11 (5.9 kb)의 *groEL/ES* 발현 plasmid로써 selection marker로 tetracycline chloramphenicol (Cm)을 가지고 있으며, *groEL/ES* 발현 유도물질로 tetracycline을 사용한다. pGro7 (5.9 kb)는 pGro11와 같으나 발현 유도물질로 arabinose를 사용하는 것이 다르다. pG-KJE6 (9.9 kb)는 *groEL/ES* 발현을 위해 tetracycline을 사용하며, 또 다른 chaperone인 *dnaK/dnaJ/grpE*의 공발현 plasmid이다. *dnaK/dnaJ/grpE*의 발현을 위해 arabinose를 사용하였다.

이들 구축된 chaperone plasmid 는 pAST-A1 함께 *E. coli* BL21(DE3)에 co-transformation하여 선택배지 (LBACm)를 사용하여 형질전환된 균주를 선별하였다. chaperone plasmid과 sulfatase 발현 plasmid와 co-transformation하였다. co-transformation된 대장균 세포는 ampicillin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)과 chloramphenicol (14 $\mu\text{g}/\text{ml}$, chaperone 발현 plasmid의 선별)이 첨가된 배지에서 선별하였다.

pGro11과 pG-KJE6 도입시 *GroEL/ES* chaperone의 생산시 유도물질로써 tetracycline을 사용했을 때 agaropectin sulfatase 발현 및 균체 증식이 좋지 못하였으며, 반면 arabinose를 유도물질로 사용했을 때는 *GroEL/ES*에 비해 *dnaK/J/E* 발현시 agaropectin sulfatase 발현율이 더욱 높았다. pAST-A2 단독 발현 (0.407 unit/ml \cdot OD)과 pG-KJE6와 pAST-A2 공발현 (0.519 unit/ml \cdot OD)로 균체 당 agaropectin sulfatase 발현량이 증가한 것을 알 수 있었다.

마. 재조합 agaropectin sulfatase의 Zymogram 분석.

10% gel를 사용하여 영동 후 SDS washing buffer [50 mM Tris-HCl (pH

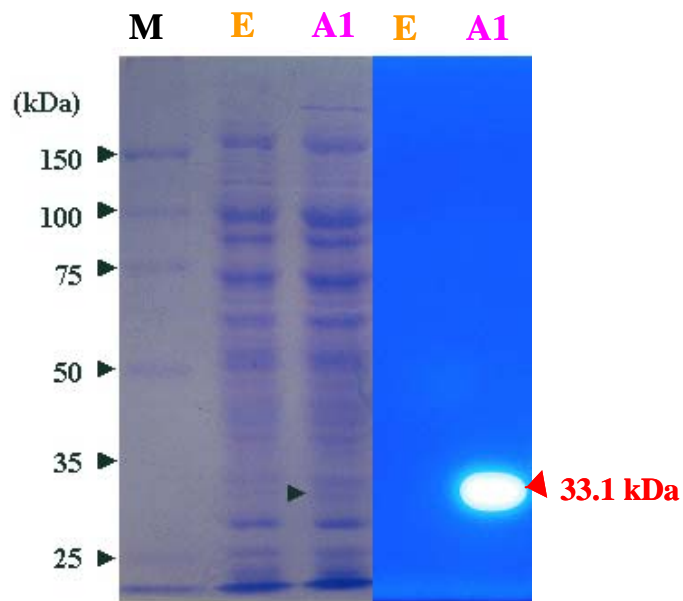
8.5])로 SDS를 제거하였다. 4°C에서 4시간 동안 교반기를 이용하여 여러 번 세척한 후 agarose (0.8%)에 SDS가 제거된 acrylamide gel를 올려 10 분간 37°C 항온기에서 반응시켜 확인 하였다 (Fig. 25). 재조합 agaropectin sulfatase 발현 시 SDS-PAGE를 통한 정확한 밴드확인이 되지 않는 문제를 Zymogram을 통해 agaropectin sulfatase의 위치를 확인하였다. 그 결과 33.1 kDa 부위에 형광을 발하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 34 kDa에서 signal peptide (25 amino acid)가 분리되어 나타난 분자량으로 사료된다.

P. carrageenovora 유래의 agaropectin sulfatase는 perispace 영역에 주로 발견되어진다(Barbeyron 등, 1995). 형질전환된 cell을 periplasmic 영역과 cytoplasmic 영역으로 나누었을 때 양쪽 모두 에서 활성이 나타났다 (Table. 2). 삼투압 원리로 *E. coli* cell의 세포막을 파쇄시킨 후 효소는 periplasm 영역으로 70%이상 존재하였다. *Pseudomonas* C12B, *Alteromonas carrageenovora* 유래의 agaropectin sulfatase의 경우 대부분이 periplasm 영역에 존재하는 것으로 알려진 바 있다 [Fitzgerald와 George, 1977; Barbeyron 등, 1995).

Table 9. Localization of recombinant agarpectin sulfatase in *E. coli* BL21/pAST-A1.

Fraction	Total activity (U)
Cell lysate	383 (100%)
Cytoplasm	47.8 (12.5%)
Periplasm	275 (71.8%)

* The number in parenthesis represents the localization percentage of agarpectin sulfatase.



MUFS, 4-methylumbelliferyl sulfate

Fig. 25. Zymogram analysis of the recombinant agaropectin sulfatase by staining with MUFS.

M, marker E, cell lysate of *E.coli* BL21(DE3)/pET21a A1, cell lysates of *E. coli* BL21(DE3)/pAST-A1

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

목표 항목	목표치	달성도 (%)
1. 유전자 확보 기술	agaropectin sulfatase, 유전자 증폭, 확보유무	100%
2. pET21a에 subcloning 기술	activity plate 확인(발색 확인, 유무)	100%
3. 발현 기술 고도화	≥ 3 unit/ml	>100%
4. Chaperone과 공발현 기술개발	$\geq 2\sim 3$ unit/ml	90%
5. 공발현계 발현 기술 고도화	≥ 10 OD, ≥ 4 unit/ml	90%
6. agaropectin sulfatase 생산량 (회분배양)	≥ 4 unit/ml	100%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 환경성 개선효과

◆ agaropectin sulfatase의 생산에 따른 세포파쇄물, 효소 정제시 소모되는 유기용매 등은 agarose 정제에 사용되는 유기용매에 비해 극소량이며, agarose의 연속 생산을 위한 agaropectin sulfatase의 흡착 고정화 기술에 투입되는 담체도 환경친화적이고 재사용이 가능한 silica 계열임.

◆ 유기용매법 사용시 용매회수 장치의 설비, 작업환경의 악화, 공정에 대한 여러 가지 위험 요소들을 내포하며, 산업폐기물이 다량 발생함.

◆ 유기 용매 사용시 발생하는 발암, 폭발성 등 작업자 위해 요소를 원천적으로 회피 가능.

◆ 고정화 효소 충전층 생물반응기 사용할 결과 agaropectin의 agarose로의 전환되어 agarose 생산 수율 상승 (기존 유기 용매법은 한천 22 톤을 사용하여 고순도 agarose 2 톤 생산하나, 생물공정을 혼합 사용시 한천 15 톤을 사용하여 같은 양의 고순도 agarose 생산 가능)하여 기존 용매법에 비해 최종 20~40% 이하의 용매 사용으로도 동량의 고순도 agarose 생산 가능함.

◆ 저순도 agarose 생산 공정에서 나오는 부산물 중 agarose와 agaropectin은 아기용 기저귀와 방취제에 사용 가능하며, 고순도 agarose 생산 공정에서 부산물로 저순도 agarose를 20% 정도 회수 가능함. 즉, 생성 부산물을 폐기하지 않고, 고부가가치의 타용도로의 활용 가능성을 제시.

◆ 황산염, 암모늄염, 나트륨염 등은 한천 세척 단계와 고정화 효소 충전층 생물반응기 단계이후 발생. 특히 황산염은 생물반응기를 통과 후 과량 생산됨. 이는 BaCl₂를 이용하여 침전 회수와 제거 가능하여 수질 개선에 도움.

2. 경제성 개선효과

◆ 우리나라의 한천의 60-70%는 외국으로 수출되며, 수출된 한천은 재 가공되어 미생물 배지용 또는 agarose(고부가 가치화 1,000~2,000 배)로 제조되어 역수입 되는 실정. 원료 원가는 kg당 약 1 천원이고, 분한천 또는 실험한천으로 조

제한 경우 kg당 8 천원 내지 2 만원 가량이며, 미생물 배지용으로 제조시 kg 당 약 20 만원으로 부가가치는 200 배 증가.

◆ 생명공학의 급속한 발달로 DNA 분석용 agarose 및 단백질 정제용 agarose 유도체(예, Sepharose) 수요가 급증하여 현재의 시장 규모는 7,000 억원에 달하며, 한국시장은 300 억원 정도.

◆ DNA 분석용 고순도 agarose를 국산화함으로써 수입비용을 절감할 뿐 아니라, 저가 공급이 가능하여 국내 생물 산업 발전의 초석 및 수입대체 효과가 클 것으로 예상됨.

◆ 생명공학 관련 연구소의 1개 실험실 당 연간 24만원~6백만원 어치의 agarose 사용 부담을 경감시킬 것으로 예상.

◆ 용매 사용과 회수 시설의 최소화로 기술 집약적 소규모 다품종 생산이 가능.

◆ 고정화 효소 충전층 생물반응기 사용할 경우, DMSO, CPC, PEG와 같은 유기 용매 공정 제거됨. 그 결과 유기 용매 재처리 비용 절감 및 유기용매 재처리 시설의 감소로 생산 원가 절감이 가능(agarose 2 ton/년 생산 시 유기용매 1,100 ton 재처리비 감소).

◆ 고품질의 agarose를 수출하여 외화를 획득함과 동시에 국내 홍조류 양식산업을 활성화.

◆ 수입 agarose 량의 30% 대체를 예상할 경우 핵산분석용 고순도 agarose의 경우, 년 90 억원의 수입대체 효과 즉, 경제성 개선 효과를 보임

1. 과발현 기술

-다른 재조합 생물체에서의 과발현계 기술 개발 활용

2. 유용 효소의 대량 생산 기술

-다른 기능성 효소의 대량 생산에 응용

3. 재조합 효소의 고순도 정제 농축 기술

-IMAC(Immobilized Metal Affinity Chromatography) 기술 적용

4. 고정화 기술

-다른 기능성 탄수화물 소재 (올리고당, cyclodextrin)의 연속 생산에 적용

5. 충전층 생물 반응기를 통한 연속 탈황 기술

-수입품과 가격 경쟁력 유지 및 수출 경쟁력 확보

6. 저급 agarose 대체 사용 기술

-고부가 가치 흡수제 (기저귀), 흡취제 (방취제) 제품 생산

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 통하여 얻은 해외 논문들은 대부분 본 보고서에 인용되어 있다. 본 연구를 통하여 다양한 기능을 지닌 해양미생물에 대한 정보를 습득하였다. 특히 본 연구시 해수와 여러가지 해양자원으로부터 해양미생물을 분리하는 동안 여러가지 효소활성을 지니는 해양세균을 확보하였다. 본 연구개발시 확보된 해조다당류 분해효소를 생산하는 해양미생물로써, alginate lyase, agarase, carrageenase 등의 효소를 생산하는 미생물을 분리하였다.

최근들어 건강에 대한 관심이 고조됨으로써 기능성 올리고당류의 개발에 많은 연구가 되고 있다. 특히 일본에서는 막대한 자원의 해조다당류를 원료로하여 해조올리고당에 관한 생리기능성에 관한 연구가 최근 많이 연구가 되고 있다. 가능하다면 본 연구개발의 부산물로써 확보된 해양미생물을 이용하여 해조올리고당의 생산하여 다양한 분자량의 올리고 당을 세포실험을 통하여 기능성을 입증하고자 한다.

제 7 장 참고문헌

Akagawa-Matsushita, M., Matsuop, M., Koga, Y., Yamasato, K. 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int J Syst Bacteriol* 42: 621-627.

Allan G.G., Johnson, P G., Lay, Y., and Sarkanen. K. V. 1971. Marine polymers; Part 1. A new procedure for the fractionation of agar. *Carbohydr. Res.* 17: 234-236.

Amott, S. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.* 90: 269-284..

Araki, C. 1937. Agar-agar. III. Acetylation of the agar-like substance of *Gelidium amansii*(L.). *J Chem Soc Japan* 58: 1338-1350.

Barbeyron T, Potin P, Richard C, Collin O, Kloareg B (1995) arylsulfatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiology* 141: 2897-2904.

Beil S, Kehrl H, Peter J, Staudenmann W, Cook AM, Leisinger T, Kertesz MA. (1995) Purification and characterization of the agaropectin sulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa*PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene (*atsA*). *Eur J Biochem* 229: 385-394.

Bond, C.S., Clements, P.R., Ashby, S.J., Collyer, C.A., Harrop, S.J., Hopwood, J.J., and Guss, J.M. 1997. Structure of human lysosomal sulfatase. *Structure (Lond.)* 5, 277-289.

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.

Chandrasekaran, M. 1997. Industrial enzymes from marine microorganisms: The

Indian scenario. J. Mar. Biotechnol. 5, 86–89.

Chung, W.K., King, G.M. 2001. Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. Appl Environ Microbiol 67: 5585-5592.

Colwell, R.R. 1993. "World Bank Discussion Papers," ed. R.A. Zilinskas and C.G. Lundin, Vol 210, pp. ix–x, World Bank Press, Washington D.C.

De Hostos, E.L., Togasaki, R.K., Grossman, A. 1988. Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. J Cell Biol 106: 29–38.

Delisle, G. and Milazzo, F. H. 1970. The isolation of arylsulphatase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta. 212: 505–508.

deVries, D.J. and Beart, P.M. 1995. Fishing for drugs from the sea: Status and strategies. Trends Pharmacol. Sci. 16, 275–279.

Dhevendaran, K. 1984. agaropectin sulfatase in marine polychaetes. Fish Technol. 21, 57–61.

Dhevendaran, K. and Maya, K. 1998. agaropectin sulfatase in fish and shellfish of veli lake, South India. J. Mar. Biotechnol. 6, 71–75.

Dhevendaran, K., Chandramohan, D., and Natarajan, R. 1985. Agaropectin sulfatase producing bacteria in marine sediments. Fish Technol. 22, 121–125.

Dhevendaran, K., Kannupandi, T., and Natarajan, R. 1980. agaropectin sulfatase activity in marine gastropods. Mahasagar 13, 173–178.

Dierks, T., Lecca, M.R., Schmidt, B., and von Figura, K. 1998. Conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatase occurs by a common mechanism in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 423, 61–65.

Dierks, T., Schmidt, B., and von Figura, K. 1997. Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11963–11968.

Do, J.R. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish. Soc.* 30, 423–427 (in Korean).

Dodgson, K.S. and Price, R.G. 1963. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *Biochem J* 84: 350–356.

Dodgson, K.S. White, G.F., and Fitzgerald, J.W. 1982. Sulfatases of microbial origin. CRC Press, Boca Raton, FL.

Duckworth, M. and Yaphe, W. 1971. The structure of agar. Part 1. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr Res* 16: 189–197.

Edward, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., and Bottger, E.C. 1989. Isolation and direct complete determination of entire genes. *Nucleic Acids Res* 17: 7843-7853.

Edwards, S.L. and Dubin, P.L. 1993. pH effects on non-ideal protein size-exclusion-exchange chromatography on Superose-6. *J Chromatogr* 648: 3-7.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (phylogenetic inference package) version 3.5c. Seattle,

University of Washington.

Fitch, W.M. and Margoliash, E. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science* 155: 279-284.

Fitzgerld, J.W. and Cline, M.E. 1977. The occurrence of an inducible agaropectin sulfatase in *Comamonas terrigena*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2, 221-224.

Fitzgerld, J.W., Maca, H.W., and Rose, F.A. 1979. Physiological factors regulateing tyrosine sulphate sulphohydrolase activity in *Comamonas terrigena*: occurrence of constitutive and inducible enzymes. *J. Gen. Microbiol.* 111, 407-415.

Fleminger, G., Solomon, B., Wolf, T., and Hadas, E. 1990. Effect of polyethylene glycol on the non-specific adsorption of proteins to Eupergit C and agarose. *J Chromatogr* 510:271-279.

Franco, B., Meroni, G., Parenti, G., Levilliers, J., Bernard, L., Gebbia, M., Cox, L., Maroteaux, P., Sheffield, L., Rappold, G.A., Andria, G., Petit, C., and Ballabio, A. 1995. A cluster of sulfatase genes on XP22.3-mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* 81, 15-25.

Gonzalez, J.M., Mayer, F., Moran, M.A., Hodson, R.E., and Whitman, W.B. 1997. *Sagittula stellatagen*. nov., sp. nov., a lignin-transforming bacterium from a coastal environment. *Int J Syst Bacteriol* 47: 773-780.

Gonzalez, J.M. and Moran, M.A. 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the -subclass of the class *Proteobacteria* in coastal seawater. *Appl Environ*

Microbiol 63: 4237-4242.

Guiseley, K.B. 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. Carbohydr Res 13: 247-256.

Guiseley, K.B., Kirpatrick, F.H., Provonchee, R.B., Dumais, M.M., and Nochumson, S. 1993. A further fractionation of agarose. Hydrobiologia 260/261: 505-511.

Haard, H. 1998. Specialty enzymes from marine organisms. Food Technol. 52(7), 64- 52.

Henderson, M.J. and Milazzo, F.H. 1979. Arylsulfatase in *Salmonella typhimurium*: detection and influence of carbon source and tyramine on its synthesis. J Bacteriol 139: 80-87.

Hoshi, M. and Moriya, T. 1980. Arylsulfatase of sea-urchin sperm. 2. Arylsulfatase as a lysin of sea-urchins. Dev Biol 74: 343-350.

Izumi, K. 1970. A new method for fractionation of agar. Agr Biol Chem 34: 1739-1740.

Jansen, H.J., Hart, C.A., Rhodes, J.M., Saunders, J.R., and Smalley, J.W. 1999. A novel mucin-sulphatase activity found in *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol 48: 551-557.

Jol, C.A., Neiss, T.G., Penninkhof, B., Rudolph, B., and Ruiters, G.A.D. 1999. Novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. Anal Biochem 268: 213-222.

Jukes, T.S. and Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, HN (eds) Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, pp 21-132.

Kertesz, M.A. 1999. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 24: 135-175.

Kertesz, J.W., Leisinger, T. and Cook, A.M. 1993. Proteins induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, or *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 175, 1187–1190.

Ki-Jun Jeong, Jong-Hyun Choi, Won-Min Yoo, Ki-Chang Keum, Nae-Choon Yoo, Sang-Yup Lee, and Moon-Hee Sung. 2004. Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant *rpoS*- *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 36

Kim, D.S., Lee, D.S., Cho, D.M., Kim, H.R., and Pyeun, J.H. 1995. Trace components and functional saccharides in marine algae 2. Dietary fiber content and distribution of the agal polysaccharides. *J. Korean Fis. Soc.* 28, 270–278 (in Korean).

Kolodny, E.H., and Fluharty, A.L. 1995. in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D., eds) pp. 2693–2741, McGraw–Hill, New York.

Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178: 703.

Laas, T. 1972. Agar derivative for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. II. Charge-free agar. *J Chromatogr* 66: 347-355.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-686.

Ledyard, K.M., DeLong, E.F., and Dacey, J.W.H. 1993. Characterization of a

DMSP-degrading bacterial isolate from the Sargasso Sea. *Arch Microbiol* 160: 312-318.

Lee, S.R., Cho, H.O., and Park, S.K. 1975. Extraction yield and quality attributes of agar from domestic seaweeds according to various pretreatments. *Korean J. Food Sci. Technol.* 7, 109–114 (in Korean).

Lonnerdal, B. and Laas, T. 1976. Improved agarose for immunoelectrophoresis. *Anal Biochem* 72: 527–532.

Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmar, T., Gieselmann, V., von Figura, K., and Ssenger, W. 1998. Crystal structure of human agaropectin sulfatase A—The aldehyde function of the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfatase ester hydrolase. *Biochemistry* 37, 3654–3664.

Mackie, W. and Preston, R.D. 1974. Cell wall and intracellular region polysaccharides. In: Stewart WDP (eds) *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 64–65.

Marinho-Soriano, E., Silva, T.S.F., and Moreira, W.S.C. 2001. Seasonal variation in the biomass and agar yield from *Gracilaria cervicornis* and *Hydropuntia cornea* from Brazil.

Matsumoto, T., D. Katsura, A. Kondo, and H. Fukuda. 2002. Efficient secretory overexpression of *Bacillus subtilis* pectate lyase in *Escherichia coli* and single-step purification. *Biochem. Eng. J.* 12: 175–179.

Maya, K., Dhevendaran, K., Natarajan, P. 1990. agaropectin sulfatase producing bacteria in the gut of *Therapon jarbua*. Lesel R (ed). *Microbiology in poecilotherms*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 203–210.

Miech, C., Dierks, T., Selmer, T., von Figura, K., and Schmidt, B. 1998. Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae* carries a formylglycine generated from a serine. *J Biol*

Chem 273: 4835-4837.

Milanesi, A.A. and Bind, J.W.C. 1972. Lysosomal enzymes in aquatic species II. Distribution and particle properties of thermally acclimated muscle lysosomes of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp Biochem Physiol* 41: 473-491.

Murooka, Y., and Harada, T. 1981. Regulation of derepressed synthesis of arylsulfatase by tyramine oxidase in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 145:796-802.

Murooka, Y., Ishibashi, K., Yasumoto, M., Sasaki, M., Sugino, H., Arakami, H., and Yamashita, M. 1990. A sulfur- and tyramine-regulated *Klebsiella aerogenes* operon containing the agaropectin sulfatase (atsA) gene and the atsB gene. *J. Bacteriol.* 172, 2131-2140.

Murooka, Y. and T. Harada. 1981. Regulation of derepressed synthesis of arylsulfatase by tyramine oxidase in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 145: 796-802..

Parenti, G., Meroni, G., and Ballabio, A. 1997. The sulfatase gene family. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 7, 386-391.

Park, Y.Y., Rhee, C., and Yang, H.C. 1985. Effect of acid treatment on extractability and properties of agar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17, 319-325 (in Korean).

Poo, H., J. J. Song, S. P. Hong, Y. H. Choi, S. W. Yun, J. H. Kim, S. C. Lee, S. G. Lee, and M. H. Sung. 2002. Novel high-level constitutive expression system, pHCE vector, for a convenient and cost-effective soluble production of human tumor necrosisfactor- α . *Biotechnol. Lett.* 24: 1185-1189.

Porath, J., Janson, J.C., and Laas, T. 1971. Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. I. Desulphated and reduced cross-linked agar and agarose in spherical bead form. *J Chromatogr* 60: 167-177.

- Provonchee, R.B. 1991. Agarose purification method using glycol. U.S. Pat. 4,990,611.
- Raas, T. 1972. Agar derivatives for chromatography, electrophoresis and gel-bound enzymes. II. Charge-free agar. *J Chromatogr* 66: 347-355.
- Recksiek, M., Selmar, T., Dierks, T., von Bulow, R., and von Figura, K. 1998. Sulfatase, trapping of the sulfated enzyme intermediate by substituting the active site formylglycine. *J. Biol. Chem.* 273, 6096-6103.
- Renn, D. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. *Trends Biotechnol.* 15: 9-14.
- Roberton, A.M., and Wright, D.P. 1997. Bacterial glycosulfatases and sulphomucin degradation. *Can J Gastroenterol* 11: 361-366.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
- Schmidt, B., Selmar, T., Ingendoh, A., and von Figura, K. 1995. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82, 271-278.
- Selmer, T., Hallmann, A., Schmidt, B., Sumper, M., and von Figura, K. 1996. The evolutionary conservation of a novel protein modification, the conversion of cysteine to serinesemialdehyde in srylsulfatase from *volvox carteri*. *Eur. J. Biochem.* 238, 341-345.

Seo, H.J., Kim, J.H., Byun, D.S., and Kim, H.R. 2001. Purification and characterization of arylsulfatase produced from *Sphingomonas* sp. AS6330. 75th Japanese Society of Fisheries Science, Yokohama, Oct. 04-07.

Sorokin, D.Y. 1995. *Sulfitobacter pontiacus* gen. nov., sp. nov. : a new heterotrophic bacterium from the Black sea, specialized on sulfite oxidation. Microbiology 64: 354-365.

Stackebrandt, E. and Goebel, B.M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol 44: 846-849.

Tazuke, Y., Matsuda, K., Adachi, K., and Tsukada, Y. 1998. Purification and properties of a novel sulfatase from *Pseudomonas testosteroni* that hydrolyzed 3 β -hydroxy-5-cholenoic acid 3-sulfate. Biosci Biotechnol Biochem 62: 1739-1744.

Ueki, T., Sawada, Y., Fukagawa, Y., and Oki, T. 1995a. Arylsulfatase from *Streptomyces griseorubiginosus* S980-14. Biosci Biotech Biochem 59:1062-1068
Ureil, J. 1961. Ann. Inst. Pasteur 101, 104.

Ueki, T., Hawada, Y., Fukagawa, Y., and Oki, T. 1995b. A new type of arylsulfatase with high affinity to the sulfuryl moiety of the substrate. Biosci Biotech Biochem 59: 1069-1075.

Vairavamurthy, M. A., W. Zhou, T. Eglinton, and B. Manowitz 1994. Sulfonates: a new class of organic sulfur compounds in marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*. 58: 4681-4687.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichewsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P., and Trueper, H.G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int J Sys Bacteriol 37: 463-464.

Wilson, K.H., Blichington, R.B., and Greene, R.C. 1990. Amplication of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 28: 1942-1946.

Woes, C.R. 1987. Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221-271.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Naka, T., Suzuki, S., and Yano, I. 1999. Proposal of *Sphingomonas suberifaciens*(van Bruggen, Jochimsen and Brown 1990) Comb. nov., *Sphingomonas natatoria* (Sly 1985) Comb. nov., *Sphingomonas ursincola* (Yurkov et al. 1997) Comb. nov., and Emendation of the genus *Sphingomonas*. Microbial Immunol 43: 339-349.

Yoon, H.S. and Park, Y.H. 1984. Studies on the composition of agarose and agartin in agar-agar. Bull Korean Fish Soc 24: 27-33.

수산년감. 1998. 한국수산회.