GOVP1200505540

해양수산부
해양수산중소·벤처기업기술개발지원사업
사업결과보고서

생물공학적 공정기술을 응용한 고 품질 한천올리고당 산업화 기술개발

2004년 12월 20일

주 관 기 업 (주) 바이오라인즈
참 여 기 업 (주) 씨에스에프

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 "[생물공학적 공정기술을 응용한 고 품질 한천올리고당 산업화기술개발]에 관한 해양수산중소·벤처기업기술개발지원사업"(개발기간 : 2001. 9 . ~ 2004 . 7 .)과제의 사업결과보고서로 제출합니다.

2004년 12월 20일

주 관 기 업 : (주)바이오라인즈

개 발 책 임 자 : 공재열 (대표이사)

참 여 기 업 : (주)씨에스에프

목 차

제 출 문 ---------- 1

목 차 ---------- 2

제 1 장 서 론 ---------- 10

제 1 절 연구의 현황 ---------- 10

1. 연구의 현황 ---------- 10

2. 연구의 목적 ---------- 11

제 2 절 연구의 필요성 ---------- 11

1. 기술적 측면 ---------- 11

2. 경제적 측면 ---------- 11

3. 사회·문화적 측면 ---------- 12

제 3 절 국내·외 기술 현황 ---------- 13

1. 국내의 기술현황 ---------- 13

2. 국외의 기술현황 ---------- 14

제 4 절 연구목표 및 범위 ---------- 15

1. 1차년도의 연구목표 ---------- 15

2. 2차년도의 연구목표 ---------- 15

3. 3차년도의 연구목표 ---------- 15

4. 연구진도표 ---------- 16

제 2 장 생물공학적 기법을 이용한 한천분해효소 고 생산능을 이용한 한천분해효소의 고생산능을 지닌 변이주의 개발 ---------- 18

제 1 절 서 론 18

제 2 절 재료 및 방법 19

1. 돌연변이 유발에 의한 아가레이즈의 고생산성 균주의 개발 19

가. 돌연변이 균주의 선별 19

나. 최적배양조건 19

다. 효소의 분리 및 정제 19

라. 아가레이즈의 효소학적 특성조사 20

(1) 최적온도 및 안정성 20

(2) 최적 pH 및 안정성 20

(3) 기질의 특이성 20

(4) 정제된 효소의 K_m 및 V_{max} 20

(5) 청정제의 영향 20

(6) 저해제의 영향 20

(7) 금속이온의 영향 21

(8) 캐미칼의 영향 21

(9) 환원제의 영향 21

(10) 아미노산 조성의 분석 21

(11) TLC를 이용한 한천올리고당의 분석 21

2. 유전자 클로닝을 이용한 아가레이즈의 고생산성 균주의 개발 21

가. *E. coli*에서의 아가레이즈의 발현 21

나. T7 프로모터를 이용한 아가레이즈의 발현 및 효소학적 특성조사 22

3. *E. coli*에서의 아가레이즈의 발현 22

4. T7 프로모터를 이용한 아가레이즈의 발현 및 효소학적 특성조사 22

5. 한천분해효소 대량생산을 위한 공정 개발 22

6. 한천올리고당 생산을 위한 효소 반응기 개발 22

7. 최적반응조건하에서 한천올리고당의 생산 23

8. 고농도기질 사용을 위한 한천 기질의 입방화 23

9. 한천올리고당 대량생산의 프로세스 개발 23

제 3 절 결과 및 고찰---------- 23

1. 돌연변이 유발에 의한 아가레이즈의 고생산성 균주의 개발---------- 23

가. 돌연변이주의 선별---------- 23

나. 최적배양조건---------- 24

다. 효소의 분리 및 정제---------- 24

라. SDS-PAGE를 이용한 효소활성 측정---------- 25

마. 아가레이즈의 효소학적 특성조사---------- 31

(1) 최적온도와 안정성---------- 31

(2) 최적 pH와 안정성---------- 31

(3) 기질의 특이성---------- 31

(4) 정제된 효소의 K_m 및 V_{max}---------- 35

(5) 청정제의 영향---------- 35

(6) 저해제의 영향---------- 35

(7) 금속이온의 영향---------- 38

(8) 케미칼의 영향---------- 38

(9) 환원제의 영향---------- 38

(10) 아미노산의 조성의 분석---------- 38

(11) TLC를 이용한 한천올리고당의 분석 ---------- 38

2. 유전자 클로닝을 이용한 아가레이즈의 고생산성 균주의 개발---------- 44

가. 아가레이즈 유전자의 클로닝---------- 44

나. 아가레이즈 유전자의 염기배열 결정 및 분석---------- 44

다. 코돈 유세이즈 분석 ---------- 47

라. 아미노산 조성 분석 ---------- 52

마. 하이드로퍼시 분석---------- 52

바. Ba41의 아미노산 비교---------- 56

3. *E. coli*에서의 아가레이즈의 발현 ---------- 56

가. 아가레이즈의 발현 플라스미드의 제조---------- 56

4. T7 프로모터를 이용한 아가레이즈의 발현---------- 57

5. 생산된 아가레이즈의 특성조사---------- 61

가. 최적온도와 안정성 ---------- 61
나. 최적 pH와 안정성---------- 61
다. 기질의 특이성---------- 61
라. 정제된 효소의 K_m 및 V_{max} ---------- 65
마. 청정제의 영향---------- 65
바. 저해제의 영향---------- 65
사. 금속이온의 영향---------- 69
아. 케미칼의 영향---------- 69
자. 환원제의 영향---------- 69
6. 한천분해효소의 대량생산을 위한 공정 개발---------- 69
7. 한천올리고당 생산을 위한 효소 반응기 개발---------- 72
가. 조효소의 제조---------- 72
나. 고정화 효소의 제조---------- 72
다. 고정화 비드의 크기별 제조---------- 74
라. 고정화 지지체의 선정 및 최적농도---------- 74
마. 고정화 비드의 크기별 전환율---------- 77
바. 고정화 비드의 강도 측정---------- 77
사. 고정화 효소의 활성에 미치는 온도의 영향---------- 80
아. 고정화 효소의 활성에 미치는 pH의 영향---------- 80
8. 최적반응조건하에서 한천올리고당의 생산---------- 83
가. 고정화 효소의 반응 속도 상수---------- 83
나 고정화 효소 반응기---------- 83
다. PBR 반응기의 특성---------- 83
라. 기질의 농도 및 공급속도 변화에 따른 영향---------- 88
마. PBR 반응기의 운전 안정성---------- 88
바. 한천올리고당의 성분 분석---------- 88
사. 반응시간에 따른 생성 올리고당의 조성변화---------- 90
아. PBR을 이용한 한천올리고당의 생산---------- 90
9. 고농도기질 사용을 위한 한천 기질의 입방화---------- 90
가. 입방화 한천의 제조---------- 90

나. 입방화 한천겔 농도에 따른 영향---------- 94
다. 효소 농도에 따른 영향---------- 94
라. 반응산물의 분석---------- 94
마. 반응수율의 조사---------- 94
10. 한천올리고당 대량생산 프로세스 개발---------- 97
가. 한천올리고당의 경제성 검토---------- 97
나. 한천올리고당의 생산 공정---------- 97
다. 흐름도의 설계---------- 100
라. 한천올리고당의 생산---------- 100
마. 한천올리고당의 생산을 위한 공정설계---------- 100
바. 스케일 업에 대한 설계기준의 설정---------- 102

제 4 절 참고문헌---------- 105

제 3 장 한천올리고당의 수율향상 및 원가절감을 위한 신 공정법의 개발---------- 111

제 1 절 서 론---------- 111

제 2 절 재료 및 방법---------- 114
1. 재 료---------- 114
2. 한천올리고당의 제조---------- 114
가. 효소 분해법---------- 114
(1) 한천분해효소 생산 균주의 배지조성 및 배양조건---------- 114
(2) 한천분해효소의 분리---------- 114
(3) 한천분해효소를 이용한 한천올리고당의 제조---------- 114
나. 산 가수분해법---------- 114
(1) 산의 종류에 따른 한천올리고당의 제조---------- 114
(2) 초산을 이용한 한천올리고당의 최적생산조건 검토---------- 115

3. 한천올리고당의 분리 공정---------- 115
가. 반응물의 여과---------- 115
나. 한천올리고당의 회수---------- 116
(1) 동결건조에 의한 방법---------- 116
(2) 진공감압건조에 의한 방법---------- 116
4. 한천올리고당의 분석---------- 116
가. TLC에 의한 분석---------- 116
나. NMR에 의한 분석---------- 116
다. HPLC에 의한 분석---------- 116
라. 전당량 측정---------- 116
마. 환원당량 측정---------- 116
5. 초산 가수분해법을 이용한 한천올리고당의 생산 공정도---------- 117
6. 한천올리고당의 대량생산공정 개발---------- 117
가. 대량생산공정을 이용한 한천올리고당 생산---------- 117
나. 대량생산된 한천올리고당의 분석---------- 117
7. 한천올리고당의 항균활성 탐색---------- 119
가. 균주의 선정---------- 119
(1) 병원성 균주---------- 119
(2) 장내 유용 세균---------- 119
나. 균주의 배양특성---------- 119
(1) 병원성 균주의 배지 및 배양방법---------- 119
다. 장내 유용 세균의 배양조건 ---------- 119
(1) 배양배지---------- 119
(2) 배양방법---------- 119
라. 항균활성의 측정법 ---------- 120
마. 장내 유익세균 증식효과 측정---------- 120

제 3 절 결과 및 고찰---------- 122
1. 산의 종류에 따른 한천올리고당의 제조 ---------- 122
가. 강산 가수분해법에 의한 제조---------- 122

나. 약산 가수분해법에 의한 제조---------- 122
2. 효소 분해산물과 산 분해산물의 구성성분 비교---------- 122
3. 초산을 이용한 한천올리고당의 최적생산조건 검토---------- 123
가. 최적 기질 농도의 결정---------- 123
나. 최적 초산 농도의 결정---------- 123
다. 가열방법에 따른 한천올리고당의 제조법의 비교---------- 123
라. 기질 전처리 유무에 따른 비교 ---------- 123
4. 한천올리고당이 장내 세균에 미치는 영향 탐색---------- 129
가. 균주의 선정 ---------- 129
(1) 병원성 균주 ---------- 129
(2) 장내 유용 세균---------- 129
나. 병원성 균주의 배양조건---------- 129
(1) 배양배지 ---------- 129
(2) 배양방법 ---------- 129
다. 장내 유용 세균의 배양조건 ---------- 132
(1) 배양배지 ---------- 132
(2) 배양방법 ---------- 132
라. 장내 유해 세균에 대한 항균 활성 측정 ---------- 132
마. 장내 유익 세균 증식효과 측정 ---------- 137
5. 최적반응 프로세스 및 대량분리 공정법의 개발 ---------- 137
가. 중화에 따른 영향---------- 137
나. 진공감압건조에 의한 분리방법 ---------- 137
다. 동결건조에 의한 분리방법 ---------- 139
(1) 동결건조된 한천올리고당의 전당량 측정 ---------- 139
(2) NMR 분석 ---------- 139
6. 한천올리고당의 대량생산공정 개발---------- 139
가. 초산 가수분해법을 이용한 한천올리고당의 생산공정도---------- 139
나. 대량생산공정---------- 139
다. 생산된 한천올리고당의 분석---------- 139
7. 한천올리고당의 경제성 검토---------- 144

8. 스케일 업에 대한 설계기준 설정 ---------- 147

제 4 절 참고문헌 ---------- 148

제 4 장 한천올리고당 생산 파일럿의 제작 및 산업화 기술개발 ---------- 151

제 1 절 서 론 ---------- 151

제 2 절 재료 및 방법 ---------- 153

1. 한천분해효소를 이용한 한천올리고당 생산 프로세스의 검증 및 보완------ 153
2. 유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당 생산 프로세스의 검증 및 보완 ---------- 153
3. 프로세스의 설계 및 제작 ---------- 153
4. 시제품 생산 ---------- 153

제 3 절 결과 및 고찰 ---------- 153

1. 한천분해효소를 이용한 한천올리고당 생산 프로세스의 검증 보완 ------- 153
2. 유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당 생산 프로세스의 검증 및 보완 ---------- 154
3. 프로세스의 설계 및 제작---------- 154
4. 시제품 생산 ---------- 157
5. 향후 추진계획 ---------- 157

제 4 절 참고문헌 ---------- 162

해양수산부 해양수산중소·벤처기업기술개발지원사업 사업결과 보완사항 ---------- 163

제 1 장 서 론

제 1 절 연구의 현황

1. 연구의 현황

한천은 우리나라 해안 어디서나 쉽게 볼 수 있는 홍조류에서 추출되는 다당류로서 해마다 그 생산량이 약 3,600 ton(약 50억원 상당)에 이르고 있는 비교적 풍부한 수산자원의 하나라고 할 수 있다. 그러나, 실제 한천의 이용현황에 있어서는 전체 생산량의 약 6.5 %정도만이 단순가공처리되어 값싼 원료로 사용되어질 뿐, 대부분은 방치되어 환경오염을 야기시키고 있는 실정이며, 이러한 한천을 이용한 올리고당(oligosaccharides)은 단당이 glycoside결합에 의해 탈수축합된 중합도 2~10 (분자량은 300~2000가량)의 소당류에 대한 총칭이며, 구성당의 종류에 따라 크게 homooligosaccharides와 heterooligosaccharides로 구분된다. 특히, 한천올리고당 특성은 저칼로리성, 충치예방효과, 변비개선효과, 혈당치개선에 의한 당뇨병 예방, 장내유익세균 증식인자로 작용하는 정균작용, 장내유해세균의 증식억제를 통한 정장작용, 혈중콜레스테롤 및 혈압 감소작용, 뛰어난 항균활성, 암세포 증식억제 작용, 면역활성 증가작용, 항 돌연변이능 등의 기능성 이외에도 항산화기능등과 같은 인체의 건강을 유지하고 질병을 예방하는 기능과 보습력을 가지고 있어 건강보조식품, 의약보조제, 화장품 보습제, 식품 물성 개량제, 음료와 주류 첨가제 등으로 사용할 수 있다. 더욱이, 최근 들어 국민 식생활이 향상되고 건강에 대한 관심도가 증가됨에 따라 기능성 올리고당의 수요가 매년 증가하고 있으며, 새로운 기능성 올리고당의 신물질 개발 및 이를 이용한 다양한 제품개발에 관한 연구가 식품산업을 중심으로 활발히 진행되고 있다. 한천은 산·효소학적 가수분해에 의해 한천올리고당을 생성하게 되나, 산 가수분해의 경우 생성된 한천올리고당은 한천 고유의 비타민이나 무기질 등이 다량 파괴되어 올리고당의 기능성 및 안정성 유지등이 문제가 되어 한천올리고당의 생성을 위해서는 효소분해에 의한 방법이 보다 유용한 것으로 알려져 있다. 이러한, 한천가수분해효소는 각종 미생물로부터 생산되어지는데 이에 관한 연구는 *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp., *Cytophage* sp., *Actinomyces* sp. 등이 보고되어지고 있다. 이들 미생물들은 대부분이 육상유래 미생물로 이루어져 있으며, 일부 해양유래 미생물에 대해서 연구되어지고 있다. 하지만, 국내의 경우 해양미생물을 이용한 한천분해효소에 관한 연구는 현재까지 Kong 등, Kim 등, Lee 등에 의한 연구가 보고 되어지고 있을 뿐이다. 외국의 경우, 해조류를 이용한 올리고당의 생산에 관한 연구는 주로 일본을 중심으로 이루어져 왔다. 한천의 가수분해에 의해 얻어지는 neoagarooligosaccharide의 특성에 관해서 T. Kono 등은 전분노화의 억제 작용이 강하고, 난분해성으로 소화효소에 의해 분해되지 않으나 장내 유용 세균에 의해서 분해되며, 가열을 하면 정균작용을 나타내는 등 매우 유용한 물질이라고 보고하였다.

2. 연구의 목적

본 연구에서는 현재 값싸게 생산되는 한천을 이용하여 값비싼 생산물로 전환시켜 그 이용도 및 부가가치를 높이는데 그 목적을 두고 여러지역의 해양으로부터 한천분해능이 뛰어난 해양 미생물을 분리·동정, 최적배양조건, 분리·정제, 역가 및 생산성이 낮은 한천분해효소 생산균주를 생물공학적 기법을 이용한 균주개량을 통하여 개량함으로써 고 역가, 고 효율생산 공정 기술개발을 개발하고 고 기능성 한천올리고당을 대량생산할 수 있는 기초 자료를 확보하는데 그 목적이 있다.

제 2 절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

가. 미 이용 해양식량자원의 개발이 가능하고, 저가의 수산가공제품에 기능성을 부여함 으로써 고부가가치산업으로 전환이 가능하다.

나. 기능성 식품소재로서 크게 대두되고 있는 올리고당은 대부분이 외국의 연구에 의해 개발되어 있으며, 그 생산은 주로 녹말이나 당을 이용한 공정만이 실용화되어 있는 실정이다. 이에 비하여 한천과 같은 해조류를 이용한 기능성 올리고당의 개발은 현재 국내에서는 전무한 실정으로 새로운 기능을 지닌 해조류 유래 기능성 올리고당의 개발을 위한 국내 고유기술을 보유하게 된다.

다. 지금까지 전량 수입에 의존하고 있는 한천분해 효소에 대하여 보다 활성이 뛰어난 한천분해효소를 생산하는 새로운 균주를 찾아냄과 동시에 이들로 부터 생산된 한천분해효소의 분리·정제 기술과 균주개량을 통한 생산량 증대를 위해 고도의 생물공학적 기술 개발을 보유하게 된다.

라. 생물엔지니어링 분야에 있어서도 국내의 전문기술 인력이 부족하여 해외의 생산기술 판매회사 및 전문가의 자문을 활용하고 있다. 또한, 생물전환공정기술에 있어서도 새로운 균주의 개발 능력과 공정기술의 개발 능력이 외국에 비해 크게 낙후되어 있으며, 고효율, 저비용 생물공정 설계·제작기술을 개발할 경우, 국내 생물공학기술산업의 활성화를 꾀할 수 있다.

마. 올리고당을 대량생산하기 위한 제어 공정 시스템의 개발기술을 보유하게 된다.

2. 경제적 측면

가. 생물산업은 자본 집약적이고 노동집약적인 기존의 산업과는 달리 고부가가치를 창출하는 새로운 첨단산업으로, 각종 첨단 기술산업 중에서도 가장 높은 성장이 전망되고 있는 산업으로, 국내 수산생물자원의 부가가치를 높이게 함과 동시에 이들의 산업적 활용을 통한 경제적 효과를 높일 수 있다. 그리고, 해양생물공학 분야에 대한 국내기업의 참여를 유도로 고용창출의 효과를 나타낼 수 있다.

나. 한천올리고당의 새로운 기능성 및 그 이용성 탐색과 같은 국내 수산자원으로부터 고부가

가치 창출에 관한 일관된 연구는 현재까지는 거의 찾아볼 수 없는 실정으로 해양세균이 생산하는 한천분해효소를 이용하여 한천으로부터 기능성 올리고당의 생산에 관한 연구와 활성이 뛰어난 한천분해효소생산 균주를 해양으로부터 분리한 경우는 현재 국내에서는 본 연구자 등의 성과를 제외하면 전혀 이루어져 있지 않은 실정으로, 국내 수산자원의 고도이용이라는 측면에서 한천올리고당의 개발이 지닌 의의는 크다고 하겠다.

다. 한천과 같은 해조류는 바다라는 특수한 환경에 서식하므로 육상유래 생물과는 또 다른 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있을 것으로 추정되므로 한천올리고당이 지니는 생리활성의 검색은 새로운 기능성 소재로서의 산업화가 크게 기대된다. 또한 해조류와 같은 해양자원 이용의 다각화와 고부가가치를 비롯하여 농어민 소득증대 및 해양자원의 고도 활용화에 기여할 것으로 기대된다.

라. 한천올리고당은 고 기능성 건강보조식품과 식품의 물성개선제, 제약, 화장품 산업 등에 적용이 가능하여 관련 산업분야의 활성화를 가져 올 것이다. 또한, 한천올리고당을 이용한 새로운 기능성 식품소재로서 그 수요가 크게 기대된다.

마. 우리 국민의 식생활이 다양화되고 소득 수준이 향상됨에 따라 건강에 대한국민의 의식 수준이 높아져서, 기능성 식품의 수요가 급증하는 추세에 있으며, 기능성 식품의 품목당 수천억원대의 시장성을 가지고 있다. 이미 세계 각국에서는 생물공학적 기법을 이용한 해양생물자원의 개발에 의해 매년 수 십억에서 수 백억 달러에 이를 만큼의 시장 규모를 지니고 있어 경제에 크게 기여하고 있다. 따라서, 한천을 소재로 기능성 식품을 개발함으로써 해조류와 같은 수산자원 이용의 다각화와 고부가가치화를 비롯하여 농어민 소득 증대 및 수산자원의 고도 활용화에 기여할 것이라고 생각한다.

3. 사회 · 문화적 측면

가. 본 연구과제와 같은 생물산업은 새로운 수요가 계속 창출되는 선진국 간에 경쟁이 치열한 첨단 미래 산업으로, 국가 경쟁력을 갖추기 위해서는 비교적 풍부한 국내의 수·해양 생물자원의 개발에 대한 정부의 적극적인 기술개발 투자가 기대된다.

나. 국산 해조류의 과학적 해석으로 새로운 기능성을 밝힘으로써 우리 해조류에 대한 국민의 인식을 새롭게 함과 동시에 건전한 식문화 형성에 기여한다.

다. 현재까지의 국내 수산생물자원의 이용은 주로 천연상태의 자원을 채취, 획득하여 이를 원료상태 혹은 단순 가공공정을 통한 제품으로 판매하고 있는 것이 대부분인 실정이다. 그러나, 최근 급속히 진행되고 있는 수산자원의 고갈은 지금까지의 방법에 의한 수산자원의 이용한계성을 뚜렷이 나타내어 주고 있다. 뿐만 아니라, 세계적으로 UR정책 실시로 말미암아 비교적 천연자원이 부족한 우리나라의 실정을 고려하여 볼 때 종래의 방법에 의한 수산자원의 생산과 이용은 더 이상 국제사회에서의 경쟁력을 기대할 수 없다. 따라서 이상과 같은 국내외 상황에 대처하기 위해서는 본 개발품과 같이 분자생물학, 유전공학, 생물공학적 기법 등의 High Technology를 이용한 수산생물자원으로부터의 기능성 물질 개

발 및 산업적 응용을 통하여 수산자원의 부가가치 향상을 위한 연구가 활발히 이루어져야 한다. 또한 이에 대한 국내 기술 개발 의욕의 향상을 위한 정부의 집중 투자가 바람직하다.

라. 한천올리고당의 생리활성 기능의 규명과 이의 이용을 통해 국민의 성인병을 예방하는 등 국민건강증진에 크게 기여하게 되며, 이는 질병 치료에 대한 국가의 경제적 부담을 줄이게 되고 또 다른 복지행정에 기여할 수 있다.

마. 한천올리고당은 이러한 문제를 해결할 수 있는 하나의 대안으로 사료되며 평소 우리 국민이 해조류의 섭취를 선호하는 까닭에 이를 소재로한 기능성 식품소재에 대한 선호도 상당히 높을 것으로 사료된다.

제 3 절 국내·외 기술 현황

1. 국내의 기술 현황

1987년 프락토올리고당이 생산된 이래 올리고당은 현재 수 십여 개의 회사가 프락토올리고당, 이소말토올리고당, 말토올리고당, 갈락토올리고당, 키토올리고당 등 수 종류의 올리고당을 생산하고 있다. 한편, 한천으로부터 효소분해에 의해 생성되는 한천올리고당의 기능성에 착안하여, 생물공학적 기법을 이용한 한천분해효소 생산균주의 개량과 효소의 고정화를 통한 기능성올리고당의 대량생산공정 개발, 그리고, 한천올리고당의 새로운 기능성 및 그 이용성 탐색과 같은 국내 수산자원으로부터 고부가가치 창출에 관한 일관된 연구는 현재까지는 거의 찾아볼 수 없는 실정으로 지금까지 개발된 국내 관련 기술의 현황과 문제점을 비교 검토하여보면 다음과 같다.

해양세균이 생산하는 한천분해효소를 이용하여 한천으로부터 기능성 올리고당의 생산에 관한 연구와 활성이 뛰어난 한천분해효소 생산 균주를 해양으로부터 분리한 경우는 현재 국내에서는 본 연구자 등의 성과를 제외하면 전혀 이루어져 있지 않은 실정으로, 국내 수산자원의 고도이용이라는 측면에서 한천올리고당의 개발이 지닌 의의는 크다고 하겠다.

올리고당의 생산에 대한 기술은 앞에서 살펴본 바와 같이 몇 개의 기업이 기술력을 갖추고는 있으나 제품의 균일성 및 기능성에 관한 설득력이 있는 연구는 아직 미흡한 상태이다. 일부에서는 올리고당을 일본 등지에서 수입하고 있으며 이를 이용한 제품 개발이 대부분이고, 그 기능성에 관해서도 불분명한 점이 많이 있다고 하겠다.

생물엔지니어링 분야에 있어서도 국내의 전문기술 인력이 부족하여 해외의 생산기술 판매회사 및 전문가의 자문을 활용하고 있으며, 특히 소프트웨어 등의 국내 개발은 전무한 실정이다. 또한, 생물전환공정기술에 있어서도 새로운 균주의 개발 능력과 공정기술의 개발능력이 외국에 비해 크게 낙후되어 있다.

2. 국외의 기술 현황

외국의 경우, 해조류를 이용한 올리고당의 생산에 관한 연구는 주로 일본을 중심으로 이루어져 왔다. 한천의 가수분해에 의해 얻어지는 neoagaro 올리고당의 특성에 관해 T. Kono 등은 매우 유용한 물질이라고 보고하였으며, 이로 말미암아 최근 일본에서는 agar를 분해하는 효소의 개발을 목적으로 활발한 연구를 진행하고 있다. Agar 분해 세균에 관한 연구는 1902년에 H.H. Gram에 의해서 보고된 것이 처음이다. 1950년대 Agar 분해세균과 효소에 대해, 그리고 agar의 구조연구, 홍조의 분류학적 연구, 변패방지 연구를 시작으로 활발히 진행되면서 현재까지 이르고 있다. W. Yaphe 등은 *Pseudomonas atlantica*로 부터 3 종류의 다른 agar분해효소를 발견하고 보고하였다. T. Araki 등은 *Pseudomonas gyotensis*로 부터 neoagarobiose를 생산해 내는 agar 분해효소를 발견하였으며 *Vibrio* sp.에서도 유사한 agar 분해효소를 분리해 낸 바가 있다. 특히 일본에서의 연구발표 내용은 질적·양적 차원에서 전세계 다른 모든 나라의 합과 동등한 정도이다. 대체적으로 bacteria, actinomycetes등에서 발견되었다는 보고도 있으나 *Pseudomonas* sp.에서의 연구가 특히 많이 되어 있다. 더 나아가 *Streptomyces coelicolor* 등의 미생물에서 agarase gene을 cloning하여 DNA 염기배열, amino acid sequencing을 모두 마친 경우도 있다. 이들이 보고한 agar 분해효소는 크게 β-agarase, neoagarotetrose hydrolase, neoagarobiose hydrolase로 나눌 수 있다. β-agarase는 처음 agarose에 효소작용을 시작하는 enzyme으로써 neoagarohexose나 neoagarotetrose(O-3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl(1→3)-O-β-D-galacto-pyranosyl(1→4)-O-3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl(1→3)-D-galactose)를 주생산물로 생성한다. Neoagarotetrose는 neoagarotetrose hydrolase의 작용에 의해서 중앙에 위치하는 β-linkage에 절단이 일어나 neoag-arobiose(O-3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl(1→3)-D-galactose)로 변환된다. 이렇게 분해되어 여러가지의 기능을 갖게되는 oligo당은 기능성의 소재로써 사용되어지며, 생산된 여러가지의 효소로부터 polymer인 한천을 목적에 맞는 크기의 한천으로 가공할 수 있는 것이다.

1995년, 일본의 Sugano등은 해양의 *Vibrio*속으로부터 β-agarase를 분리하여 활성을 높이는 방법에 대하여 발표하였으며 특히 이 효소는 neoagarotetrose와neoagarobiose를 생산하였고, alginate 및 carageenan등은 분해하지 않고 한천만을 분해하는 좋은 균을 동정하여 agarase생산을 진일보 시킨 것으로 판단되나 균주가 독성을 갖고 있어 실용화에는 시간이 걸릴 것으로 판단된다.

또한, 해조류로부터 올리고당의 대량생산 및 그 생리활성에 관한 연구는 일본의 Takara사가 약산 가수분해물을 중심으로 진행되고 있으며, 상당한 정보를 축적하고 있으며, 현재 한천올리고당을 이용한 미용에 좋은 항 산화성 한천올리고당을 음료를 개발하여 시판중에 있다. 그 외의 국가에서는 해조류의 섭식을 별로 선호하지 않거나 기술수준이 취약하여 해조류 유래 올리고당에 관한 연구는 별로 보고된 바가 없다.

제 4 절 연구목표 및 범위

1. 1차년도의 연구목표

- 유전자 조작을 통한 균주 개발 및 안정성 검토
- 한천분해효소의 대량생산을 위한 최적배양조건 검토
- 한천분해효소의 대량생산을 위한 공정 개발
- 한천올리고당 생산을 위한 효소 반응기 개발
- 한천분해효소에 의해 생산된 올리고당의 경제성 검토
- 한천분해효소를 이용한 한천올리고당 대량생산 process의 개발

2. 2차년도의 연구목표

- 유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당의 분석
- 반응조건 검토
- 최적반응기 선정 및 process의 개발
- 대량분리 공정법 개발
- 반응기 제작 및 한천올리고당 생산조건 검토
- 반응기 수율 검증 및 경제성 검토

3. 3차년도의 연구목표

- 한천분해효소를 이용한 한천올리고당 생산 process의 검증 및 보완
- 유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당 생산 process의 검증 및 보완
- Process의 설계 및 제작
- 시제품 생산

4. 연구진도표

가. 1차년도 연구진도표

연구내용	월 단 위 추 진 계 획												연구진척 상황(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○유전자 조작을 통한 균주 개발	—	—	—	—	—	—							100
○한천분해효소의 대량생산을 위한 최적배양 조건 검토						—	—	—					100
○한천분해효소의 대량생산을 위한 공정 개발								—	—	—	—		100
○한천올리고당 생산을 위한 효소 반응기 개발							—	—	—				100
○한천분해효소에 의해 생산된 올리고당의 경제성 검토								—	—	—			100
○한천분해효소를 이용한 한천올리고당 대량생산 process의 개발										—	—	—	100

나. 2차년도 연구진도표

연구내용 및 범위	월 단 위 추 진 계 획												연구진척 상황(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당의 분석	—	—	—	—	—	—	—	—					100
○반응조건 검토				—	—	—	—	—					100
○한천올리고당의 항균활성 및 장내 유용세균 증식효과 탐색							—	—	—	—	—		100
○최적반응기 선정 및 process의 개발						—	—	—	—				100
○대량분리 공정법 개발						—	—	—	—				100
○반응기 제작 및 한천올리고당 생산조건 검토	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	100
○반응기 수율 검증 및 경제성 검토							—	—	—	—	—	—	100
비 고													100

다. 3차년도 연구진도표

연구내용 및 범위	월 단 위 추 진 계 획												연구진척 상황(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
○ 한천분해효소를 이용한 한천올리고당 생산 process 의 검증 및 보완													100
○ 유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당 생산 process의 검증 및 보완													100
○ Process의 설계 및 제작													100
○ 시제품 생산													100
비 고													100

제 2 장 생물공학적 기법을 이용한 한천분해효소 고 생산능을 이용한 한천분해효소 고 생산능을 지닌 변이균주의 개발

제 1 절 서 론

한천올리고당을 기능성 있는 식품첨가소재나 의약품 제제로 개발하기 위해서는 무엇보다도 한천올리고당의 대량생산이 필수적이나, 이러한 과정에는 공업적으로 사용 가능한 한천분해효소의 확보, 기질(원료)로 사용되는 한천 고유의 높은 점도 극복, 효율 높은 agarase의 확보 등의 문제가 제시되고 있다. 일반적으로 해양에서 분리된 미생물이 생산하는 효소만으로는 한천올리고당을 대량으로 생산해 낼 수 없으므로 고 효율의 agarase의 확보가 여전한 과제로 남아있었다. 그러므로 본 연구에서는 agarase를 생산하는 미생물, *Bacillus cereus*를 개량하여 agarase의 생산성 향상을 시도하고자 하였다. 균주 개량법으로 널리 사용되고 있는 돌연변이법과 cloning에 의한 형질전환법을 이용하여 agarase 고 생산성 균주 개발을 유도하였다.

현재 돌연변이원으로는 미생물에 대하여는 자외선(ultraviolte light), MNNG (1-methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidine), 효모 등 진균류에는 EMS(ethyl methane sulfonate) 등이 가장 널리 사용되고 있다. 이 중 자외선을 이용한 방법은 처리방법이 간단하다는 장점을 지니고 있으나, 돌연변이 유발 확율이 낮을 뿐만 아니라 본래의 성질인 야생형으로 되돌아가는 돌연변이 회복율이 높은 것이 단점이다. 이에 반해 MNNG나 EMS는 인체에 유독한 시약이라는 단점은 있으나 매우 강력한 돌연변이를 유발시켜, 변형된 성질을 지속성 있게 유지시키며 효소생산에 대해서도 안정성이 높은 것으로 알려져 있다.

효소의 대량생산을 위한 또다른 방법으로 효소의 gene을 cloning하여 대량발현 시스템에서 발현량을 조절하여 효소를 얻어내는 방법도 많이 시도되고 있다.

본 연구에서는 agarase의 대량생산을 목적으로, 분자유전학적 기법을 이용하여 첫 번째, agarase 생산 균주 *Bacillus cereus* ASK202를 돌연변이 시켜서 agarase 고 생산성 돌연변이체를 제조하고, 돌연변이체가 생산하는 agarase를 분리·정제하여 그 특성을 연구하였다. 그리고 두 번째로, *Bacillus cereus* ASK202로부터 agarase gene을 cloning하여 *E. coli*에서의 대량발현 시스템을 이용하여 agarase의 대량생산을 시도하고 생산된 agarase의 특성을 연구하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 돌연변이 유발에 의한 agarase 고 생산성 균주의 개발

가. 돌연변이 균주의 선별

각각의 조건에서 돌연변이를 유발시킨 후 균체를 회수하여 새 배지를 첨가해서, 진탕배양한 후 고체배지에 도말하여 25℃에서 2일간 배양한다. 먼저, 균체 사멸율이 99% 이상인 시간을 측정하고, 그 조건에서 계속적으로 농축배양의 방법으로 돌연변이를 유발시킨다. 형성된 colony를 무작위로 선별하여 멸균된 백금이로 새 고체배지에 옮긴 후 형성되는 colony 크기를 비교하여 생산성이 높은 균주를 1차 선별, 선별된 균주를 액체 배양하여 한천분해효소 생산능을 측정하며, 활성이 높고 안정성이 뛰어난 균주를 2차 선별한다. 선별된 균주를 5회 이상의 계대배양을 거치면서 획득된 한천분해효소 고생산능에 대한 안정성을 살펴, 이 균주의 발현 안정성에 대해 검토한다.

나. 최적배양조건

선발된 균주, *Bacillus cereus* ASK202-M7의 최적배양배지인 pH 7.8, NaCl 농도 3.0 %(w/v), agar 농도 0.5 %(w/v), yeast extract 0.3 %(w/v)가 함유된 변형해수배지에 균을 접종하여 25℃에서 배양하며 대량생산을 하기위한 기초자료로서 다당류의 균주생산에 영향을 주는 요소, 즉 탄소원, 질소원, 인, 금속이온등을 이용 검토함으로써 균주생산특성, 생산성 등을 검토하였다.

다. 효소의 분리 및 정제

균배양액으로부터 생산된 agarase를 정제하기 위해서 배양액을 10,000×g 에서 10분간 원심분리하여, 균체와 분리된 상층액을 동결건조하였다. 동결건조된 단백질은 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.8를 이용하여 24시간 투석을 행하였으며 투석된 조효소액에 대해서 이온 크로마토그래피를 행하였다. DEAE Sepharose CL-6B matrix를 column에 충진하여 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8로 충분히 세척한 후 농축 조효소액을 흡착한 후 0.0-1.0 M NaCl 용액을 이용하여 효소를 용출시킨다. 용출된 효소액은 각각 모아 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8 완충액에서 투석한다. 투석한 효소는 동결건조한 후, 동결건조된 효소를 50 mM NaCl이 포함된 동일 완충용액에 녹이고 HPLC (High Performance Liquid Chromato- graphy, Pharmacia, Sweden)를 사용하여 Superose 6HR 10/30 column으로 정제하였다. 각 획분의 단백질량은 흡광도 A280 nm에서 측정하였고, 효소활성은 Somogyi-Nelson method에 의해서 측정하였다. 그리고, 정제된 효소는 SDS-PAGE (12% gel)에서 분자량을 조사하였다.

라. Agarase의 효소학적 특성조사

(1) 최적온도 및 안정성

효소활성의 최적온도는 정제된 효소 (0.25 unit/ml) 용액을 0.1%의 agarose 용액 1.3 ml에 첨가하여 30~50℃ 까지 온도를 변화시키면서 40분간 반응시킨 다음 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하였다. 온도 안정성은 효소용액을 각 온도에서 일정한 시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 측정함으로써 확인하였다.

(2) 최적 pH 및 안정성

기질을 포함하는 서로 다른 pH의 완충용액에 정제된 효소를 첨가하여 40℃에서 40분간 반응시킨 후 효소활성에 미치는 pH의 영향을 측정하였다. 또한, 서로 다른 pH의 완충 용액에 0.1 % agarose를 녹인 기질용액 1.3 ㎖에 정제된 효소(0.25 unit/ml) 용액을 첨가하여 일정시간 방치한 후 잔존효소의 활성을 측정함으로써 그 안정성을 확인하였다.

(3) 기질의 특이성

BagM7의 기질 특이성을 알아보기 위해 다양한 polysaccharides를 기질로 하여 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.6에서 효소 반응을 실행하였다.

(4) 정제된 효소의 k_m 및 V_{max}

정제된 BagM7에 대한 agarose의 기질 친화력을 측정한 결과를 Lineweaver-Burk plot로 나타내었다.

(5) Detergent의 영향

효소활성에 대한 detergent의 영향을 조사하기 위해서 각종 detergent를 1 %(v/v)가 되도록 효소액에 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

(6) 저해제의 영향

Agarase의 활성 중심에 관여하는 아미노산을 확인하기 위하여 여러 가지 chemical의 최종 농도가 0.5mM, 1.0 mM, 5 mM, 10 mM이 되게 저해제를 효소용액에 첨가하여 30℃에서 30분간 반응시킨 후 그 잔존활성을 측정하였다.

효소 저해제로는 cysteine을 수식시키는 저해제인 3-Iodoacetic acid, NEM (N-ethylmaleimide)와 serine 잔기를 수식하는 TLCK (N-α-p-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone), TPCK (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), Antipain hydrochloride, PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride)를 사용하였다. Metallo 저해제로 작용하는 1,10-phenanthroline 과 aspartic acid 잔기를 수식하는 pepstain A, cysteine, serine을 공동으로 수식하는 leupeptin를 사용하였다.

(7) 금속이온의 영향

금속이온은 효소반응에 있어서 상승작용 또는 저해작용를 유발하는 인자가 될 수 있으므로 효소에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 1 mM 농도로 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.6에 녹인 다음 효소를 첨가하여 30℃에서 30분간을 방치한 후 금속이온들이 agarase 활성에 미치는 영향을 잔존 효소활성을 조사하여 측정하였다.

(8) Chemical의 영향

효소활성에 대한 chemical의 영향을 알아보기 위하여 각종 chemical을 최종 농도가 1mM이 되도록 효소용액에 첨가하여 30℃, 30분 동안 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다.

(9) 환원제의 영향

효소활성에 대한 환원제의 영향을 알아보기 위하여 각종 환원제를 5mM이 되도록 첨가한 후 30℃에서 30분간 동안 방치하여 잔존활성을 측정하였다.

(10) 아미노산 조성의 분석

효소 단백질을 110℃에서 24시간 동안 6 N HCl 용액에서 산 가수분해를 한 후 Pico-Tag Free Amino Acid analysis column을 사용하여 아미노산 분석을 행하였다. 효소 단백질을 구성하는 아미노산 수는 효소의 분자량을 기준으로 하여 각 아미노산 peak 면적비로부터 계산하였다.

(11) TLC를 이용한 한천올리고당의 분석

생성된 올리고당에 대해서 박층크로마토그래피(Thin-layer chromatography, TLC)를 이용하여 분석하였다. 이때 사용한 전개판은 Merck사의 Kieselgel 60 plate를 사용하였으며, 전개용매는 n-butanol, acetic acid, water를 2:1:1의 부피비로 섞어 사용하였다. 전개판은 ethanolic sulphuric acid (375 ml of ethanol plus 100 ml of conc. sulphuric acid) 시약을 처리하여 건조시킨 후, 에탄올에 녹인 0.2 %(w/v) naphthoresorcinol solution을 도포한 후 110℃에서 10분간 가열한 후 발색된 한천올리고당 생성을 확인하였다.

2. Gene cloning을 이용한 agarase 고 생산 균주의 개발

Agarase의 고생산성 균주를 개발함에 있어 돌연변이 유발에 의한 agarase 고생산 균주의 선별과 동시에 원균주 *Bacillus cereus* ASK202의 agarase gene을 cloning하여 *E. coli*에서 발현시키는 실험을 행하였다.

가. *E. coli*에서의 agarase 고 발현

재조합 plasmid 제작에 사용된 pUC19 vector로는 agarase의 대량 생산을 유도할 수 없었으므

로 PCR을 이용하여 pBA41에서 agarase 만을 coding하고 있는 open reading frame 2.3kb를 증폭하여 강력한 T7 promoter를 갖는 pET28a(+)를 이용하여 *E. coli*에서 고발현 실험을 수행하였다.

나. T7 promoter를 이용한 agarase의 고 발현 및 효소학적 특성 조사

숙주세포로 T7 RNA polymerase를 가지고 있는 *E. coli* BL21(DE3)에 새로이 제조한 발현벡터 pEBA1을 transformation 시켰다.

3. *E. coli*에서의 agarase 고 발현

재조합 plasmid 제작에 사용된 pUC19 vector로는 agarase의 대량 생산을 유도할 수 없었으므로 PCR을 이용하여 pBA41에서 agarase 만을 coding하고 있는 open reading frame 2.3kb를 증폭하여 강력한 T7 promoter를 갖는 pET28a(+)를 이용하여 *E. coli*에서 고 발현 실험을 수행하였다.

4. T7 promoter를 이용한 agarase의 고 발현 및 효소학적 특성 조사

숙주세포로 T7 RNA polymerase를 가지고 있는 *E. coli* BL21(DE3)에 새로이 제조한 발현벡터 pEBA1을 transformation 시켰다.

5. 한천분해효소 대량생산을 위한 공정 개발

발효 생성물의 회수와 분리·정제는 어떤 상업적인 공정에서도 필수적이다. 하지만, 이러한 분리 · 정제단계는 순도를 높이기 위해서 많은 공정을 단계를 필요로 한다. 발효생산물의 분리와 정제에 차지하는 비용은 전체 제조비용 중 20 - 60 %를 차지하므로 어떤 경우에는 제조비용에 있어서 생성물 생산보다 더 많은 비용이 든다. 저비용, 고수율을 위해서는 공정장치의 선택이 중요하다.

따라서, 본 연구실에서는 앞의 결과에서 한천분해효소 생산 효율이 높아진 균주(*Bacillus cereus* ASK202-M7, *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1)을 이용하여 한천분해효소를 대량생산, 분리·정제하는 공정을 계획하였으며, 실험실 수준의 발효조인 50L Jar fermentor를 이용하여 한천분해효소 생산 균주의 배양결과를 기초로 하여 얻을 수 있는 한천분해효소 대량생산 공정을 개발하고자 한다.

6. 한천올리고당 생산을 위한 효소 반응기 개발

본 연구에서는 기능성 한천올리고당의 생산성 증대를 위한 하나의 방법으로 한천분해효소의 고정화를 시도하고 고정화 한천분해효소의 반응 특성에 관하여 조사하였다. 또한, 기능성 한천올리고당의 연속 생산을 위해 고정화된 한천분해효소에 적합한 효소반응기를 제작, 운영하고 그 반응성을 조사하여, 기능성 한천올리고당의 대량생산을 위한 기초자료를 제시하였다.

7. 최적반응조건하에서 한천올리고당의 생산

한천올리고당의 대량생산 공정은 기본적으로 기질로 쓰이는 한천의 액화공정, 반응기내에서 고정화된 한천분해효소인 Agarase에 의한 당화공정, 반응기에서 생산된 한천올리고당을 농축하는 농축공정, 생산된 올리고당의 탈염, 탈색공정으로 구성된다. 본 연구팀은 이러한 공정을 가지고 한천올리고당을 생산하는데 있어 각 공정의 운전 조건과 공정의 효율을 높이기 위한 최적 생산공정 방안을 개발하고자 하였다.

8. 고농도기질 사용을 위한 한천 기질의 입방화

일반적인 방법으로 기질인 한천을 용해시켜 효소와의 반응을 행할 시, 한천의 겔 형성능과 고점도는 효소의 활성을 억제시키고, 고농도 반응물을 얻고자 함에 있어 가장 큰 문제점으로 지적된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 고농도 한천기질을 제조하여 실행해보았다.

9. 한천올리고당 대량생산의 process 개발

한천올리고당을 산업적 규모에서 사용하기 위해서는 대량생산이 필요하다. 한천올리고당을 대량생산 하기위해 lab scale 실험결과를 기초로 하여 이를 실용화 할 수 있도록 30L의 생물반응기 pilot-plant 공정을 설계하여, 경제성을 검토하고자 하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 돌연변이 유발에 의한 agarase 고 생산성 균주의 개발

가. 돌연변이주의 선별

원균주 *Bacillus cereus* ASK202에 대해 자외선과 MNNG를 처리하거나 ampicillin 처리된 농축 배양에서 고체배지상 colony가 크게 나타나는 균주를 1차적으로 선별한 다음, 선별된 균주를 각기 시험관에서 액체배양하며 효소생산량을 비교하여 2차적으로 돌연변이주를 선별하였다. 균체사멸율과 agarase 생산능의 향상 정도를 비교해 보면, 사멸율이 95%에서 99%로 증가하는 동안 1차 선별 균주 수는 각 조건에서 평균 120% 가량 증가했으며, 높은 사멸율의 조건에서 선별된 균주가 더 높은 변성 즉, agarase 생산능의 향상 정도가 더 뛰어난 것으로 판명되었다. 또한 농축배양의 경우에 있어 agarase 생산능이 더 높은 균주를 선별할 수 있었다.

본 실험에서는 MNNG 처리에 의해 선발된 MNNG-7번 균주를 최종적으로 선택하여 원균주의 이름을 따 *Bacillus cereus* ASK202-M7으로 명명하였으며, 선별된 균주의 agarase 생산을 위한 최적배양조건을 살펴보았다.

나. 최적배양조건

선발된 균주, *Bacillus cereus* ASK202-M7의 최적배양배지인 pH 7.8, NaCl 농도 3.0 %(w/v), agar 농도 0.5 %(w/v), yeast extract 0.3 %(w/v)가 함유된 변형해수배지에 균을 접종하여 25℃에서 배양하며 시간 경과별로 균체성장, 단백질량 및 효소생산능을 측정하였다 (Fig. 1). 단백질량은 균체량이 증가하기 시작하는 12시간 경과 후부터 증가하기 시작하여 대수증식기가 끝나고 2시간 정도 경과한 후 최대치에 도달하다가 이후 감소되었으며, 효소생산능은 대수증식기 초기부터 서서히 증가하기 시작하여 36시간 경과 후 최고치에 도달하는 것으로 나타났다. 단백질 생산량은 원균주와 비교해 볼 때, 최고 생산량이 0.3㎎/㎖으로 0.2㎎/㎖였던 원균주에 비해 1.5배 가량 증가한 것으로 나타났으며 agarase는 대수증식기 초기부터 생산되어져 원균주보다 생산시기가 앞당겨진 것으로 나타났다. 이 최적조건하에서의 agarase 생산량은 원균주보다 약 8.7배 증가된 1450units/ℓ로 agarase 생산능이 뛰어난 것으로 나타나 본 효소를 이용한 여러 가지 응용 분야에 대해 큰 파급효과가 있을 것으로 사료되어진다.

다. 효소의 분리 및 정제

균배양액으로부터 생산된 agarase를 정제하기 위해서 배양액을 10,000×g 에서 10분간 원심분리하여, 균체와 분리된 상층액을 동결건조하였다. 동결건조된 단백질은 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.8를 이용하여 24시간 투석을 행하였으며 투석된 조효소액에 대해서 이온 크로마토그래피를 행하였다. DEAE Sepharose CL-6B matrix를 column에 충진하여 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8로 충분히 세척한 후 농축 조효소액을 흡착시키고 0.5 ㎖/ml 의 속도로 동일한 완충용액을 sample의 3배 흘려보내 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 0.0-1.0 M NaCl 용액을 이용하여 효소를 분리하였다 (Fig. 2). 그 결과 0.21 M(fraction # 221-237)과 0.56 M(fraction # (310~325)의 NaCl 농도 부근에서 agarase 활성을 지닌 두 개의 protein peak가 용출되어, 용출된 효소액을 각각 모아 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8 완충액에서 투석을 행하였다. 0.21 M NaCl 부근에서 나온 peak를 Ⅰ이라 하고, 0.56 M NaCl 부근에서 용출된 peak를 Ⅱ라 명명하고, 각각에 대해 투석한 효소를 동결건조한 후, 동결건조된 효소를 50 mM NaCl이 포함된 동일 완충용액에 녹이고 HPLC (High Performance Liquid Chromato-graphy, Pharmacia, Sweden)를 사용하여 Superose 6HR 10/30 column으로 정제하였다. HPLC 정제 단계에서 peak Ⅰ에서는 활성을 가지는 뚜렷한 단백질 peak를 구별해 낼 수 없었으나, Ⅱ에서는 agarase 활성을 가지는 단일 peak를 얻을 수 있었다.

이 단백질을 농축하여 SDS-PAGE (12% gel)을 실시한 결과, 약 41,000 Da 위치에서 단일 단백질 band를 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

Bacillus cereus ASK202-M7이 생산하는 agarase의 정제단계는 Table 1에 나타내었다. 수율은 14.8 % 였으며, 정제도는 20.69배 정도 증가하여, 최종적으로 6 units/㎎의 specific activity를 지닌 정제된 agarase을 얻을 수 있었다. 이 agarase를 BagM7라 명명하였다.

라. SDS-PAGE를 이용한 효소활성 측정

SDS-PAGE 겔 상에서 분리·정제된 agarase의 효소활성을 측정하기 위하여 변형된 SDS-PGAE를 실시하였다. 겔은 SDS를 넣고 일반적인 방법으로 제조하고, 정제한 시료 5×sample buffer를 첨가한 뒤 열을 가하지 않고 그대로 SDS-PAGE를 실시한 후, 겔을 증류수에 세척하고 petri dish에 평평하게 편 후 0.8% agar로 overlay하여 12시간 동안 40℃에서 반응 시켰다. Agarase에 의해 분해된 agar는 iodine과 결합할 수 없어 갈색을 나타내지 않고 투명하거나 노란색으로 나타나는 성질을 이용하여 이 plate에 iodine 용액을 부어보면 agarase 활성이 있는 단백질 부근의 겔은 염색되지 않는 것으로 나타났다. 두 lane을 한꺼번에 전기영동하여 한 lane은 commasie brillient blue로 염색하고, 한 lane은 petri dish에서 효소반응시킨 후 두 gel을 서로 겹쳐서 확인해 본 결과, 분리·정제된 단일 band와 효소활성이 나타난 환이 서로 겹쳐지는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

원균주 *Bacillus cereus* ASK202로부터 동일 방법으로 분리·정제된 agarase, 90,000 daltons 크기와 비교할 때 절반 이하의 크기의 agarase가 분리·정제되었다. 원균주가 생산하는agarase를 SDS-PAGE 하였을때, subunit로 구성되지 않은 것으로 나타났으므로, 90,000 daltons 의 일부분이 떨어져서 작은 크기의 agarase가 생산되어졌다고는 사료되지 않고, 원 균주가 한 가지 이상의 agarase를 생산해 내고 있었으며, 돌연변이 처리에 의해 주로 생산되는 agarase의 종류가 변화된 것으로 추측해 볼 수 있었다. Sugano 등의 보고에 의하면 *Pseudomonas* sp.는 질소원의 종류에 따라 주로 생산하는 agarase의 종류가 달라진다고 보고하였고, Yaphe 등의 연구결과에 의하면 *Pseudomonas* 등의 균주도 3가지 이상의 agarase를 생산하고 있다고 보고하고 있으므로, 본 균주 *Bacillus cereus* ASK202도 두 가지 이상의 agarase를 생산하며, 돌연변이 유발에 의해 주로 생산되는 agarase의 종류가 변화되었다고 추측해 볼 수 있다.

이후의 실험에서는 분리·정제된 효소의 효소학적 특성을 조사하여 원균주에서 주로 생산 되었던 agarase와 비교 검토하였다.

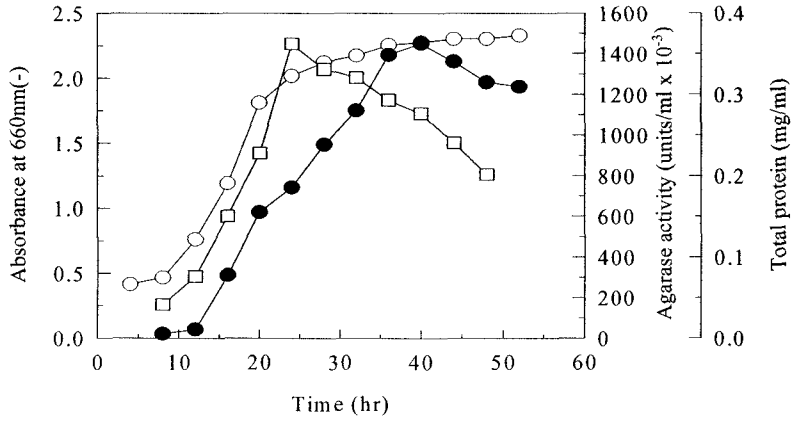


Fig. 1. Time course on the agarase production by *Bacillus cereus* ASK202-M7 (pH 7.8, 25°C and 180 rpm).

—○— Cell growth
—●— Agarase activity
—□— Total protein

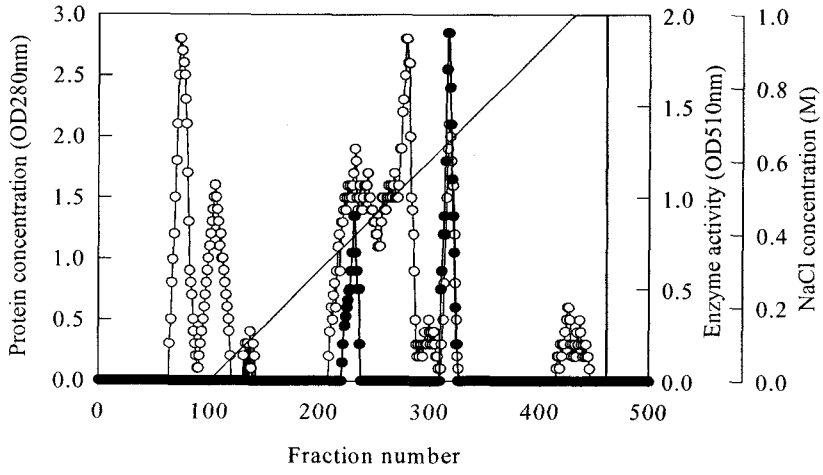


Fig. 2. Chromatogram of DEAE Sepharose CL-6B column chromatography. The column (50X250mm) was equilibrated with 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.8. The enzyme was eluted with a linear gradient of 0 - 1 M NaCl and every fractions were collected.

—○— Protein concentration
—●— Enzyme activity
——— NaCl concentration

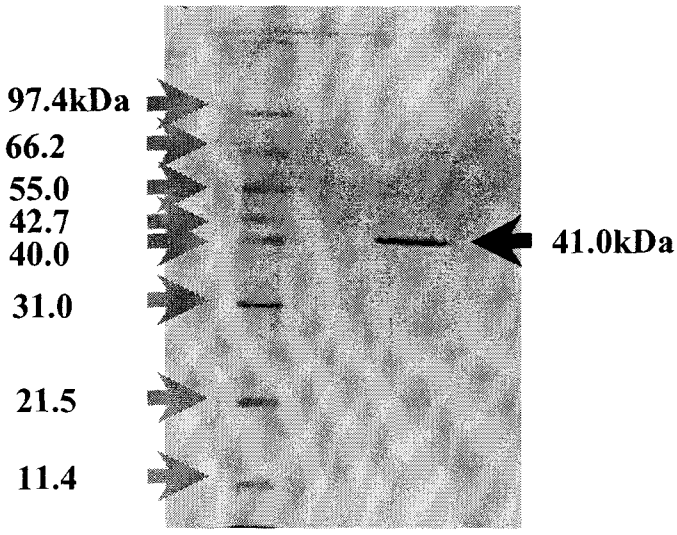


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified agarase from *Bacillus cereus* ASK202-M7.

Table 1. Summary of the purification steps of agarase from the culture supernatant of *Bacillus cereus* ASK202-M7 (BagM7).

Purification step	Total activity (U)	Total protein (㎎)	Specific activity (U/㎎)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	1450	2,900	0.50	100.0	1.00
Dialyzed sample	988	1,200	0.82	62.2	1.52
DEAE Sepharose CL-6B					
Peak I	20	242	0.09	1.4	0.17
Peak II	504	250	2.02	34.8	4.07
Superose 6 HR 10/30 (HPLC) (BagM7)	215	21	10.24	14.8	20.69

Fig. 4. The native SDS-PAGE of the purified agarase from *Bacillus cereus* ASK202-M7

마. Agarase의 효소학적 특성조사

(1) 최적온도와 안정성

분리·정제된 BagM7의 최적활성온도를 알아보기 위해 20~60℃ 까지 각 온도별로 효소활성을 측정한 결과, Fig. 5에서와 같이 30℃에서 최대활성을 가지는 것으로 나타났다. 이것은 원 균주 유래 agarase의 최적 활성온도가 40℃였던 것과 다른 결과치이다.

효소의 온도안정성을 검토하기 위해 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.8에 BagM7 0.25units/㎖를 첨가하여 10, 20, 30, 40, 50℃에서 일정시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 Somogyi-Nelson 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 40℃에서 24시간 방치하면 효소활성이 약 50%로 떨어졌으나, 30℃에서는 80 시간까지 100%의 활성이 유지되다가 150시간에 50%로 떨어졌다 (Fig. 6). 원균주 유래 agarase가 50℃에서도 24시간 후 83%의 효소 활성을 유지하던 것에 비하면 고온에 대한 온도 안정성이 많이 떨어진 것으로 나타났다. 그러나, 4℃에서 liquid 상태로 2년 이상 보관하여도 그 활성이 유지되는 것으로 나타나 냉장 보관에 대한 높은 안정성을 보였다.

(2) 최적 pH와 안정성

BagM7의 최적 활성 pH를 조사하였다. pH 3.6~5.6은 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.8~8.0 는 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0~9.0은 10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0~10.6은 10 mM boric acid-NaOH buffer, pH 10.0~12.0은 10mM sodium phosphate-NaOH buffer, pH 12.0~13.0은 10mM KCl-NaOH buffer를 사용하여 0.1 %(w/v) agarose 기질용액을 녹인 1.3㎖에 BagM7 agarase를 첨가하여 30℃에서 효소활성을 측정한 결과 Fig. 7에서와 같이 pH 5.6, 10 mM citric acid-sodium citrate buffer에서 최대 활성을 나타내었다. 원균주의 agarase가 pH 7.8에서 최적 활성을 나타낸 것에 비하면 상당히 산성쪽으로 기울어진 결과이다.

또한, 각 pH 별로 제조한 완충용액에 효소용액을 첨가하여 4℃에서 24시간 방치한 후 기질용액을 첨가하여 효소의 잔존 활성량을 측정함으로써 분리정제된 BagM7 agarase의 pH 안정성에 대하여 알아보았다. 그 결과 Fig. 8에서와 같이 pH 5.0~9.0 까지의 범위에서 100% 효소활성이 유지되었으며 pH 4의 산성, pH 12의 염기성에서도 효소의 안정성이 70% 이상 유지되는 것으로 나타나 여러 pH 범위에 대한 효소활성의 안정성을 확인할 수 있었다.

(3) 기질의 특이성

BagM7의 기질 특이성을 알아보기 위해 다양한 polysaccharides를 기질로 하여 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.6에서 효소 반응을 행한 결과, Table 2와 같이 효소를 정제하기 전인 조효소액은 agarose, agar에 대하여 뛰어난 분해능을 그리고, alginate, cellulose, λ-, κ-, ι- carrageenan, starch, dextran에 대해서는 약 5~20 % 정도의 분해능을 나타내었다. 그러나, 정제된 agarase의 경우 alginate, cellulose, carrageenan, starch, dextran

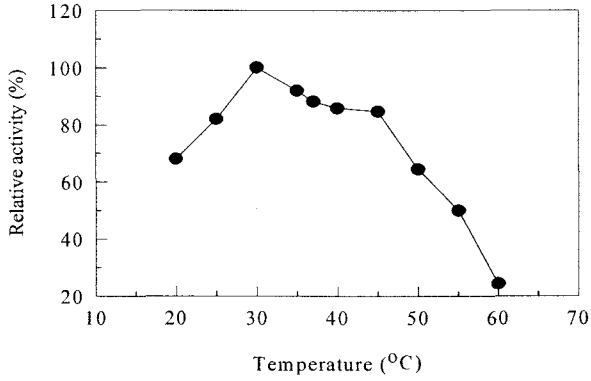


Fig. 5. Effects of the temperature on the BagM7 agarase activity. Enzyme activity was measured at various temperatures in 50mM Na-phosphate buffer, pH 7.8 for 30min, respectively.

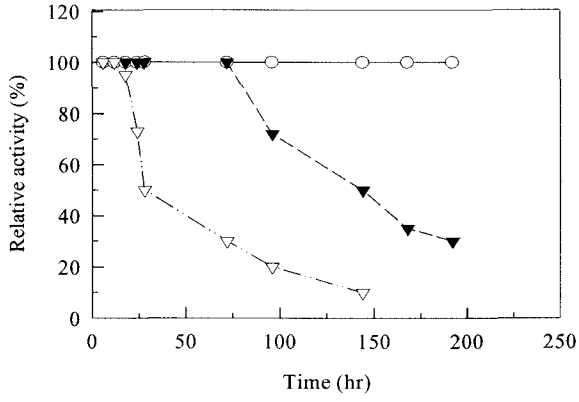
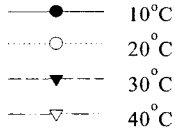


Fig. 6. Stability of the agarase activity at various temperature. Enzyme was standed at various temperatures for several hours in 50mM Na-phosphate buffer, pH 7.8 for 40min, respectively.



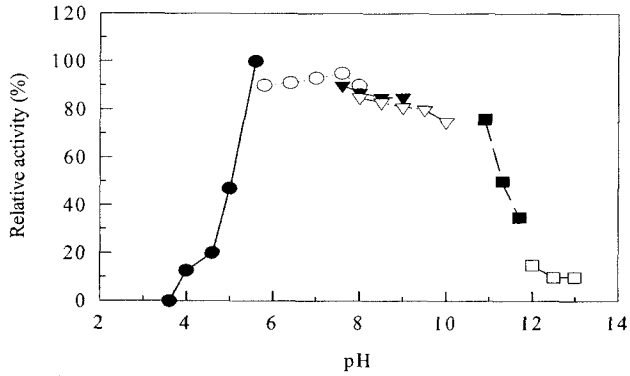


Fig. 7. Effects of pH on the agarase activity with various buffer solution. The agarase reaction was carried out various pHs for 30min at 30°C.

- 10mM citric acid-sodium citrate buffer (3.6-5.6)
- 10mM sodium phosphate buffer (5.8-8.0)
- 10mM Tris-HCl buffer (7.0-9.0)
- 10mM boric acid-NaOH buffer (8.0-10.6)
- 10mM sodium phosphate-NaOH buffer (10.0-12.0)
- 10mM KCl-NaOH buffer (12.0-13.0)

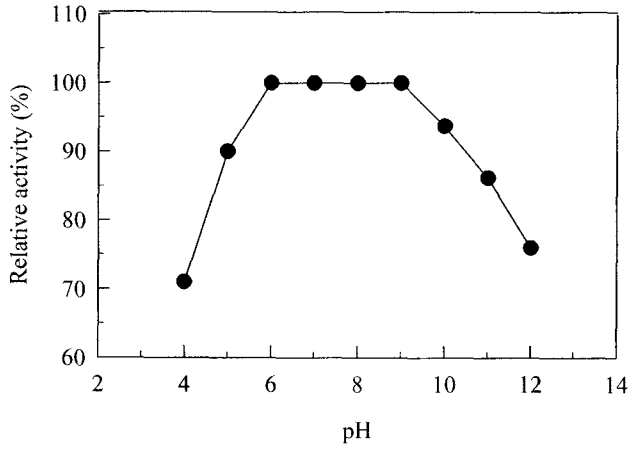


Fig. 8. Effects of pH on the agarase stability. The agarase reaction was carried out at 4°C for 24 hr in various pHs and the remaining activity was measured at each pHs.

Table 2. Substrate specificity of the supernatant and the purified BagM7 agarase from *Bacillus cereus* ASK202-M7.

Substrate	Relative activity (%)	
	Supernatant	Purified agarase (BagM7)
Agarose	100.0	100.0
Agar	85.0	80.0
Cellulose	22.6	–
Alginate	20.1	–
ι– Carrageenan	21.5	–
λ– Carrageenan	11.5	–
κ– Carrageenan	23.8	–
Starch	20.0	–
Dextran	5.3	–

에 대해서는 전혀 분해능을 나타내지 않았으며, 단지 agarose, agar에 대해서만 기질 특이성을 보였다. 이 결과 로부터 BagM7은 agar, agarose에 대해 특이적으로 반응하는 효소로 추정된다.

(4) 정제된 효소의 k_m 및 V_{max}

정제된 BagM7에 대한 agarose의 기질 친화력을 측정한 결과를 Lineweaver-Burk plot로 나타내었다 (Fig. 9). 이 plot로부터 산출된 Michaelis constant (k_m) 값은 0.28 ㎎/㎖ 였으며, V_{max} 값은 37.09 ㎎/㎖ · min인 것으로 확인되었다. 원균주 유래 agarase의 k_m 값은 0.41 ㎎/㎖ 였으며, V_{max}값은 3.48 ㎎/㎖ · min 였던 것에 비하면 효소-기질 친화력이 매우 높고, 효소의 최대활성도 값도 8.9배 가량 증가한 것으로 나타났다.

(5) Detergent의 영향

효소활성에 대한 detergent의 영향을 조사하기 위해서 각종 detergent를 1 %(v/v)가 되도록 효소액에 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다 (Table 3). 그 결과, 모든 detergent들에 대해 효소활성이 영향을 받는 것으로 나타났으며, 특히 triton-X100과 Tween 20은 효소의 활성을 완전히 저해하는 것으로 나타났다. SDS를 제외한 다른 detergent에 대해서 활성저해를 크게 받지 않던 원균주 유래의 agarase와 다른 양상이다.

(6) 저해제의 영향

BagM7 Agarase의 활성 중심에 관여하는 아미노산을 확인하기 위하여 여러 가지 화학수식제를 사용하여 효소활성의 저해정도를 측정하였다. 각 chemical의 최종 농도가 0.5mM, 1.0 mM, 5mM, 10 mM이 되게 저해제를 효소용액에 첨가하여 30℃에서 30분간 반응시킨 후 그 잔존활성을 측정한 결과는 Table 4과 같다.

효소 저해제로는 cysteine을 수식시키는 저해제인 3-Iodoacetic acid, NEM (N-ethylmaleimide)와 serine 잔기를 수식하는 TLCK (N-α-p-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone), TPCK (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), Antipain hydrochloride, PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride)를 사용하였다. Metallo 저해제로 작용하는 1,10-phenanthroline 과 aspartic acid 잔기를 수식하는 pepstain A, cysteine, serine을 공동으로 수식하는 leupeptin를 사용하였다. 본 효소 BagM7이 cysteine, serine과 metallo 활성 저해제에 의해 저해되는 것으로 보아 효소활성부위에 cysteine과 serine이 존재하는 것으로 사료된다. 그러나, aspartic acid 수식제에 대해서는 아무런 영향을 받지 않으므로, 효소활성부위에 aspartic acid 가 존재하지 않는 것으로 판단되어진다. 이러한 결과는 metallo modifier인 phenanthroline와 serine 수식제인 TPCK에 의해서만 저해 받는 원균주 유래의 agarase와 다른 특성이다.

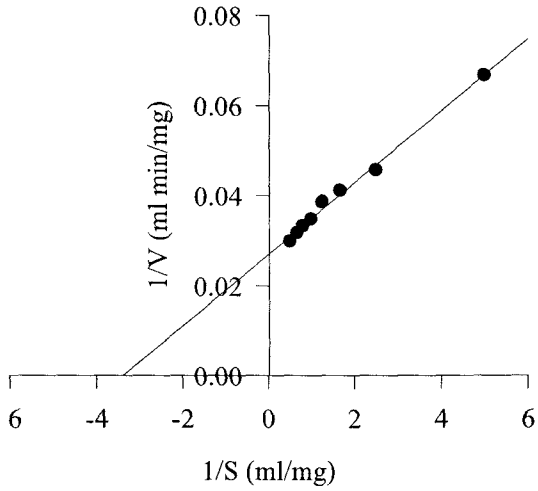


Fig. 9. Lineweaver-Bulk plot for determining k_m of BagM7 agarase

Table 3. Effects of detergents on the BagM7 agarase activity.

Detergents (1%, v/v)	Residual activity (%)
None	100.0
Tween 40	68.0
Tween 80	38.0
SDS	23.0
Triton X-100	0
Tween 20	0

SDS : Sodium dodecyl sulfate
Tween 20 : Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
Tween 40 : Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate
Tween 80 : Polyoxyethylene sorbitan momooleate
Triton X-100 : Oxtylphenoxy polyethoxy ethanol

(7) 금속이온의 영향

금속이온은 효소반응에 있어서 상승작용 또는 저해작용를 유발하는 인자가 될 수 있으므로 BagM7에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 1 mM 농도로 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.6에 녹인 다음 효소를 첨가하여 30℃에서 30분간을 방치한 후 금속이온들이 효소 활성에 미치는 영향을 잔존 효소활성을 조사하여 측정한 결과는 Table 5과 같았다. Li^{+}, Ca^{2+}, Na^{+}, Mg^{2+} 이온 등은 효소의 활성을 10~20% 정도 증가시키는 것으로 나타났으나, K^{+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}는 효소의 활성을 크게 저해시키는 것으로 나타났다. 특히, 원균주 유래의 agarase의 활성을 63%나 배가시켰던 Zn^{2+}은 mutant 유래 BagM7 agarase의 활성을 저해시키는 상이한 결과가 나왔다.

(8) Chemical의 영향

효소활성에 대한 chemical의 영향을 알아보기 위하여 각종 chemical을 최종 농도가 1mM이 되도록 효소용액에 첨가하여 30℃, 30분 동안 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과, chelating agent인 EDTA에 대해 효소활성이 10% 정도 저해되었으며, urea와 sodium azide에 대해서는 활성이 오히려 증가되는 것으로 나타났다 (Table 6).

(9) 환원제의 영향

BagM7의 효소활성에 대한 환원제의 영향을 알아보기 위하여 각종 환원제를 5mM이 되도록 첨가한 후 30℃에서 30분간 동안 방치하여 잔존활성을 측정하였다. 그 결과, β-mercaptoethanol에 대해서는 효소활성이 150% 증가되었으며, cysteine에 대해서는 90% 감소되는 것으로 나타났다(Table7).

(10) 아미노산 조성 분석

BagM7 Agarase를 110℃에서 24시간 동안 6 N HCl 용액에서 산 가수분해를 한 후 Pico-Tag Free Amino Acid analysis column을 사용하여 아미노산 분석을 행하였다. 효소 단백질을 구성하는 아미노산 수는 효소의 분자량을 기준으로하여 각 아미노산 peak 면적비로부터 계산하였다 (Table 8). 그 결과, 산성 아미노산인 Asx(Aspartic acid + Asparagine), Glx(Glutamic acid + Glutamine)이 각각 12.7%, 10.3%를 차지하였으며, 중성아미노산인 Glycine, Alanine, Valine, Threonine의 함량이 비교적 높은 것으로 나타났다.

(11) TLC를 이용한 한천올리고당의 분석

Agarose, neoagarohexaose, neoagarotetraose를 기질로 사용하여 BagM7 효소의 반응산물을 TLC를 이용하여 확인하였다. 이때 사용된 표준물질과 product들의 R_f값을 Fig. 10에 나타내었다. Neoagarobiose (DP2), neoagarotetraose(DP4), neoagarohexaose(DP6)의 R_f값이 0.53, 0.40, 0.27로 나타났으며, galactose는 neoagarobiose에 비해 분자량이 작지만, 전하를 띠지 않는 관계로 R_f값이 0.46으로 낮게 나왔다.

Table 4. Effects of inhibitors on the BagM7 agarase activity.

Inhibitors	Modification region	Residual activity(%)	
		5mM	10mM
None		100	100
3-Iodoacetic acid	Cysteine	89	87
NEM	Cysteine	90	92
1,10-phenanthroline	(metallo)	61	32
PMSF	Serine	89	89
TPCK	Serine	71	72
TLCK	Serine	86	97
		0.5mM	1.0mM
Antipain hydrochloride	Serine	74	75
Pepstatin A	Aspartic acid	103	82
Leupeptin	Cysteine, Serine	105	110

NEM: N-ethylmaleimide, TPCK: N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone,
TLCK: N-α-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, PMSF: Phenylmethyl-sulfonyl fluoride

Table 5. Effects of various metal ions on the BagM7 agarase activity

Metal ions (1mM)	Residual activity (%)
None	100
LiCl	121
$CaCl_2$	113
NaCl	110
$MgCl_2$	108
$MnSO_4$	90
$SnCl_2$	86
$CuSO_4$	24
K_2CrO_4	24
$Zn(NO_3)_2$	22
$FeCl_2$	13

Table 6. Effects of chemicals on the BagM7 agarase activity.

Chemicals (1mM)	Residual activity (%)
None	100.0
Sodium Azide	110.0
Urea	112.0
EDTA	90.0

Table 7. Effects of reducing agents on the BagM7 agarase activity.

Reducing agents (5mM)	Residual activity (%)
None	100.0
β-mercapto ethanol	250.0
Sodium citrate	97.0
Sodium sulfate	93.0
Cysteine	11.0

Table 8. Amino acid compositions of the purified BagM7 agarase, BagM7.

Amino acid	Content (%)	Amino acid	Content (%)
Asx	12.7	Leu	4.2
Glx	10.3	Ile	3.5
Gly	8.7	Phe	2.8
Ala	6.5	Arg	2.2
Val	6.2	His	1.4
Thr	5.9	Cys	0.3
Lys	5.8	Tyr	0.1
Ser	4.9	Met	0.1
Pro	4.5		

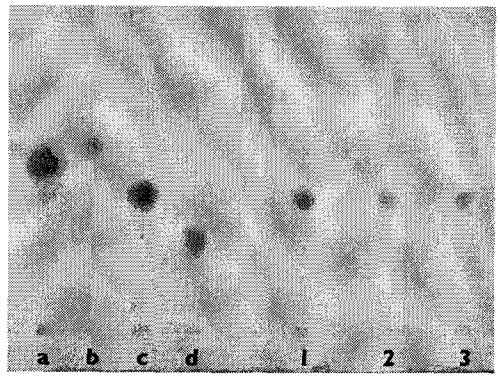


Fig. 10. TLC analysis of the enzymatic hydrolysis products from agarose (1), neoagarohexaose (2) and neoagarotetraose (3). Sample taken at 10 min were analyzed by TLC. Lane a, galactose; b, neoagarobiose; c, neoagarotetraose; d, neoagarohexaose represents the standard sugars.

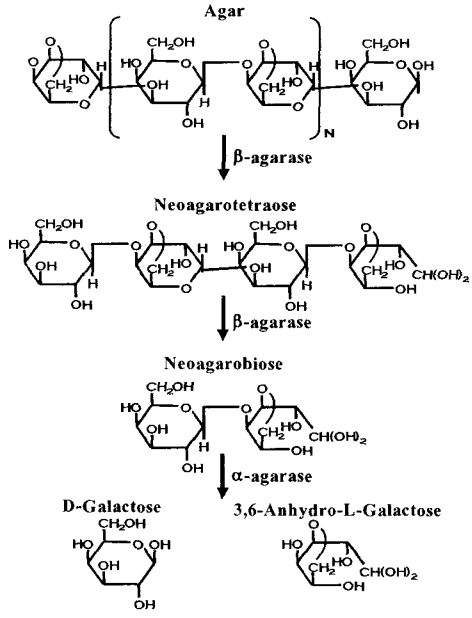


Fig. 11. The structures of neoagarooligosaccharides. Neoagarobiose is cleaved at the 1→3 linkage by α-agarase to produce D-galactose and 3,6-anhydro-L-galactose.

Agarose를 기질로 사용하여 10분간 반응시킨 경우, 2, 4, 6당이 생산되었으며 주 생산물은 4당으로 나타났지만 (Fig. 10, lane 1), 반응시간을 연장시키면 분해당이 모두 2당으로 전환되었다. Neoagarohexaose는 2당과 4당으로 분해되는 것으로 나타났으며 (Fig. 10, lane 2) neoagarotetraose는 2당으로 전환되었다 (Fig. 10, lane 3).

Neoagarobiose는 비환원성 말단을 가지는 3,6-anhydro-L-galactose와 환원성 말단을 가지는 D-galactose가 α결합으로 연결되어 있으며, neoagarotetraose와 neoagarohexaose는 이런 2당류가 β결합으로 2개, 3개 연결된 구조이다 (Fig. 11).

효소에 의해 neoagarohexaose와 neoagarotetraose의 α결합이 끊어지면 galactose(DP1)와 triose(DP3) 당이 생성되어야 하나, TLC 결과 2, 4 당 이외의 당은 생성되지 않았으므로, 분리된 효소 BagM7은 β결합만을 자르는 β-agarase 일 것으로 추측할 수 있었다.

2. Gene cloning을 이용한 agarase의 고생산성 균주의 개발

Agarase의 고 생산성 균주를 개발함에 있어 돌연변이 유발에 의한 agarase 고 생산 균주의 선 별과 동시에 원균주 *Bacillus cereus* ASK202의 agarase gene을 cloning하여 *E. coli*에서 발현시키는 실험을 행하였다.

가. Agarase 유전자의 cloning

Bacillus cereus ASK202로부터 분리된 염색체(chromosomal) DNA는 *Hin*dIII로 부분 분해하였으며, multicopy plasmid인 pUC19도 *Hin*dIII로 restriction 하였다. 이 두 유전자들의 ligation mixture를 *E. coli* JM83에 형질전환(transformation)하였다. 형질전환된 *E. coli* JM83을 ampicill-in, X-gal, IPTG가 첨가된 LB 한천평판배지(LAXI)에 도말하여, 37℃에서 16시간 배양하였다. 형질전환체(transformant)는 먼저, vector의 ampicillin resistance 유전자에 의해 X-gal과 IPTG를 소화하지 못해 나타나는 흰 colony로 1차적으로 선별하였다. 1차 선별된 21,000 개 가량의 colony를 lysozyme을 함유하는 soft agar로 overlay하여 37℃에서 12시간 반응시켜 cell 내부의 enzyme을 밖으로 유출시킨 후, Gran's iodine solution (0.05 M Iodine in 0.12 M Potassium Iodide)을 부어 한천이 분해될 때 나타나는 clear zone을 확인하였다. 이 과정에서 iodine solution에 대해 양성 반응을 보이는 하나의 colony를 최종적으로 선별할 수 있었다 (Fig. 12). 이 형질전환체는 soft agar를 처리하기 전에는 colony 주위에 투명한 환이 나타나지 않으나, chloroform과 lysozyme으로 cell wall을 파괴한 후에는 활성이 나타나는 것으로 관찰되었으며, 이것은 생산된 agarase를 *E. coli*가 intracellular site에 축적시키는 것으로 사료되어지는 결과이다. 이 *Bacillus cereus* ASK202 균주의 agarase 유전자를 가지고 있는 재조합 plasmid DNA를 pBA41이라 명명하였다.

나. Agarase 유전자의 염기배열 결정 및 분석

pBA41 재조합 plasmid를 *Hin*dIII restriction enzyme으로 잘라보았을 때, 2.7 kb의 vector

pUC19와 3.07kb 정도의 insert fragment를 가지고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 13). 이것을 여러 가지 제한효소를 이용하여 잘라본 결과, pBA41의 3.07kb 외래 DNA(*ba*41) 내에는 *Bam*HI 1개, *Eco*RI 3개, *Kpn*I 3개, *Nde*I 2개, *Pst*I 1개, *Sma*I 2개, *Sac* I 4개, *Xba*I 1개 씩의 제한효소인식 부위를 갖고 있었다.

이 삽입 부위를 Sanger 등의 dideoxynucleotide termination method로 sequencing을 해 보았다. pBA41의 *ba*41 유전자의 nucleotide와 거기서 유래되는 amino acid sequence를 Fig. 14에 나타내었다. 695 position에 있는 ATG 개시 codon으로부터 시작되어 2979 position의 TAA로 종결되는 총 2284개의 open reading frame을 가지고 있었으며, 총 크기 83.3 kDa로 추정되는 761개의 amino acid residue로 구성되어 있었다. 이것은 원균주에서 분리·정제된 agarase가 90 kDa, 돌연변이균주에서 분리·정제된 agarase가 41 kDa였던 것과 다른 결과이다. Promoter는 transcription이 시작될 때 RNA polymerase가 인식하는 DNA 상의 특정염기 배열을 지닌 부위이다. 일반적으로 promoter의 -10 region은 transcription initiation site로부터 7 base upstream에 존재한다고 알려져 있다. *Bacillus*에서 보고된 다양한 transcription signal에 관련된 data를 비교하여 분석하면 **TA**TA**AT**와 같은 consensus sequence를 발견할 수 있으며 이러한 sequence는 *E. coli*와 그람 음성세균 promoter 유래의 -10 consensus sequence (5'-**TA**tA**AT**-3')와 동일하였다. Agarase 유전자의 경우 정확한 전사개시 부위를 결정하지는 못했지만, computer 분석을 통하여 agarase 유전자의 5'말단에 존재하는 DNA 염기배열에서 가능한 promoter 부위를 조사했을 때 Fig. 14과 같이 밑줄 그어진 -35 (-CCTGCGACTT-)와 -10 (-TAATCAATA-)의 consensus sequence와 유사한 염기배열을 추정할 수 있었다. 그러나 Buttner 등의 보고에서와 같이, agarase 처럼 균주의 생존에 중요한 역할을 하는 효소는 단순하게 하나의 promoter를 가지지 않고 (*Streptomyces coelicolor* A3(2) 균주는 *dagA* agarase gene에 대하여 적어도 4개 이상의 RNA polymerase binding site가 있다고 밝히고 있다) 다수의 promoter를 가질 가능성이 충분하므로 이 후의 실험에서는 자료 분석을 위한 명확한 추가실험이 필요하다고 사료되어 진다.

RNA polymerase가 transcription을 시작하면 template를 따라 이동하여 terminator sequence에 도달할 때까지 합성을 계속한다. 대체적으로 termination 지점 바로 전에 palindromic sequence를 포함하고 있으며 이 palindrome은 짧은 거리를 두고 존재하는 inverted repeat sequence로 구성되어 있다. RNA 상에서 inverted repeat sequence에서 형성되는 hairpin의 역할은 RNA의 합성을 늦추거나 멈추게 하나, RNA는 많은 2차 구조를 하고 있기 때문에 hairpin을 만난다고 termination이 일어나는 것만은 아니다. Stem-loop 구조는 nuclease 공격을 잘 받지 않기 때문에 translation시 exonuclease로부터 mRNA를 보존하는 기능을 지니며 RNA 작용을 감소시켜 mRNA의 반감기를 연장시켜준다. Termination은 RNA polymerase가 termination시 보조factor를 필요로 하는가에 따라 rho-dependent termination과 rho-independent termination으로 나누어지는데 대부분의 prokaryotic 유전자의 rho-independent termination는 4-8개의 U 앞에 GC가 풍부한 inverted repeat sequence를 갖고 있다.

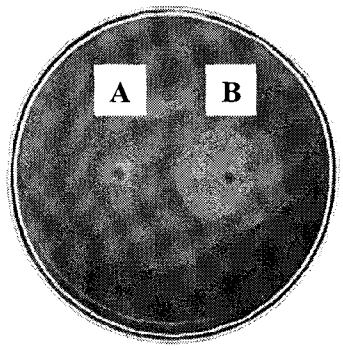


Fig. 12. Photograph of the strain containing the recombinant plasmid DNA carrying agarase gene of *Bacillus cereus* ASK202 (Agar plate was treated with soft agar after the cell was crushed). A, *E. coli* JM83/pUC19(control); B, *E. coli* JM83/pBA41

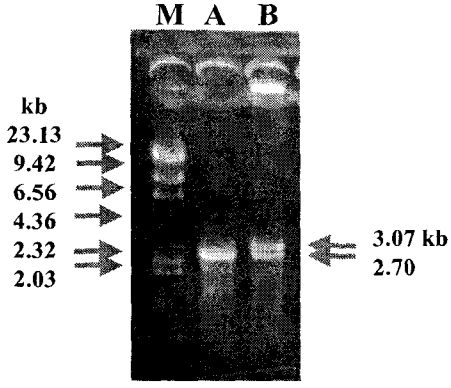


Fig. 13. Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid DNA carrying agarase gene of *Bacillus cereus* ASK202. M, Marker(DNA digested by *Hin*dIII); A, pUC19 plasmid DNA digested by *Hin*dIII; B, pBA41 plasmid DNA digested by *Hin*dIII

Rho-dependent termination는 특별히 GC rich 부위가 없고 U가 계속되는 부위가 없다. pBA41의 insert 유전자의 3′ 말단 downstream에 transcription terminator 구조를 검색한 결과, UAA stop codon에서 17 base pair 떨어진 2998-3026 base에 inverted repeat (IR) sequence가 존재하고 있는 것으로 관찰되었다 (Fig. 15)(Fig. 14의 3′말단의 굵은 막대 부분). 이 IR sequence는 29 base 중에서 5base를 사이에 두고 11 base가 pairing을 하고 있었다(1 mispairing). 이 IR sequence가 형성하는 secondary structure의 ΔG값을 계산한 결과 -18.40 kcal/ mol로 비교적 높은 값을 나타내었다. 그러므로 pBA41에서 coding하고 있는 agarase는 Rho-independent termination을 진행하는 것으로 추측할 수 있었다.

유전자의 translation initiation은 translation 효율에 영향을 주는 요인 중의 하나이다. Gram 양성균과 음성균 사이의 상호 translation에 있어서 효율의 차이가 나는데 이는 30s ribosome과 mRNA와의 결합효율에 따라 결정된다. Ribosomal binding site(RBS)는 initiation codon과 Shine-dalgaruo(SD) sequence 사이의 spacer로 구성되어 있다. Translation이 효율적으로 개시되려면 16s r RNA의 3′말단의 SD sequence와 mRNA의 5′ 말단 사이의 상보성이 높아야 한다. *E. coli* 16s rRNA의 3′말단의 sequence는 3′-AUUCCUCCACUAG-5′이고, *B. subtilis*의 경우 3′-UCUUUCCUCCACUAG-5′이다. Translation initiation codon과 RBS sequence 사이는 2~15 nucleotide이고 9 nucleotide 일 때 효율이 최고로 알려져 있다. Agarase Ba41의 initiation codon은 AUG였고, 다른 *Bacillus* 유래의 SD sequence와 비교시 추정되는 SD sequence는 AUG initiation codon의 7 bp upstream에 존재하는 5′-TGGGAG-3′이라고 추정된다(Fig. 14). 이러한 SD sequence는 *Bacillus subtilis*의 consensus sequence인 5′-AAGGAG-3′, 그리고 gram positive 균주인 *Streptomyces coelicolor*에 존재하는 *dagA* agarase gene의 RBS 5′-AACGAG-3′와 유사하였다.

또한, *ba41* gene에서는 2979 position의 UAA stop codon 이외에도 3′ 말단 쪽으로 2986 position에서 UAG, 2992 position에서 UGA stop codon이 연속적으로 존재하고 있는 것으로 추측되었다. Sugano 등의 보고와 같이 cell의 생존에 중요한 두 가지의 서로 다른 agarase가 유전자 내에서 연속적으로 연결되어 존재하고, 동시에 translation이 조절되는 것으로 보아, *ba41* gene 전후에 agarase를 coding 하고 있는 유전자의 존재 가능성도 배제할 수 없으므로 앞으로 더 연구되어져야 할 분야라고 사료되어진다.

다. Codon usage 분석

다양한 종류의 생물체의 유전자 염기배열순서가 결정되었고, 아미노산을 결정하는 codon의 선택성이 무작위적으로 나타나지 않는다는 것이 밝혀졌다. Codon usage의 편중성은 종에 따라 특이성을 보이지만 같은 종내에서도 유전자에 따라 다르다.

AAGCTTGCCGCCGCCGGTACCAATATCCAGCACCGCCTTGCAGTGCGCTACCCGC
TGCGCCATAGCCCGCCGGGCGGCCTGAATCTGCCC 90
CAGCATCGAGACATCAAACCCCGTGATATAGCCTCGGGATATCTGGCTAGAATAG
TTGCCGTTAGGCAGGTTATGAAACTCCTGCAGCGC 180
ATATTTAGGGATGTCGGCAAACAATGGGTCACTGCTATCCACTTGCACCTTTTGCG
GTTTACCCAACACCAGGCGCGCAAACTTAAGCAG 270
CCCCGCAACACTCCTAAAACAAAGACGGTCAGCCCACGTCTCGGGCAAGCTCAG
GTTAACCCAATCGGGCACGTTCGGGTCTGTCATAAC 360
GGGGGGTTGGGTTGTCGAGCGTATATCGCTGGTCATAGGGCCATTTCACTAACGTT
TATGGCGCACAGGATAAAAGTCTGGGCATAAAAA 450
AGCCAGCCGTCGCCGCCATTTCGCATCTTTCAACATTATTAAATTGCATACGTATT
CAACCTCACTGCATACGTATACATCTTGGCCTTG 540
CCCCTAGGCGCGACCTATGTTGTCTGGCAGTGCCGAGTTAAACCAATAAAGATCA
TCGCCATCGCCTAAGGCGATTAGCGTTCGGCATTA 630

GCAGGCCCCACCTGCGACTTCTTTTGATGCACCCACATAATCAATAACCAAAC
TGGGAG TCACACATGAAAGCTATTGCCCTGCCCGCAA 720
-35 -10 M K A I
A L P A T 9

CACCTAAACGGCTTAAGCAAAAAACCTTTACGCGCCTACCTTTTAAACAGTTCGT
GGGCGCCGCCGCGCTTACGCTGGCGGCACAGTCAT 810
P K R L K Q K T F T R L P F K Q F V G A A A L
T L A A Q S S 39

CCTACGCTGGCACCGCGTTTGTGCACTTATTTGAGTGGAGCTGGAACGACATAGC
CGATGAGTGCGAAAACTTTCTCGGTCCCAAGGGCT 900
Y A G T A F V H L F E W S W N D I A D E C E N
F L G P K G F 69

TTGATGCGGTACAAATATCACCGCCCACCGAACACGTCAAAGGCCAGCAGTGGT
GGACGCGTTATCAGCCTATCACCTACCAAAATTTAA 990
D A V Q I S P P T E H V K G Q Q W W T R Y Q P
I T Y Q N L T 99

CCAGCCGCAGCGGCACTGAAGCCGAACTCCAAAGCATGATCAACCGCTGCCACA
GTGCCGGTGTAAAAATTTACGCCGATATAGTCGTCA 1080
S R S G T E A E L Q S M I N R C H S A G V K I Y
A D I V V N 129

ACCAGATGGCCAATCATTTAGTCGAAGGCAATTACGGTGTCGACGGGACTTGGTG
GGCACCGCGCGATTACCCCGAATTTAGCACGCAAG 1170
Q M A N H L V E G N Y G V D G T W W A P R D
Y P E F S T Q D 159

ACTTTCACCCCGGCTGCGCCACCGATTACTCGGACGCAAACTCTGTATGGAGCTG
TGACTTAAGCGGTATGCCCGATCTAGATCACAGCC 1260
F H P G C A T D Y S D A N S V W S C D L S G M
P D L D H S Q 189

AACCCTATGTGCGCGATACCGTCGCCAACTACTTAACGCGCCTCACCAATATGGG

CGTTGATGGCTTCCGCATCGACGCGGCGAAACATA 1350
P Y V R D T V A N Y L T R L T N M G V D G F R
I D A A K H M 219

TGCCACCGTCCGACATTAATGGCTTTTTACAAGCCGCCGGTAACCCCTGGGTATTT
TTAGAGGTGATTGGTGCTGGCGGTGAAGCTCCAG 1440
P P S D I N G F L Q A A G N P W V F L E V I G
A G G E A P E 249

AGATCCAACCTGCCAACTACACCTACTTAGGCGCTGTTACTGAGTTTAGCTACGG
CCCGGCACTGGCCGGCAACTTTAATGGTCAAATTA 1530
I Q P A N Y T Y L G A V T E F S Y G P A L A G
N F N G Q I K 279

AACATTTATTAGAGCTTGGCCCAAACTGGGGCTTACTGCCCTCAGCCGATGCCTTA
GTATTTGTCGATAACCACGACCGCGAGCGCGGCC 1620
H L L E L G P N W G L L P S A D A L V F V D N
H D R E R G H 309

ACGGTGGCGGCGGTAATTTATTTTACAAAGATGGCGCCAAGTACAACTTGGCCAA
TGTTTTTATGTTGGCCTACCCATACCGGTATCCCA 1710
G G G G N L F Y K D G A K Y N L A N V F M L A
Y P Y R Y P K 339

AAATCATGTTCCGGGTACCAAGTTTGATGAAAACCACTTCAAGCGGCACCCGACA
TAGGCCCGCTGCCCCCGGCGGTTGTGACGCCAACG 1800
I M F R V P S L M K T T S S G T R H R P A A P
G G C D A N G 369

GCTGGGTATGTCAACACCGCTGGGGCAACATCGCCAATATGGTGGGTTTTAGAAA
TTACACCGTGGACGCCTGGAGCCTTGATAATCAAG 1890
W V C Q H R W G N I A N M V G F R N Y T V D
A W S L D N Q V 399

TGGTGATTAACGATAACGCCATTGCCTTTGGGCGCGGCGACAAAGGCTTTGTGGT
GATCAACAACGGTCAAAGCAGCGTTAACCAAACCC 1980
V I N D N A I A F G R G D K G F V V I N N G Q
S S V N Q T L 429

TCTACACCGGCATGCCCGCCGGTGACTATTGCGATATCTTGCGTGCTGATGATGAA
TGCAGCGGTACCAACATCAGTGTCGACAACAACG 2070
Y T G M P A G D Y C D I L R A D D E C S G T N
I S V D N N G 459

GCTTTGCCAGCTTTAGCGTCGGCCCTGAATCAGCGTCAGCCATTCATGGCGGCGCC
CGGCCCAGCGTGAGCAATCAACTTCCGGTCGCGA 2160
F A S F S V G P E S A S A I H G G A R P S V S N
Q L P V A I 489

TTATCGAGGGCGCCCCCGAGACGCTAGAAACAGGTAGCCAAGTAACCCTCAGTG
GCGTTAACTCGTACGATAGTGACGGCAGTATTGTCA 2250
I E G A P E T L E T G S Q V T L S G V N S Y D S
D G S I V S 519

GCTACTTATGGAGCACCGGTGCCACCACATCAAACATTACCGCCACGCTGGACAA
TCCCGGCACCGCTACCTTTAGCTTAACCGTAACCG 2340
Y L W S T G A T T S N I T A T L D N P G T A T
F S L T V T D 549

ACAACCAGGGCGCCACTGACAGCCGAGAGGTAAGTATTCAGGTGGGAGGCGATG
AGCTAATCAGTAACTTTGATGCGCTCTACTTTCGCG 2430
N Q G A T D S R E V S I Q V G G D E L I S N F
D A L Y F R G 579

GTACGCCCAACGGCTGGGCCGCCAGTCCCATGACGTTGGTCGACGATCACACCTG
GCAATTAGACGTTCAGTTTGACGGCCAAGCCAACC 2520
T P N G W A A S P M T L V D D H T W Q L D V
Q F D G Q A N Q 609

AGCGCTTTAAGTTTGATTTAGCCGGCGATTGGAGCCAAAACTATGGCGACAACAA
CACCCCTGACGGCGTGCTGGACAGTAACGGCGATG 2610
R F K F D L A G D W S Q N Y G D N N T P D G V
L D S N G D D 639

ACATCAACACCAATGTGATTGGTCAGTACCGCGTGCAAGTAAACGACGCCGAGC
TAAGTTACAGCATCAACTCATTGGCCGCAGGCTTTA 2700
I N T N V I G Q Y R V Q V N D A E L S Y S I N S
L A A G F N 669

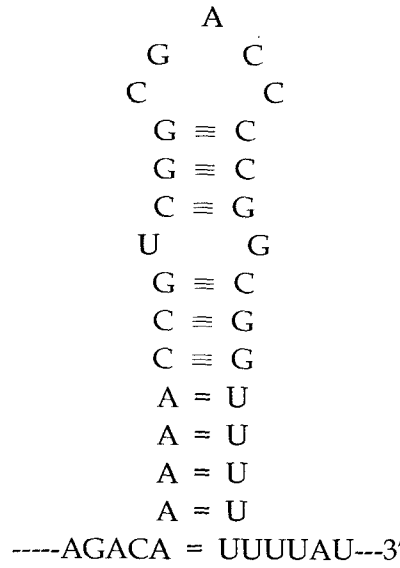
ACAGCAATTGGGACGGTGTTTACGTGCGTGGCACCTTTAACAACTGGAGCTGCAC
GGCAATGAATTTAACCGCCGATAATACCTGGAGTG 2790
S N W D G V Y V R G T F N N W S C T A M N L
T A D N T W S V 699

TCAATGTCACGCTCGACGGCGCCGCCGGTCAGCGTTATAAGTTTGACCGCTACTGT
GATTGGTCCACCAACTACGGCGATAACAATAGCG 2880
N V T L D G A A G Q R Y K F D R Y C D W S T N
Y G D N N S D 729

ATGGCATACTCGATAGCACGGGCAATGACGTTGTCGATGGCCGAACCGGTAACGT
CACCTTGCAAGTAAACGACAACAACTTGTCTTACC 2970
G I L D S T G N D V V D G R T G N V T L Q V N
D N N L S Y R 759

GCGCCCTGTAAGCCTTAGCACTGAGACAAAAACCGTCGGCGACCCCGGCGGTTTT
TTTATGTCGACGCTTTACGGCTGAAGCTT 3056
A L * * *
761

Fig. 14. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the agarase gene(*ba41*). The *Hin*dⅢ sites(AAGCTT) are thinly lined below the nucleotide sequences. Putative -10 and -35 sequence for the promoter are underlined. The potential ribosomal binding site(TGGGAG) is indicated with the closed box. The signal sequence predicted is indicated by the dashed underline.



ΔG = -18.40 kacl/mol

Fig 15. Predicted secondary structure of the transcription termination site in 3′ end of *ba*41

Ba41 agarase 유전자의 codon usage를 검토한 결과, Table 9에 나타난 바와 같이 일부의 아미노산에 있어서 codon 편중성을 보였는데, Threonine은 ACC, Asparagin은 AAC, Phenylalanine은 UUU, Alanine은 GCC, Glycine은 GGC, Serine은 AGC, Proline은 CCC, Tyrosine은 UAC, Glutamine은 CAA, Arginine은 CGC를 주로 사용하고 있었다. *Bacillus cereus* ASK202 유래의 agarase의 codon usage는 host cell인 *E. coli*의 것과 비교하면 Asparagin - AAC, Glycine - GGC, Tyrosine - UAC의 공통점이 있는 것으로 나타났다.

라. 아미노산 조성 분석

DNA 염기 배열로부터 추정한 아미노산 조성을 분석한 결과를 Table 10에 나타내었다. Asx(Aspartic acid, Asparagine), Glycine와 같은 산성 아미노산의 함량과 Alanine와 같은 중성 아미노산의 함량이 많은 반면, Histidine, Methionine, Cysteine 등은 함유량이 적은 것으로 나타났다.

마. Hydropathy 분석

Hydrophobic signal region은 protein의 분비에 있어서 필수적인 domain이다. 미생물이 생산하는 세포외 분비 단백질은 대부분 precursor 형태로 합성되고 N-말단의 hydrophobic한 signal peptide에 의해 세포막을 통과한다. Signal peptide는 20~40개의 아미노산으로 구성되어 있고 basic amino-terminus, hydrophobic core, processing site로 이루어져 있다. Signal peptide N말단에는 Histidin, arginine 등 1~3개의 basic amino acid가 존재하는데 분비 첫단계에 음이온을 띤 membrane lipid의 head group과 정전기적 결합을 하는 것으로 추정하고 있다. Valine, Leucine 등 10~20개의 소수성 아미노산과 Glycine, Proline 등 1~2개의 helix destabilizing 아미노산으로 구성되어 있는 hydrophobic core는 membrane lipid로의 partition과 bilayes spanning에 관여하는 것으로 추측되고 있다.

이를 토대로 살펴보면 Ba41 agarase는 N-terminal 부위에 36개의 amino acid 정도의 hydrophobic 한 potential signal sequence가 있는 것으로 예상되었다(Met-Lys-Ala-Ile-Ala-Leu-Pro-Ala-Thr-Pro-Lys-Arg-Leu-Lys-Gln-Lys-Thr-Phe-Thr-Arg-Leu-Pro-Phe-Lys-Gln-Phe-Val-Gly-Ala-Ala-Ala-Leu-Thr-Leu-Ala-Ala) (Fig. 14의 ……밑줄 부분). 이 signal sequence N-말단에 양전하를 띤 Lysine이 존재하고 있었으며 helix destabilizing 아미노산인 Proline과 Glycine이 중간중간 4개 존재하는 hydrophobic core가 연속되어 있는 것을 관찰할 수 있었다.

Ba41의 amino acid sequence의 hydropathic index를 Fig. 16에 나타내었다. Hydropathic index는 Kyte와 Doolittle의 방법을 따랐다. N-terminal region은 hydrophobic 성질을 띠고 있으며, 이 signal sequence를 제외한 N-terminal 부분과 C-terminal 부분 (region I, 37~200번째 아미노산; region V, 600~761번째 아미노산)은 hydrophilic한 성격을, 그 나머지, 크게 3부위로 구분되는 가운데 domain들 region II(201~320번째 아미노산), region III(321~430번째 아미노산), 그리고 region IV(431~599번째 아미노산) hydrophobic한 성격을 지녔다.

Table 9. Codon usage for agarase gene from pBA41(*Bacillus cereus* ASK202).

Codon-Amino acid-Number of codons							
UUU-Phe	29	UCU-Ser	2	UAU-Tyr	6	UGU-Cys	4
UUC-Phe	3	UCC-Ser	3	UAC-Tyr	25	UGC-Cys	6
UUA-Leu	18	UCA-Ser	8	UAA-**Stop**	1	UGA-**Stop**	
UUG-Leu	8	UCG-Ser	2	UAG-**Stop**		UGG-Urp	20
CUU-Leu	5	CCU-Pro	6	CAU-His	5	CGU-Arg	3
CUC-Leu	8	CCC-Pro	18	CAC-His	9	CGC-Arg	16
CUA-Leu	4	CCA-Pro	5	CAA-Gln	20	CGA-Arg	3
CUG-Leu	9	CCG-Pro	5	CAG-Gln	11	CGG-Arg	4
AUU-Ile	13	ACU-Thr	5	AAU-Asn	20	AGU-Ser	12
AUC-Ile	13	ACC-Thr	32	AAC-Asn	44	AGC-Ser	29
AUA-Ile	5	ACA-Thr	3	AAA-Lys	12	AGA-Arg	1
AUG-**Met**	12	ACG-Thr	12	AAG-Lys	5	AGG-Arg	1
GUU-Val	8	GCU-Ala	8	GAU-Asp	30	GGU-Gly	22
GUC-Val	16	GCC-Ala	43	GAC-Asp	30	GGC-Gly	50
GUA-Val	12	GCA-Ala	7	GAA-Glu	10	GGA-Gly	1
GUG-Val	16	GCG-Ala	9	GAG-Glu	13	GGG-Gly	2

Table 10. Amino acid compositions of the BA41.

Amino acid	Content (%)
Gly	9.8
Ala	8.8
Asn	8.4
Asp	7.9
Ser	7.4
Val	6.8
Thr	6.8
Leu	6.8
Pro	4.5
Phe	4.2
Ile	4.1
Tyr	4.1
Gln	4.1
Arg	3.8
Glu	3.0
Lys	2.2
His	1.8
Met	1.6
Cys	1.3

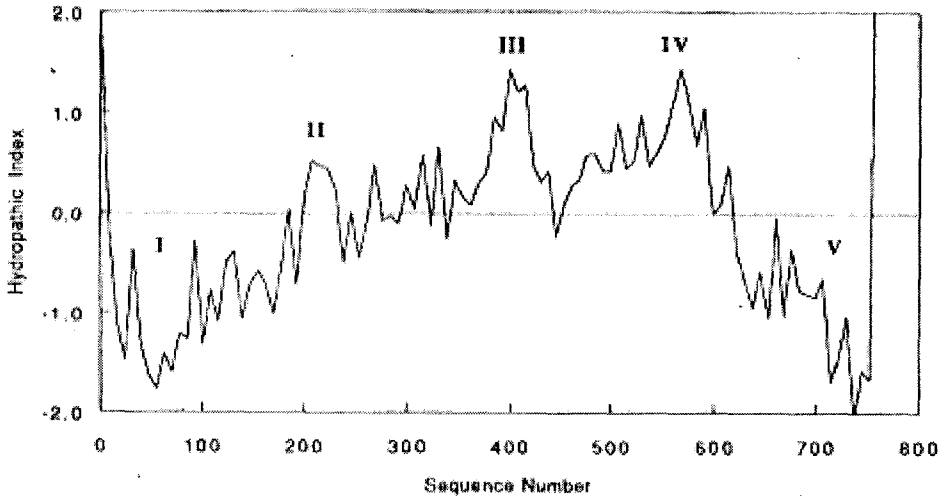


Fig. 16. Kyte-Doolittle hydropathic analysis of agarase deduced from pBA41
I and V regions describe the hydrophilic domains, and II ~ IV regions do the hydrophobic domains.

이러한 hydropathic 특성들은 앞서 말한 *S. coelicolor*나 *P. atlantica*의 hydropathic 특성과도 동일한 경향이다. 이러한 성격은 enzyme의 folding이나 catalyzing에 어떤 중요한 역할을 할 것으로 사료되어지는 결과이다.

바. Ba41의 amino acid 비교

Ba41의 amion acid sequence를 이미 발표된 여러 가지 agarase 들과 비교해 보았다. 현재까지 밝혀진 여러 agarase와는 상동성이 없는 새로운 protein이었으나, 몇 가지 agarase와는 양 말단에 hydrophilic한 성질과 가운데 몇 개의 region으로 구분되는 hydrophobic한 성격을 띠는 hydrophathic 성질의 유사성을 나타내었다. Sugano 등이 보고한 *Vibrio* sp.에서 생산되는 agarase0107은 다른 agarase 들과 유사 부분이 없으나, *S. coelicolor* A3와 *P. atlantica* 는 agarase activity 에 영향을 줄 것으로 사료되는 중요 두 부위에 대해 homology를 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 agarase의 3차원적인 활성구조 해명에 영향을 줄 것으로 사료된다.

이 외에도 Ba41 agarase의 유전자 sequence를 다른 polysaccharide 분해 효소와 서로 비교해 보았으나 homology는 없는 것으로 판명되었다.

3. *E. coli*에서의 agarase의 발현

재조합 plasmid 제작에 사용된 pUC19 vector로는 agarase의 대량 생산을 유도할 수 없었으므로 PCR을 이용하여 pBA41에서 agarase 만을 coding하고 있는 open reading frame 2.3 kb를 증폭하여 강력한 T7 promoter를 갖는 pET28a(+)를 이용하여 *E. coli*에서 고 발현 실험을 수행하였다.

가. Agarase의 발현 plasmid의 제조

pBA41의 restriction map을 기초로 하여보면, 정확하게 agarase coding 부분을 구분지을 수 있는 restriction enzyme이 없으므로 임으로 N-말단에 *Bam*HI restriction site와 C-말단에 *Hind*Ⅲ restriction enzyme site를 첨가하여 각각 다음과 같은 primer를 제작하였다.

- N 말단

5′ GAC GGA TCC ATG AAA GCT ATT GCC CTG C (nt 690-707)*Bam*H I

- C 말단

5′ AGC AAG CTT GTT TTT GTC TCA GTG CTA AG (nt 3982-3003)*Hind*Ⅲ

Primer를 만들 때 N 말단에는 *Bam*H I, 그리고 C 말단에는 *Hind*Ⅲ 제한 효소 인식 부위를 첨가함으로서, PCR에 의해 증폭된 유전자를 발현 vector인 pET28a(+)의 T7 promoter 하에 subcloning 할 때 올바른 방향으로 삽입되도록 하였다 (Fig. 17).

합성한 primer와 2.3 kb의 agarase fragment가 함유된 3.07 kb의 pBA41을 template로 하여 PCR을 수행한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동을 하여 2.3 kb의 유전자가 증폭되었음을 확

인하였고 (Fig. 18), QIA kit를 이용하여 gel에서 DNA를 elution 하였다. 그리고, T7 promoter를 함유하는 pET28a(+)발현 벡터에 agarase 유전자를 cloning 하기 위해 pET28a(+)를 *Hind* Ⅲ와 *BamH* Ⅰ으로 이중 절단하고 CIP 처리 후 동일한 제한 효소로 처리한 생성물질과 16℃에서 cohesive ligation을 실시하였다. *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환하여 분리한 형질전환체로부터 agarase 유전자가 들어 있는 재조합 plasmid를 확인하였으며 (Fig. 18), 이 recombinant plasmid를 pEBA1라 명명하였다.

4. T7 promoter를 이용한 agarase의 발현

숙주세포로 T7 RNA polymerase를 가지고 있는 *E. coli* BL21(DE3)에 새로이 제조한 발현벡터 pEBA1을 transformation 시켰다. 생산되는 agarase의 분비위치를 정확하게 판단하기 위하여 plate상에 colony를 배양하여 lysozyme이 함유된 soft agar를 처리하지 않은 colony (Fig. 19-1) 주위에는 투명한 환이 전혀 형성되지 않았으나, lysozyme으로 세포벽을 파쇄한 경우 (Fig. 19-2) pEBA1 plasmid를 함유하는 colony 주위에 큰 환이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 액체배양한 균체를 sonication 한 실험에서도 intracellular 부분에 96% 이상 대부분의 agarase가 존재하고 있는 것으로 나타났다 (Table 11).

이 colony 들을 37℃에서 LK 배지에서 생육시키다가 550nm에서 흡광도가 0.6에 도달하였을 때 IPTG를 최종 농도 1mM 되도록 첨가하여 induction 하고 1시간 간격으로 sampling 하여 균체를 원심분리 하였다. 이 균체를 sonication 하여 원심 분리한 후 soluble 단백질을 12% SDS-PAGE 행하였다. 예상되는 부위에 진한 band를 확인하였으며 (Fig. 20), induction 5시간 이후 agarase는 최대생산을 보였다. 이 *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1에서 생산되는 효소는 Ba41 효소보다 N-말단 부위에 34개의 아미노산이 더 연결된 구조인데, 이것은 pET28a(+) vector의 T7 promoter 이후에 연결되어 있는 생산물의 분리·정제 등을 용이하게 하기 위하여 부여된 잔기들로, 본 실험에서는 His·Tag를 이용하여 생산물을 분리·정제하였다. 발현된 agarase를 His·binding kit를 이용하여 분리 정제한 결과, 단일 band를 얻을 수 있었다. 1ℓ 배양액을 원심분리하여 얻어낸 균체를 sonication 하면 1280unit가 생산되었으며 최종적으로 분리·정제된 효소는 12.8unit/㎎의 specific activity를 가지며, 이 agarase를 Eba1으로 명명하였다 (Table 12). 이때의 agarase의 발현량은 *E. coli* JM83/pBA41에 비하여 70배 정도 증가한 양이다.

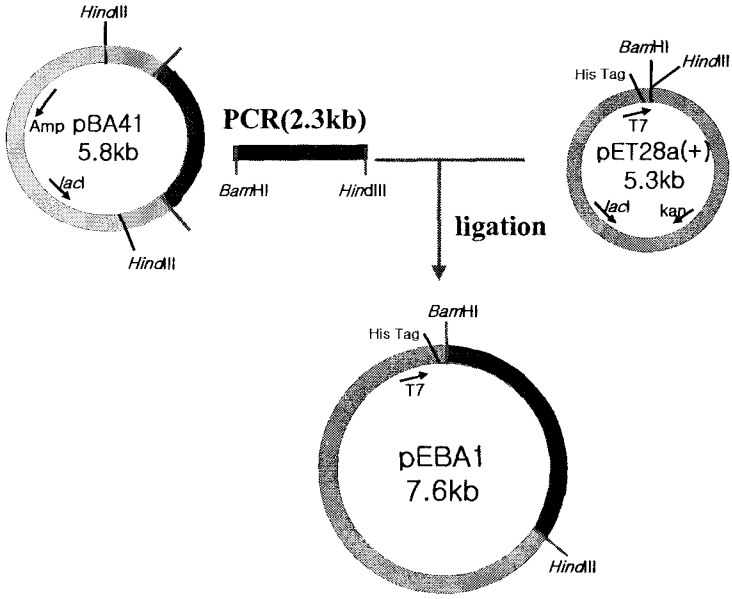


Fig. 17. Construction of expression plasmid pEBA1.

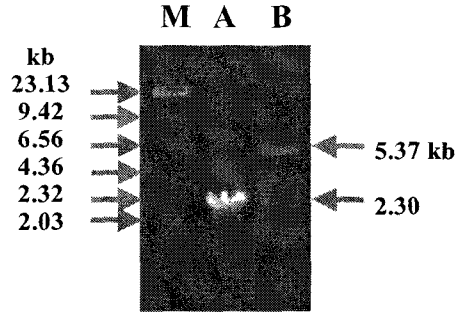


Fig. 18. Agarose gel electrophoresis of the recombinant plasmid DNA carrying the 2.3kb PCR fragment. M, Marker(DNA digested by *Hin*dIII); A, PCR product of pBA41; B, pEBA1 plasmid DNA digested by *Bam*H I and *Hin*dIII

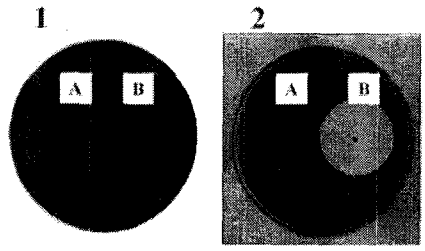


Fig. 19. Comparison of the agarase activity extracellular with intracellular site from the *E.coli* BL21(DE3) containing recombinant plasmid on the agar plate. The plate of No. 1 was extracellular agarase activity and the plate of No. 2 was treated with soft agar after the cell was crushed. A, *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)(control); B, *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1

Table 11. Localization of agarase in *E. coli*BL21(DE3) containing pEBA1.

Localization	Agarase activity (%)
Extracellular fraction	2
Periplasmic fraction	2
Cytoplasmic fraction	96

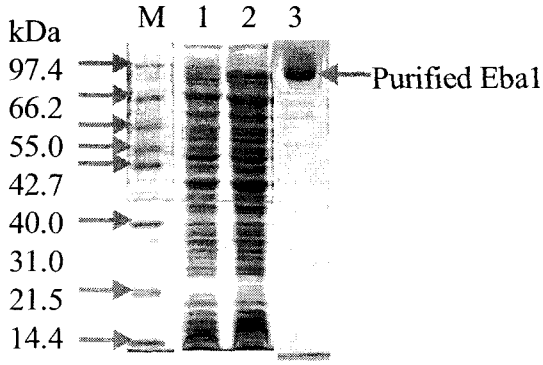


Fig. 20. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified agarase Eba1. M, Molecular marker; 1, *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+); 2, *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1; 3, purified agarase Eba1

5. 생산된 agarase의 특성조사

가. 최적온도와 안정성

분리·정제된 Eba1의 최적활성온도를 알아보기 위해 20~60℃ 까지 각 온도별로 효소활성을 측정한 결과, Fig. 21에서와 같이 40℃에서 최대활성을 가지는 것으로 나타났다.

효소의 온도안정성을 검토하기 위해 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.8에 Eba1 0.25units/㎖를 첨가하여 10, 20, 30, 40, 50℃에서 24시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 Somogyi-Nelson 방법을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 10~40℃ 범위에서는 24시간 방치하여도 효소 활성이 100% 유지되었으나 50℃에서는 24시간 후 효소활성이 50%가량 실활되는 것으로 나타났다 (Fig. 21).

나. 최적 pH 와 안정성

Eba1의 최적 활성 pH를 조사하였다. pH 3.6~5.6은 10 mM citric acid - sodium citrate buffer, pH 5.8~8.0 는 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0~9.0은 10mM Tris-HCl buffer, pH 8.0~10.6은 10 mM boric acid-NaOH buffer, pH 10.0~12.0은 10mM sodium phosphate-NaOH buffer, pH 12.0~13.0은 10mM KCl-NaOH buffer를 사용하여 0.1 %(w/v) agarose 기질용액을 녹인 1.3㎖에 효소를 첨가하여 30℃에서 효소활성을 측정한 결과 Fig. 22에서와 같이 pH 5.6, 10 mM citric acid - sodium citrate buffer에서 최대 활성을 나타내었다.

또한, 각 pH 별로 제조한 완충용액에 효소용액을 첨가하여 4℃에서 24시간 방치한 후 기질용액을 첨가하여 효소의 잔존 활성량을 측정함으로써 분리정제된 Eba1의 pH 안정성에 대하여 알아보았다. 그 결과 Fig. 23에서와 같이 pH 4.0~9.0 까지의 범위에서 100% 효소 활성이 유지되었으며 pH 3의 산성, pH 12의 염기성에서도 효소의 안정성이 95% 이상 유지되는 것으로 나타나 보관 pH 변화에 대한 효소의 안정성이 높음을 확인할 수 있었다. 이후의 실험에서는 pH 5.6의 10 mM citric acid - sodium citrate buffer를 사용하였다.

다. 기질의 특이성

Eba1의 기질 특이성을 알아보기 위해 다양한 polysaccharides를 기질로 하여 10 mM citric acid - sodium citrate buffer, pH 5.6에서 효소 반응을 행한 결과, agarose, agar 이외의 다당류는 전혀 분해하지 못하였으며, agarose 보다 agar에 대해 더 높은 효율로 분해함을 확인하였다 (Table 13).

Table 12. Summary of the purification steps of agarase from the culture supernatant of *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (㎎)	Specific activity (U/㎎)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	1280	1400	0.91	100.0	1.00
His · Tag purification kit	256	20	12.8	20.0	14.06

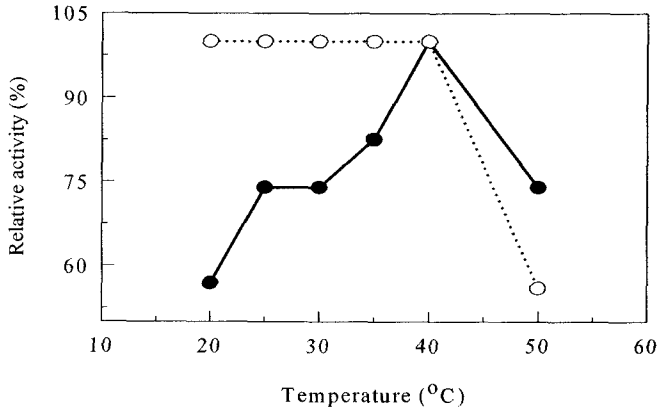


Fig. 21. Effects of temperature on agarase activity and stability
The enzyme activity was measured at various temperatures in 10mM Sodium-acetic acid buffer, pH 5.6 for 30min.
For the measurment of temperature stability, the enzyme was preincubted at various temperature for 24hr.

—●— activity
···○··· stability

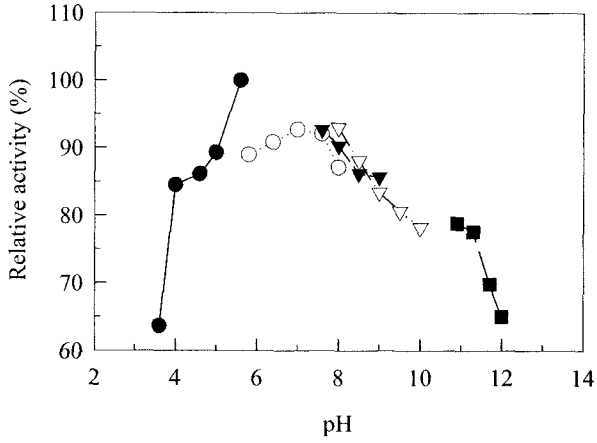


Fig. 22. Effects of pH on the agarase activity with various buffer solution. The agarase reaction was carried out various pHs for 30min at 40°C.

—●— 10mM citric acid-sodium citrate buffer (3.6-5.6)
·····○····· 10mM sodium phosphate buffer (5.8-8.0)
– –▼– – 10mM Tris-HCl buffer (7.0-9.0)
—··▽—·· 10mM boric acid-NaOH buffer (8.0-10.6)
— —■— — 10mM sodium phosphate-NaOH buffer (10.0-12.0)

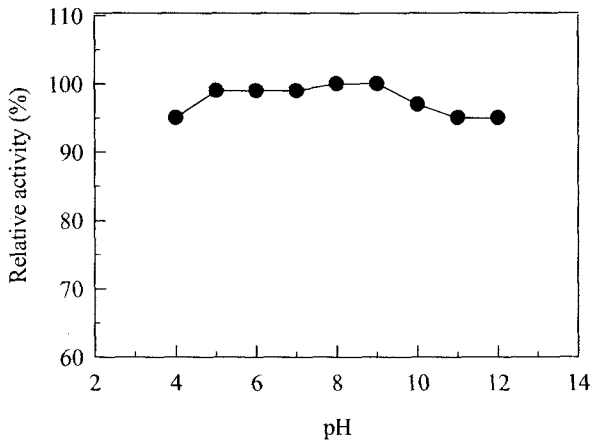


Fig. 23. Effects of pH on the agarase stability. The agarase reaction was carride out at 4^{o}C for 24hr in various pHs and the remaining activity was measured at each pHs.

라. 정제된 효소의 k_m 및 V_{max}

정제된 Eba1에 대한 agar의 기질 친화력을 측정한 결과를 Lineweaver-Burk plot로 나타내었다(Fig. 24). 이 plot으로부터 산출된 Michaelis constant (k_m) 값은 0.071 ㎎/㎖ 였으며, V_{max}값은 7.37 ㎎/㎖ · min인 것으로 확인되었다. 최대 효소 활성도(V_{max})는 원균주의 agarase보다 향상되었고 mutant의 agarase인 BagM7보다는 약간 저조한 수치를 나타내었지만 원균주의 agarase와 BagM7 agarase 보다는 k_m값이 훨씬 낮아서 기질친화력이 월등히 좋으므로 산업적으로 응용가치가 높을 것으로 사료된다.

마. Detergent의 영향

효소활성에 대한 detergent의 영향을 조사하기 위해서 각종 detergent를 1%(v/v)가 되도록 효소액에 첨가하여 40℃에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다 (Table 14). 그 결과, 모든 detergent들에 대해 효소활성이 영향을 받는 것으로 나타났으며, 특히 Tween 80과 SDS는 효소의 활성을 완전히 저해하는 것으로 나타났다.

바. 저해제의 영향

Eba1의 활성 중심에 관여하는 아미노산을 확인하기 위하여 여러 가지 화학수식제를 사용하여 효소활성의 저해정도를 측정하였다. 각 chemical의 최종 농도가 0.5mM, 1.0 mM, 5 mM, 10 mM이 되게 저해제를 효소용액에 첨가하여 40℃에서 30분간 반응시킨 후 그 잔존 활성을 측정한 결과는 Table 15와 같다. 화학수식제는 BgaM7과 동일하게 사용하였다.

3-Iodoacetic acid, NEM (N-ethylmaleimide), leupeptin과 같은 cysteine 잔기를 수식하는 chemical의 첨가에 의해서는 효소의 활성이 완전히 저해 되었으며, aspartic acid를 수식하는 Pepstain A에 의해서는 활성이 40% 감소되었다. Serine 수식제인 PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride), TPCK (N-tosyl-L-pheny- alanine chloromethyl ketone)와 Antipain hydrochloride는 효소의 활성에 아무런 영향도 주지 않았으나, TLCK (N-α-p-tosyl-L-lysinechloromethyl ketone)는 오히려 효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 그리고, metalloprotease의 활성을 크게 저해시키는 chemical인 1,10-phenanthroline는 오히려 Eba1의 활성을 250% 정도 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 효소활성 중심부위에서 cysteine이 중요한 역할을 하고, aspartic acid도 효소활성 중심부에 존재하고 있으나, serine은 효소활성 중심부위에 많이 존재하지 않는다고 추정할 수 있다. 그러나 TLCK나 1,10-phenanth-rolinephenan의 첨가로 효소의 활성이 200% 이상 증가된 현상에 대해서는 뚜렷한 해석이 어려우므로, 앞으로 더 깊이 있는 연구가 필요하다고 사료되어진다.

Table 13. Substrate specificity of the Eba1.

Substrate	Relative activity(%)
Agar	100.0
Agarose	73.0
Cellulose	–
Alginate	–
ι– Carrageenan	–
λ– Carrageenan	–
κ– Carrageenan	–
Dextran	–
Starch	–

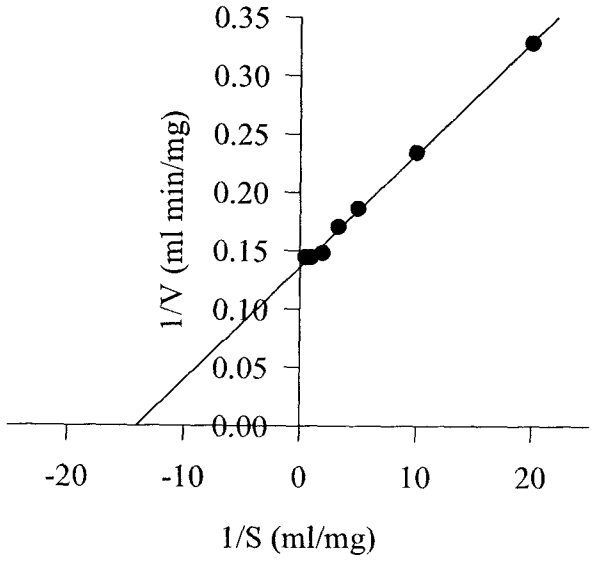


Fig. 24. Lineweaver-Bulk plot for determining k_m of Eba1 agarase

Table 14. Effects of detergents on the Eba1 agarase activity.

Detergents (1%, v/v)	Residual activity (%)
None	100.0
Tween 20	86.0
Tween 40	73.2
Triton X-100	58.5
SDS	36.0
Tween 80	1.6

SDS : Sodium dodecyl sulfate
Tween 20 : Polyoxyethylene sorbitan monolaurate
Tween 40 : Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate
Tween 80 : Polyoxyethylene sorbitan momooleate
Triton X-100 : Oxtylphenoxy polyethoxy ethanol

Table 15. Effects of inhibitors on the Eba1 agarase activity.

Inhibitors	Modification region	Residual activity(%)	
		5mM	10mM
None		100	100
3-Iodoacetic acid	Cysteine	22.9	20.0
NEM	Cysteine	0	0
1,10-phenanthroline	(metallo)	388.0	255.0
PMSF	Serine	100	100
TPCK	Serine	100	100
TLCK	Serine	316.9	-
		0.5mM	1.0mM
Antipain hydrochloride	Serine	110.9	100
Pepstatin A	Aspartic acid	57.9	62.2
Leupeptin	Cysteine, Serine	0	0

NEM: N-ethylmaleimide,
PMSF: Phenylmethyl-sulfonyl fluoride,
TPCK: N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone,
TLCK: N-α-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone

사. 금속이온의 영향

금속이온은 효소반응에 있어서 상승작용 또는 저해작용를 유발하는 인자가 될 수 있으므로 효소에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 1 mM 농도로 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.6에 녹인 다음 효소를 첨가하여 40℃에서 30분간을 방치한 후 금속이온들이 agarase 활성에 미치는 영향을 잔존 효소활성을 조사하여 측정한 결과는 Table 16과 같다. Fe^{2+}, Mn^{2+}는 효소의 활성을 100% 가량 증가시켰으나 나머지 Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Li^{+}, Na^{+}, Sn^{2+}, K^{+} 등은 효소의 활성을 완전히 저해시키는 것으로 나타났다. 대부분의 금속이온이 Eba1 효소의 활성을 저해시킨다고 볼 수 있는 결과이다.

아. Chemical의 영향

효소활성에 대한 chemical의 영향을 알아보기 위하여 각종 chemical을 최종 농도가 1mM이 되도록 효소용액에 첨가하여 40℃, 30분 동안 방치한 후 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과, chelating agent인 EDTA에 대해 효소활성이 100% 완전히 저해되었으며, urea와 sodium azide에 대해서는 각각 25%, 53% 활성이 감소되는 것으로 나타나 Eba1은 chemical에 대해 민감한 효소로 판단된다 (Table 17).

자. 환원제의 영향

효소활성에 대한 환원제의 영향을 알아보기 위하여 각종 환원제를 5mM이 되도록 첨가한 후 40℃에서 30분간 동안 방치하여 잔존활성을 측정하였다. 그 결과, β-mercaptoethanol에 대해서는 효소활성이 300% 증가되었으며, sodium sulfate, sodium citrate, cysteine에 대해서는 완전히 실활되는 것으로 나타났다 (Table 18).

6. 한천분해효소 대량생산을 위한 공정 개발

발효 생성물의 회수와 분리·정제는 어떤 상업적인 공정에서도 필수적이다. 발효액의 화학적 성질이 아주 복잡하거나 생성물이 아주 높은 순도를 요구하는 경우 분리와 정제는 많은 공정 단계를 필요로 한다. 발효생산물의 분리와 정제에 차지하는 비용은 전체 제조 비용 중 20 ~ 60 %를 차지하므로 어떤 경우에는 제조비용에 있어서 생성물 생산보다 더 많은 비용이 든다. 공정의 수율을 높이기 위해서는 공정장치의 선택이 중요하고 공정에 사용하는 장치는 배양이 끝난 배양물을 허용된 시간내에서 처리될 수 있도록, 적정한 능력을 가지고 있어야 한다.
앞의 결과에서 한천분해효소 생산 효율이 높아진 균주(*Bacillus cereus* ASK202-M7, *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1)을 이용하여 한천분해효소를 대량생산, 분리·정제하는 공정을 계획하였다. 실험실 수준의 발효조인 12L Jar fermentor를 이용하여 한천분해효소 생산 균주의 배양결과를 기초로 하여 얻을수 있는 한천분해효소 대량생산 공정을 모식화하였다(Fig. 25).

Table 16. Effects of various metal ions on the Eba1 agarase activity.

Metal ions (1mM)	Residual activity (%)
None	100
$FeCl_2$	205.5
$MnSO_4$	180.9
$MgCl_2$	82.5
$CuSO_4$	21.8
$Zn(NO_3)_2$	9.3
$CaCl_2$	4.9
K_2CrO_4	0
LiCl	0
NaCl	0
$SnCl_2$	0

Table 17. Effects of chemicals on the Eba1 agarase activity.

Chemicals (1mM)	Residual activity (%)
None	100.0
Urea	74.9
Sodium Azide	44.8
EDTA	0

Table 18. Effects of reducing agents on the Eba1 agarase activity.

Reducing agents (5mM)	Residual activity (%)
None	100.0
β-mercapto ethanol	407.1
Sodium sulfate	9.8
Sodium citrate	9.3
Cysteine	0

A는 용적이 10 ton인 미생물 발효기로 working volume 7 ton으로 1일간 미생물을 배양하면 1.1×10^7 unit의 효소를 대량생산할 수 있다. B, 원심분리기는 배양액에서 균체를 제거하기 위해 처리 용량이 2 ton/h인 멀티타입 연속식 원심분리기를 사용한다. 배양 상층액은 진공농축기(C)로 옮겨진다. 진공농축기는 처리용량이 1 ton/h이고 용적이 10ton으로 상층액은 30 %(v/v) 농축할 수 있다. 농축된 배양상측액은 한외여과장치(2 ton/day) (D)를 사용하여 불순물을 걸러내고, 효소부분만 따로 모아 다시 농축한다. 이때 농축된 효소를 그대로 사용할 수도, 고정화 과정을 거쳐서 사용할 수도 있도록 뒷과정을 진행할 수 있다. Gene cloning에 의해 개발된 균주(*E. coli* BL21(DE3)/pEBA1)는 돌연변이균주(*Bacillus cereus* ASK202-M7)에 비해 생육시간이 50% 단축된다는 장점이 있으며, 또한 배지조성 성분도 비교적 간단하여 대량생산에 더 적합하다. 그러나, agarase 유도체로 사용되는 IPTG가 독성물질이므로 IPTG를 대체할 수 있는 적당한 유도체의 개발이 필요하다(현재 개발 완료).

7. 한천올리고당 생산을 위한 효소 반응기 개발

본 연구에서는 기능성 한천올리고당의 생산성 증대를 위한 하나의 방법으로 한천분해효소의 고정화를 시도하고 고정화 한천분해효소의 반응 특성에 관하여 조사하였다. 또한, 기능성 한천올리고당의 연속 생산을 위해 고정화된 한천분해효소에 적합한 효소반응기를 제작, 운영하고 그 반응성을 조사하여, 기능성 한천올리고당의 대량생산을 위한 기초자료를 제시하였다.

가. 조효소의 제조

한국 남해안에서 분리하여 뛰어난 한천분해능을 지닌 것으로 확인된 해양세균 *Bacillus cereus* ASK202를 사용하여 그 배양액으로부터 균체를 제거한 후 배양 상층액만을 회수하였다. 회수된 배양상층액은 Millipore Co.(Massachusetts, USA)의 한외여과장치(PREP /Scale™ -TFF catridge, 30 kDa)를 이용하여 부분정제하였으며, 부분정제된 한천분해효소는 10mM MOPS 완충용액(3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid, pH 7.0)으로 투석하여 동결건조를 행하였다.

이후 동결건조된 조효소는 한천올리고당을 생산하기 위한 한천분해효소의 고정화에 사용하였다.

나. 고정화 효소의 제조

적절한 지지체 선정을 위해 천연고분자인 Na-alginate, chitosan (Sigma Chemical Co., USA), 합성고분자인 PVA(polyvinylalcohol, Sigma Chemical Co., USA)를 사용하여 각각 비드 형태의 고정화 효소를 제조하였다.

Na-Alginate : 3 %(w/v) Na-alginate 용액 5 ml에 agarase용액 5 ml (1 unit)를 첨가하여 혼합 시킨 후, 이 혼합액을 1.0 %(w/v) $CaCl_2$용액 100 ml에 syringe(2.4G×1")를 사용하여 적하시켜 고정화 비드를 제조하였다. 제조된 고정화 효소를 280nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 세척하여 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 26).

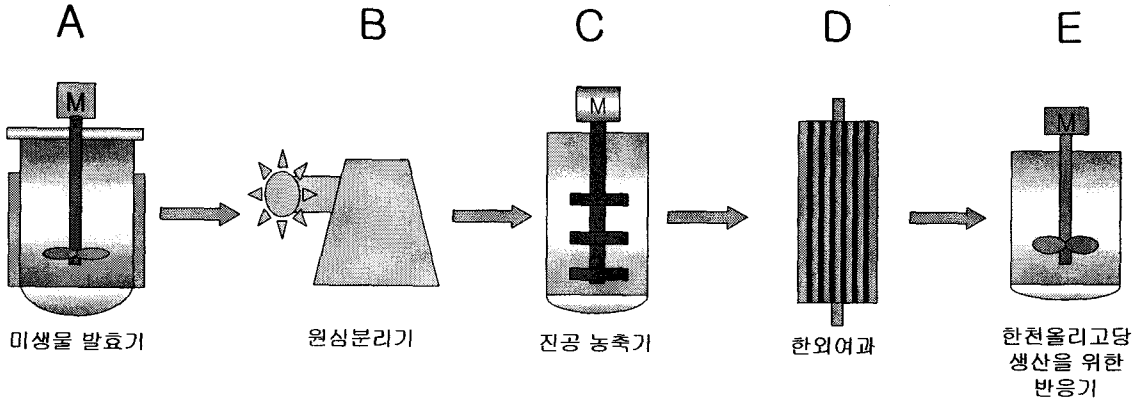


Fig. 25. Process for the producing agaro oligosaccharides

Chitosan : Chitosan 0.3 g을 0.5 %(w/v) glutamic acid, 10 ml에 넣고 용해 시킨 후, agarase 용액 5 ml(1 unit)와 혼합한 후 이를 2N NaOH에 적하하여 고정화 agarase를 제조하였다.

PVA : MOPS buffer 5 ml에 PVA 0.6 g을 첨가하여 가열, 냉각시킨 후, agarase 용액 5 ml(1 unit)를 혼합하였다. 혼합용액을 성형관(실리콘 튜브 직경 2 mm)에 넣어 -20℃에서 동결시킨 다음, 24시간 후에 해동시켰으며, 동결과 해동과정을 재차 반복한 후에 고정화 agarase를 제조하였다. 이를 일정한 크기로 절단하여 본 실험에 사용하였다.

다. 고정화 비드의 크기별 제조

고정화 비드를 다양한 크기별로 제조하기 위하여 Fig. 27와 같은 장치를 사용하였다. Na-alginate와 조효소용액의 혼합액을 peristaltic pump를 이용하여 제작된 고정화 장치내로 공급시키면서 측면으로부터 0.5 - 4.0 $kgf/cm^2 \cdot G$ 범위의 공기압에 의해 빠른 속도로 공기를 유출시킴으로서 Needle 끝부분에 방울형태로 형성된 지지체와 효소의 혼합액을 강제사출시켜 $CaCl_2$ 용액에 적하시켰다. 이때에 형성되는 비드 크기는 공급 공기압에 반비례하며, 형성된 50 개의 비드를 추출하여 Vernier caliper(Fowler, China)에 의해 평균직경을 측정하였다.

라. 고정화 지지체의 선정 및 최적농도

한천분해효소의 고정화를 위한 지지체의 선정에 있어서는 대표적으로 널리 이용되고 있는 Na-alginate, chitosan, PVA를 대상으로 검토하였다. 서로 다른 농도의 Na-alginate(1.0, 2.0, 3.0, 4.0 %), chitosan(1.5, 2.0, 2.5, 3.0 %), PVA(8, 10, 12, 14%)를 이용하여 겔 비드 형태의 고정화 효소를 제조한 후, 각각의 고정화 효소가 가지는 상대효소 활성을 조사하였다. 그 결과, 본문중에는 나타내지 않았으나 예비실험 결과로부터 Na-alginate, chitosan, PVA는 각각 3, 2.5, 12 %의 농도에서 가장 높은 상대효소 활성을 확인하였다. 또한, 각 지지체의 최적농도에서 고정화 효소의 활성을 비교·검토한 결과, 3 %(w/v) Na-alginate를 지지체로 이용하였을 때에 다른 지지체보다 높은 효소 활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 28). 따라서, 이후 실험에서는 3 %(w/v) Na-alginate를 이용하여 고정화 효소비드를 제조하였다.

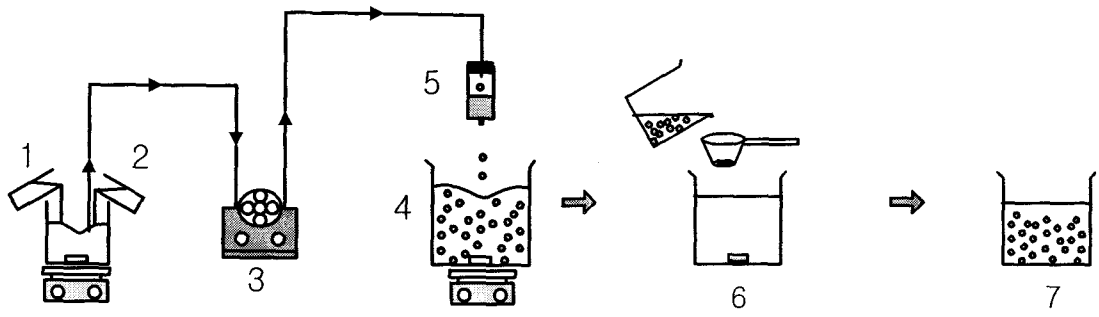


Fig. 26. Schematic diagram of a process for calcium-alginate bead preparation 1, Enzyme solution; 2, Na-alginate solution; 3, Peristaltic pump; 4, Calcium chloride solution; 5, Syringe; 6, Washing with distilled buffer; 7, Storage in buffer solution.

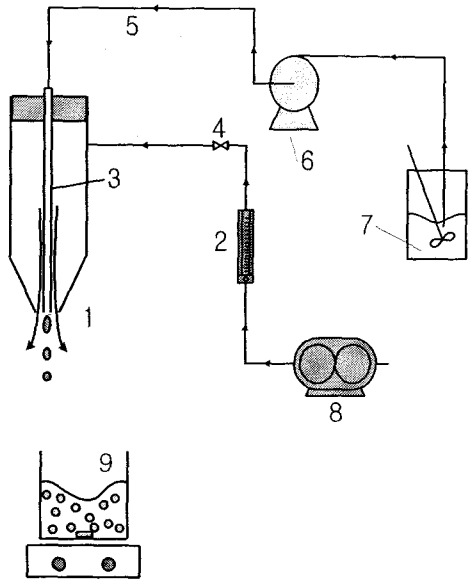


Fig. 27. Schematic diagram of the bead formationsetup with the dropping method. 1, Air outlet; 2, Air flow meter; 3, Syringe; 4, Control cock; 5, Silicon tube (ϕ1 mm) 6, Peristaltic pump; 7, Mixed solution; 8. Air compressor; 9, Gelling solution.

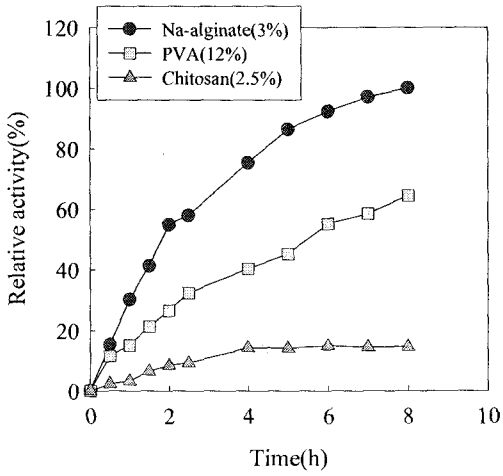


Fig. 28. Comparison of the relative activity of immobilized agarase on various matrix of Na-alginate, PVA and chitosan. Enzyme reaction was carried out in 0.1 %(w/v) agar and 10 mM MOPS buffer, pH 7.0 at 40 C.

마. 고정화 비드의 크기별 전환율

고정화 비드의 크기에 따른 전환율을 조사하기 위하여 비교적 간단한 고정화 비드 제조장치를 실험실에서 제작하였으며(Fig. 27), 이를 이용하여 공기의 유출속도를 달리하여 서로 다른 크기(0.8~2.4 mm)의 비드를 제조하였다. Fig. 29는 비드 제조장치로 공급되는 공기압과 그 때에 형성되는 비드의 크기를 조사한 결과이다. 공기압의 증가에 의한 공기의 유출속도가 빨라짐에 따라 형성되는 비드의 크기는 감소하였으며, 4 $kgf/cm^2 \cdot G$ 의 압력으로 공기를 공급 하였을때 약 0.8 mm의 직경을 지닌 비드가 형성되었다. 아울러 4 $kgf/cm^2 \cdot G$이상의 조건에서 0.6 mm의 비드로 제조는 되었으나, 강한 공기압으로 인하여 구형의 겔이 형성되지 않고 효소 반응시에 쉽게 파손되었으므로 실험에 사용하기에는 부적절한 것으로 확인되었다. 한편, 이와 같은 장치에 의해 제조된 고정화 효소 비드를 이용하여, 동일한 반응조건하에서의 기질에 대한 전환율을 조사하였다(Fig. 30). 그 결과, 기질의 전환율은 비드의 크기가 증가할수록 감소하였으며, 비드의 크기가 가장 작은(0.8 mm) 경우에 전환율이 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나, 실제적으로 이러한 다양한 크기의 비드를 반응기내에 충진하여 사용할 경우에는 비드의 크기가 작을수록 반응기내의 공극률 감소로 인한 반응기내 압력이 증가하고 비드가 쉽게 파괴되는 등 장기운전에는 부적절함을 확인하였다. 따라서, 전환율은 다소 낮지만 앞으로의 고정화 효소의 연속반응을 위한 반응기의 운전, 효율성 등을 고려하여 이후 실험에서는 2.4 mm 크기의 고정화 효소비드를 선정하여 각종 실험을 행하였다.

바. 고정화 비드의 강도 측정

고정화 효소를 사용하여 연속생산공정에 응용할 경우, 비드의 기계적 강도는 반응기의 장시간 운전에 크게 영향을 미치기 때문에 산업적 대량생산에는 고정화 비드의 강도가 중요한 역할을 한다. 따라서, Na-alginate 농도 변화에 따른 고정화 비드의 겔강도를 조사하였다(Fig. 31). Na-alginate의 농도가 증가함에 따라 비드의 강도가 비례적으로 증가되었으며, 4 %(w/v) Na-alginate에서 최대값을 나타내었다. 본문중에는 나타내지 않았으나 4 %(w/v)이상의 농도에서는 지지체의 높은 점성으로 인하여 구형의 비드가 형성되지 않았고 반응용액 중에서는 교반에 의해 쉽게 파괴되는 결과를 나타내었다. 한편, 각 농도별 비드의 겔 강도와 고정화 효소의 전환율을 비교·검토한 결과, 겔강도에 있어서는 다소 낮은 값을 보였으나 3 %(w/v)농도에서 가장 높은 상대 효소활성값을 나타내었다. 따라서, 비드의 강도 및 효소활성을 고려하여 이후 의 실험에는 3 %(w/v)농도의 Na-alginate를 이용한 고정화 효소 비드를 실험에 사용하였다.

또한, 효소와 지지체의 혼합액을 $CaCl_2$용액에 적하시켜 겔 비드를 제조하는 과정에서 겔화용액의 농도에 따른 비드의 강도 변화에 대해서도 조사하였다(Fig. 32). 그 결과, 초기 농도 1%(w/v)에서 가장 높은 강도를 보였으며 $CaCl_2$의 농도가 증가할수록 오히려 겔 강도가 다소 감소하는 경향이 나타났다. 그리고, 1 %(w/v)이하의 농도에서는 구형의 겔 비드가 형성되지 않음을 예비실험을 통하여 확인하였다.

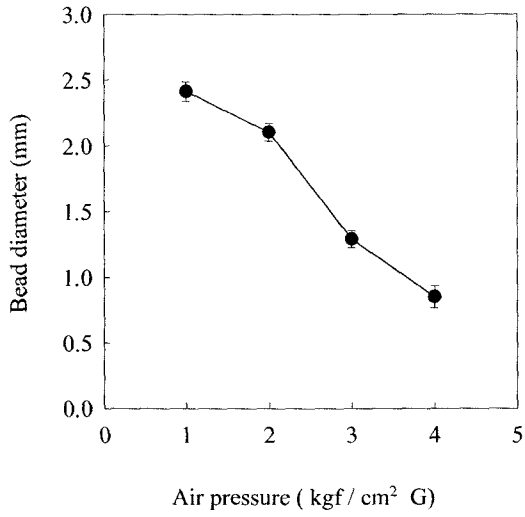


Fig.29. Effect of air pressure on the bead size.
The formation condition was carried out in 3%(w/v) Na-alginate and 1% (w/v) $CaCl_2$ at 4 C.

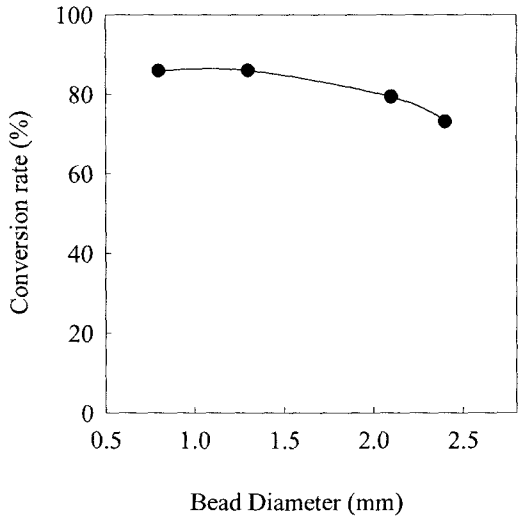


Fig. 30. Effect of bead sizes on the conversion rate of immobilized agarases. Conversion rate was measured at 40 C for 40min in 1% (w/v) agar substrate containing 10mM MOPS buffer, pH 7.0.

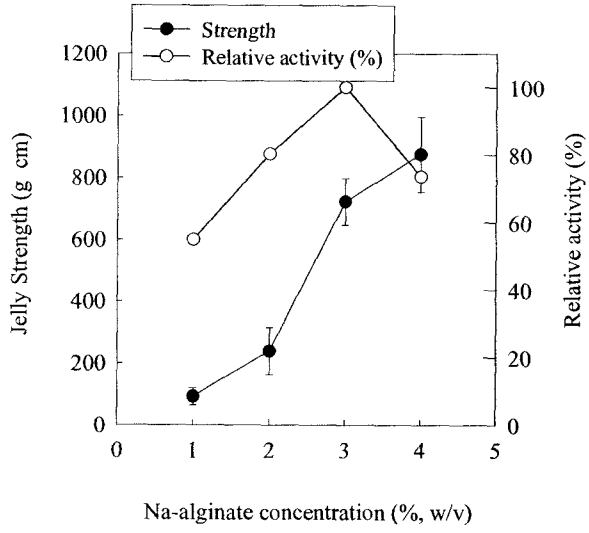


Fig. 31. Effect of matrix concentrations on jelly strength and enzyme activity. The used bead was formed in 1%(w/v) $CaCl_2$ and 10mM MOPS buffer, pH 7.0 at 4 C.

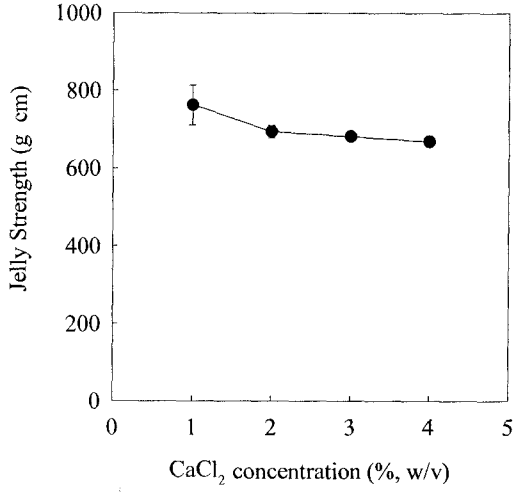


Fig. 32. Effect of $CaCl_2$ concentrations on jelly strength. The used bead was formed in 3%(w/v) Na-alginate and 10mM MOPS buffer, pH 7.0 at 4 C.

사. 고정화 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

3.0 %(w/v) Na-alginate 비드에 고정화된 효소의 활성에 미치는 반응온도의 영향을 free enzyme과 비교 검토하였다(Fig. 33). 그 결과, 고정화 효소와 free enzyme의 최적온도는 40℃로 동일한 값을 나타내었다. 그러나, 천연효소의 경우에는 45℃이상의 온도에서 급격한 효소활성의 감소를 보여, 60℃에서는 효소 활성을 거의 상실한 반면, 고정화 효소는 50℃까지 완만한 감소를 보였으며 이때의 효소활성은 최고활성의 약 80 % 이상을 유지하였다. 또한, 최적온도 이하에서도 고정화 효소는 free enzyme에 비하여 효소활성 안정성이 상대적으로 높게 나타났다. 따라서, 이와 같은 결과를 미루어 보아 한천분해효소를 Na-alginate에 고정화 시킴으로서 free enzyme에 비하여 열 안정성이 향상됨과 동시에 free enzyme에 비해 비교적 넓은 온도 영역에서 효소활성이 유지됨을 확인하였다.

아. 고정화 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

고정화 효소 및 천연효소 활성에 미치는 pH의 영향을 비교·검토하였다(Fig. 34). 그 결과, 각 최적 pH는 각각 7.0과 7.4로 고정화 효소의 경우에 상대적으로 약간 낮은 pH값을 나타내었으며, 전체적(pH 3~10.6)으로는 free enzyme은 알칼리성측에서, 그리고 고정화 효소는 산성측에서 상대적으로 높은 효소활성을 나타내었다.

한편, 최적조건하에서 고정화 효소 및 free enzyme에 의한 한천 기질로부터의 반응 생성물의 생성량 변화를 반응 시간별로 비교·검토하였다(Fig. 35). 반응초기에는 고정화 효소가 free enzyme에 비해 반응 생성물의 생성속도가 상대적으로 느리게 진행되었으나, 반응 약 3시간이 경과되면서부터 free enzyme과 비슷한 값을, 그리고 4시간 경과 이후부터는 오히려 고정화 효소에 의한 생성물의 양이 증대됨을 알 수 있었다. 이는 고정화 효소의 경우에 free enzyme에 비하여 반응은 상대적으로 느리게 진행되지만 지지체내에 효소가 고정화됨으로 인하여 효소의 실활속도가 느리기 때문에 그 활성이 보다 안정적으로 유지됨을 알 수 있었으며, 이러한 특성은 반응기를 이용한 연속생산공정의 운전에 있어 유리한 것으로 사료된다.

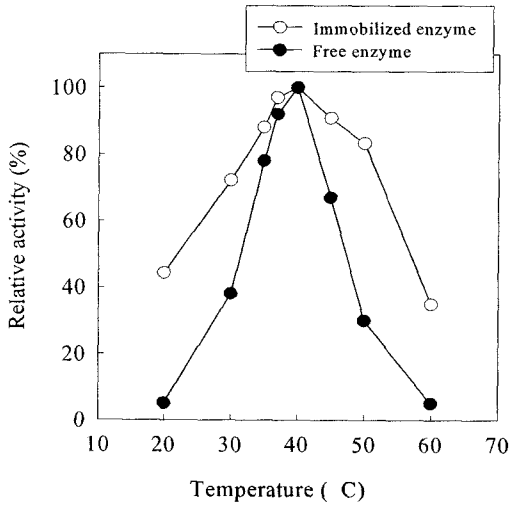


Fig. 33. Effect of temperature on the free and immobilized agarase activity.
Enzyme reaction solution in 10mM MOPS buffer, pH 7.0, was incubated for 30min at various temperatures.

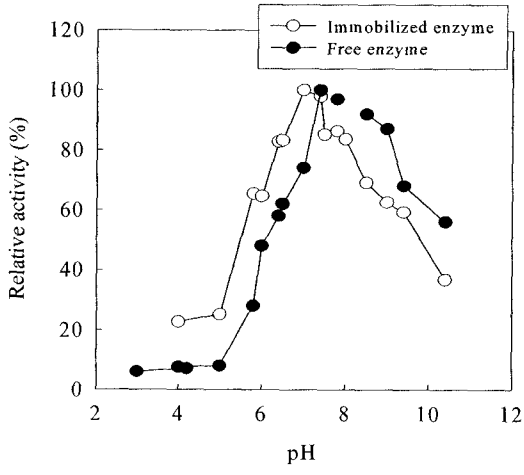


Fig. 34. Effect of pH on the free and immobilized agarase activity.
Free and immobilized agarase was incubated at 4 C for 24h in 10mM MOPS buffer. After incubation, enzyme reaction was carried out at 40 C for 30min and then the relative activity was measured.

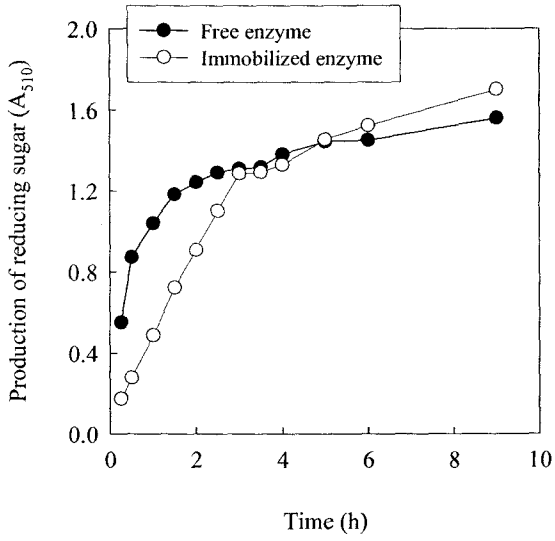


Fig. 35. Comparison of the reducing sugar production between free enzyme and immobilized agarase. Enzyme reaction was carried out in 10mM MOPS buffer, pH 7.0 and 0.1%(w/v) agar at 40 C.

8. 최적반응조건하에서 한천올리고당의 생산

지금까지의 실험결과로부터 선정된 고정화 효소의 최적반응조건하에서 회분식 반응기를 이용하여 생성되는 올리고당을 반응 시간별로 분석하였다 (Fig. 36). 반응초기에 기질인 한천은 아주 빠른 속도로 분해됨과 동시에 올리고당이 생산되었으며 반응시간 약 1.5시간 경과 후부터는 올리고당의 생성량이 거의 일정한 양상을 나타내었다. 생성되는 올리고당의 조성을 HPLC에 분석한 결과, 중합도 2당, 4당의 한천올리고당이 주 생성물이었으며 그 이상의 중합도를지닌 한천올리고당의 생성은 확인되지 않았다. 이는 빠른 초기 반응속도로 인하여 반응초기에 생성된 큰 중합도의 올리고당들이 4당과 2당의 올리고당으로 전환되었기 때문으로 사료된다. 또한, 효소반응 1.5시간 후의 기질인 한천으로부터 한천올리고당의 생성에 대한 전환율을 조사한 결과, 89 %의 높은 전환율을 나타내었다.

가. 고정화 효소의 반응 속도 상수

고정화 효소의 반응속도 상수인 K_m값과 V_{max}값을 Lineweaver-Burk plot식을 이용하여 구하였다. 그 결과, 고정화 효소의 K_m은 0.5 mg/ml였고, V_{max}값은 4.4 mg/ ml · min임을 확인하였다. 또한, 유리효소의 경우에는 K_m값은 3.4 mg/ml였고 V_{max}값은 20.8 mg/ml · min였다 (Fig. 37).

나. 고정화 효소 반응기

실험에 사용된 고정화 효소 반응기인 Packed-Bed 반응기(PBR) 모식도를 Fig. 38에 나타내었다. Packed-Bed 효소반응기는 두께 3 mm인 아크릴관을 사용, 제작하였으며 peristatic pump MP3(EYELA Co., Japan)를 이용하여 반응기내에 기질을 공급하고 반응된 효소생성물은 Fraction collector를 이용하여 시간별로 분리하였다. 또한 반응기내 온도를 일정하게 유지시키기 위해 water jacket형 이중관 형태로 설계하고 이때 반응기내에는 2 unit (1U/5ml)의 고정화된 β-agarase를 충진하였다.

다. PBR 반응기의 특성

PBR반응기는 반응기 내부에 단위면적당 최대한 많은 양의 효소를 충전하여 빈 공간을 최소화 시킴으로서 반응기 부피당 생산성이 최대인 특징이 있으며 연속혼합탱크형 반응기에 비하여 생산물 저해를 원활히 해결할 수 있다. 따라서 한천올리고당을 대량생산하기 위한 가장 효과적인 생물반응기라고 사료되어 Packed-Bed Reactor를 본 실험에 이용하였으며, PBR반응기의 효과적인 H/D비에 대한 생산수율을 조사하였다. 그 결과, Table 19에서 보여주는 바와 같이 반응기의 bed volume를 고정한 상태에서 H/D 비를 변화시켰을 때, H/D비가 증가함에 따라 반응산물이 점차 증가하는 경향을 보였으며, 반응기의 H/D 비가 14일 때 생산성이 18.1 mg/h로서 가장 효율이 좋은 것으로 나타났다. 이는 반응기내에 충진된 고정화 효소에 공급되는 기질용액이 효소와 접촉할 수 있는 체류시간이 길수록 반응기의 반응율이 높아 생산성이 비례적으로 증가한 것으로 판단된다.

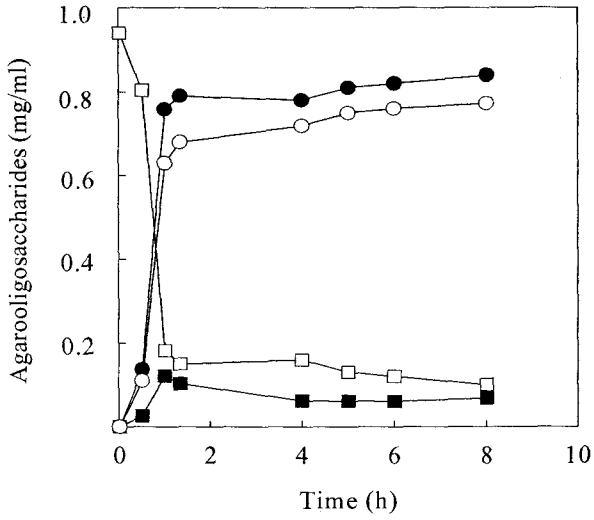


Fig. 36. Production of agarooligosaccharides under the optimal reaction condition in a batch reactor. Enzyme reaction was carried out at 40 C in 0.1%(w/v) agar and 10mM MOPS buffer, pH 7.0.
Symbols:● , Total agarooligosaccharides; ■ , DP4(agaro tetraose);○ , DP 2(agarobiose); □, Agar

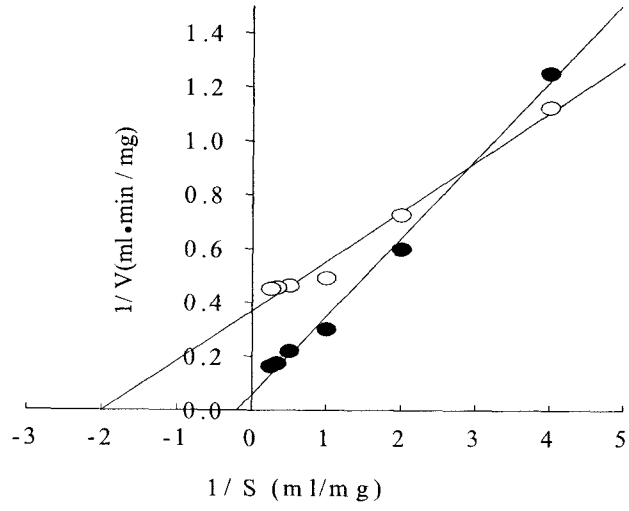


Fig. 37. Lineweaver-Burk plot for determining K_m and V_{max} of the free and immobilized agarase.
Simbols: ●, Free agarase; ○, immobilized agarase

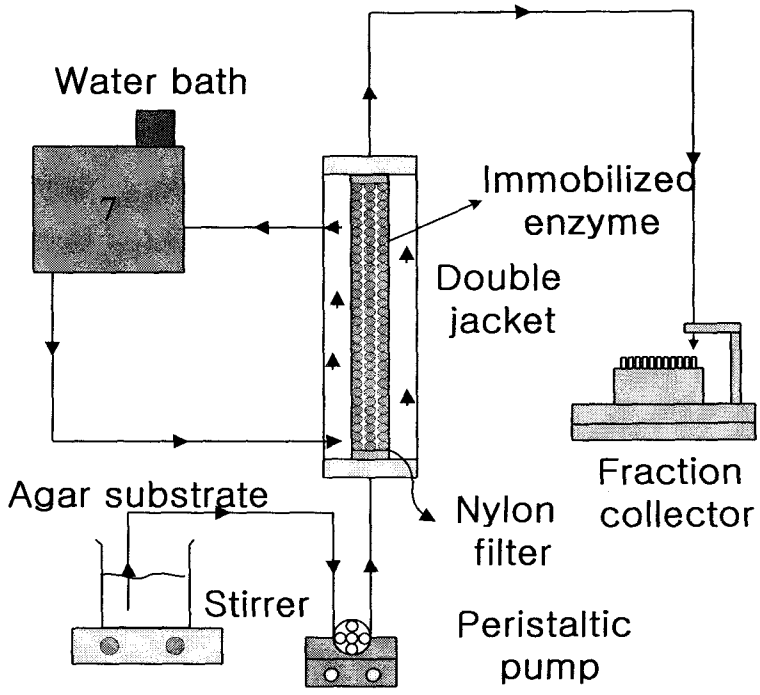


Fig. 38. Schematic diagram of the Packed-Bed Reactor.

Table 19. The effect of reactor sizes for the continuous production of agarooligosaccharides.

Reactor size (H/D, cm)		Bed volume (ml)	Height-to-diameter ratio	Productivity* (mg/h)
Height	Diameter			
14.0	1.0	11.0	14.0	18.1
7.0	1.4		5.0	16.1
4.8	1.7		2.8	12.1
3.2	2.1		1.5	7.3

* The reaction condition was 24㎖/h, 40℃, 2unit immobilized enzyme.

라. 기질의 농도 및 공급속도 변화에 따른 영향

고정화 효소 반응기의 운전에서 중요변수에는 기질 공급속도, 기질농도, pH 및 운전온도 등이 있으며, 기질 공급속도와 기질농도는 제품의 생산성에 직접적인 영향을 주는 변수들이고, pH 및 온도는 고정화 효소의 안정성에 결정적인 영향을 미치는 변수들이다.

이들 변수 중 직접적인 영향을 주는 기질 공급속도와 기질농도의 변화에 따른 기질전환율을 살펴보았다. 2.5 g/L 이상의 한천 기질농도에서는 부분적인 겔화현상으로 반응기를 운전하기에 부적합하였으므로 기질농도를 1 g/L와 2 g/L의 조건에서 기질 공급속도를 달리하여 전환율을 구한 결과를 Fig. 39에 나타내었다. 1 g/L의 한천을 기질로 사용하였을 때, 2 g/L에 비해 전환율이 높은 것으로 나타났으며, 이는 반응중 기질농도에 따른 확산율의 차이에 의해 나타난 결과로 사료된다. 또한 공급속도가 3 ml/h에서 48 ml/h로 점차 증가함에 따라 고정화 효소와 기질과의 접촉시간의 감소로 인해 전환율이 비례적으로 감소되는 것으로 나타났다.

한편, 기질농도와 공급속도는 반응기 단위부피당 생산성에 영향을 주는 인자로서 기질농도가 높고 기질 공급속도가 빠를수록 생산물이 증가되고, 한천과 같이 기질농도가 높은 고점성 다당의 경우 반응공정중 오염을 줄일 수 있고 제품화 과정까지의 농축비용를 절감할 수 있다는 장점이 있지만, 반응기 내부에서의 물질전달현상 저해 또는 기질의 반응기 내부로의 pumping에 어려움이 있다. 그러므로 한천의 특징인 저온에서의 겔화, 고점성의 문제가 해결된다면, 고농도의 한천기질을 사용함으로써 반응수율 증대와 대량의 기능성 한천올리고당을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

마. PBR 반응기의 운전 안정성

고정화 효소의 효소반응기내에서 장기운전 안정성에 대한 효소활성의 반감기를 조사하였다. 고정화 효소 반응기의 장기운전 안정성에 따른 결과는 Fig. 40.에 나타내었다. 반응초기부터 반응경과 30시간까지 일정량의 한천올리고당이 안정적으로 생산됨을 알 수 있었으며, 효소활성반감기는 약 42시간으로 나타났다. 이 결과로 미루어 보아 한천분해효소는 고정화하지 않고 사용할 때 보다 고정화된 한천분해효소를 반응기에서 운전함에 따라 장시간 사용할 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

바. 한천올리고당의 성분 분석

한천을 기질로 하여 생산된 한천올리고당의 조성성분 및 정량을 위하여 TLC 및 HPLC를 이용하여 분석하였다. 고정화 연속반응기내에서 시간별로 반응된 반응산물을 TLC로 분석하였다 (Fig. 41). 중합도(degrees of polymerization, DP)가 4당이 주생산물이며 6당, 2당 순으로 시간의 경과에 따라 생산되는 당의 조성이 달라짐을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 고정화 효소 반응기내에서 고정화 효소의 반응율이 점차 감소함으로 인해 나타난 결과로 사료되어지며, 반응시간의 조절로 다양한 조성의 한천올리고당을 얻을 수 있다는 가능성을 확인하였다.

본 실험에서 사용한 고정화효소 반응기에서 생산되는 한천올리고당을 고속액체크로마토그래피

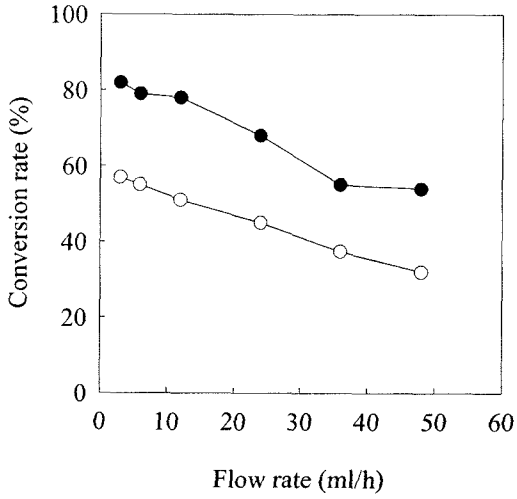


Fig. 39. Effect of flow rate and substrate concentration on the continuous production of agarooligosaccharides.
●, 1 g/l agar substrate; ○, 2 g/l agar substrate.
The reaction was performed with 10mM MOPS buffer pH 7.0 at 40 C.

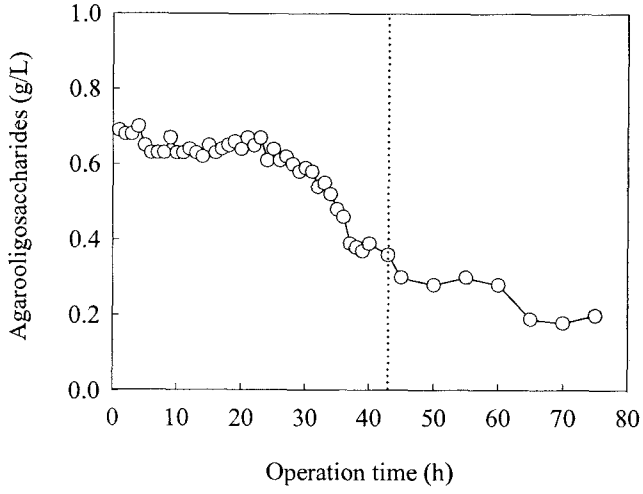


Fig. 40. Continuous production of the immobilized agarase.
The reactor was operated at flow rate of 24 ml/hr at 40 C using 1g/L agar solution.

(HPLC)를 이용하여 분석한 결과를 Fig. 42에 나타내었다. Agarobiose, agarotetraose, 그리고, agarohexaose가 생산되며 그 외 다른 성분은 검출되지 않았으므로 본 실험에서 사용한 고정화 효소 반응기에서 연속적으로 생산되는 생산물이 순도 높은 한천올리고당임을 확인하였다.

사. 반응시간에 따른 생성올리고당의 조성변화

연속적으로 생산된 한천올리고당을 시간별로 성분분석, 당정량하여 Fig. 43.에 나타내었다. 반응중에 생산되는 올리고당은 주로 DP4당이었고 DP6당, DP2당도 생성되었으며 반응시간 10h까지 DP4, 6, 2당 순으로 일정량 생산됨을 알 수 있었다. 13h 이후에는 DP2당이 검출되지 않았는데 이는 반응기내 고정화 효소의 반응율이 다소 감소된 결과로 사료되어진다.

아. PBR을 이용한 한천올리고당의 생산

한천올리고당을 대량생산하기 위한 기초적인 자료로써 PBR 반응기를 다중으로 연속2개 장착 연결하여 생산되는 반응물의 양을 비교 검토한 결과를 Table 20에 나타내었다. 한천기질의 공급량을 증가시킴에 따른 한천올리고당의 생산량은 비교적 유사한 수준이었으나, 생산율은 단일 고정화효소 연속반응기를 사용하였을 때 보다 기질공급량 48 ml/h(D : 4.36 h^{-1})에서 약 2.3배 가량 증가한 41.7 mg/h의 한천올리고당이 생산됨을 확인하였고, 이는 여러개의 PBR에 장착되는 반응기의 개수를 증가시킴과 동시에 기질 공급량을 증가시킨다면 한천올리고당의 생산율이 크게 향상될 것으로 사료되는 결과이다.

9. 고농도기질 사용을 위한 한천 기질의 입방화

일반적인 방법으로 기질인 한천을 용해시켜 효소와의 반응을 행할 시, 한천의 겔 형성능과 고점도는 효소의 활성을 억제시키고, 고농도 반응물을 얻고자 함에 있어 가장 큰 문제점으로 지적된다. 0.4 %이상의 기질 농도에서는 반응기질내에 부분 겔화가 진행되거나 확산저해 등의 요인 이 작용하여 다른 효소반응에서와는 달리 기질 저해작용이 일어나는 대표적인 효소 반응계로 기질의 농도에 반비례하여 효소 반응율이 크게 감소하는 경향을 나타낸다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 여러 가지 방법을 시도한 결과, 다음과 같은 방법을 이용하여 고농도 한천기질을 제조에 성공하였다.

가. 입방화 한천의 제조

시판되고 있는 한천을 20%(w/v) 농도로 증류수에 넣고 이를 고압멸균기내에서 121℃, 1.2기압, 30min 환경하에서 충분히 녹인 후, 실온으로 서서히 냉각하여 한천 겔을 형성시키고, 이것을 체(mash)를 이용하여 분쇄시켜 일정한 크기를 가지는 한천분말을 제조하였다(이 한천분말을 '입방화 한천'이라 명명하였다). (Fig. 44) 입방화 한천은 mash의 크기에 따라 다양한 size로 조절 가능하며, 이것을 농도별로 효소와 반응시킬 수 있으므로 각각의 조건들이 효소의 반응에 어떤 영향을 미치는지 다음과 같은 조사를 행하였다.

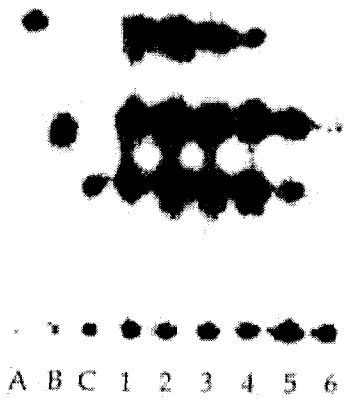


Fig. 41. TLC analysis of enzymatic hydrolytes from agar. A, agarobiose; B, agarotetraose; C, neoagarohexaose; 1, 2h; 2, 4h; 3, 8h; 4, 12h; 5, 16h; 6, 20h reaction. Operating condition were performed with an initial agar substrate concentration of 1 g/*l* at 40℃ and 10mM MOPS buffer, pH 7.0.

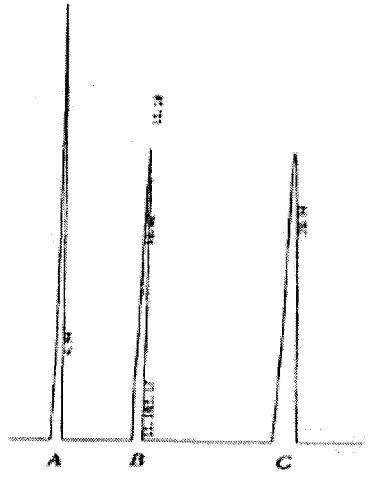


Fig. 42. HPLC pattern of the agarooligosaccharides produced by the enzymatic hydrolysis of agar. A, DP 6; B, DP 4; C, DP 2; DPs refer to degrees of polymerization of the products.

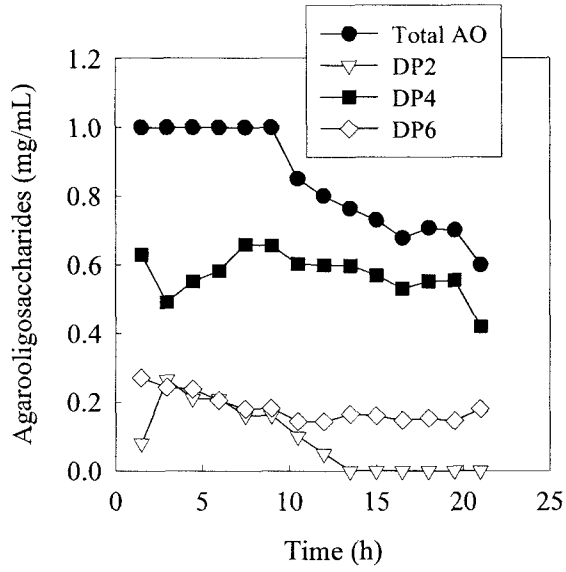


Fig. 43. Sugar composition of the agarooligosaccharides produced by Packed-Bed Reactor using immobilized agarase. Flow rate 24 ml/h, 0.1%(w/v) agar, 10mM MOPS buffer pH 7.0 at 40 C.

Table 20 Effect of multi Pack-Bed Reactor setup on production of agarooligosaccharides.

Flow rate (mℓ/h)	Total agarooligo-saccharides(mg/mℓ)	Dilution rate(h^{-1})	Productivity (mg/h)
12	0.881	1.09	10.6
24	0.879	2.18	21.1
36	0.858	3.27	30.9
48	0.868	4.36	41.7
60	0.696	5.45	41.8

나. 입방화 한천gel 농도에 따른 영향

20 %(w/v) 한천으로 제조한 입방화 한천을 각 중량별(1, 3, 5, 10, 15, 20, 25 g/100ml)로 첨가하여 한천분해효소와 반응시켰다. 기질로 사용된 입방화 한천의 첨가량의 증가와 비례하여, 생산되는 환원당량은 비례적으로 증가하였으나, 20g 이상 첨가시에는 생산량이 거의 비슷한 경향이 나타났다. 약 15 g/100ml (15 %) 입방화 한천을 사용할 때가 최적 조건으로 나타났다 (Fig. 45).

다. 효소 농도에 따른 영향

제조된 일정량의 입방화 한천(15 g/100ml)에 대하여 서로 다른 농도의 한천분해효소(0.1, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 units)와 반응시켜 기질과 효소의 최적비율을 조사하였다.

그 결과, 첨가되는 한천분해효소의 농도 증가에 비례하여 생성되는 환원당량은 증가되었으며 반응 20시간 후에 2 unit 이상의 효소를 첨가하면, 그 생산물의 증가가 크게 두드러지지 않는 것으로 나타났다. 그러므로 15 %의 기질에 2 unit의 효소를 첨가하여 20시간 반응시키면 12 g의 한천올리고당이 생산되어 전환율이 80 %로 매우 효과적인 반응결과를 얻을 수 있었다 (Fig. 46).

라. 반응산물의 분석

입방화 한천과 한천분해효소의 반응산물을 박층크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography)를 이용하여 분석하였다. 생성된 올리고당과 표준 한천올리고당의 R_f 값을 비교한 결과, 반응 1시간 경과시 중합도 2, 4, 6의 당과 중합도 8 이상의 올리고당이 생성되었으나, 5시간 경과 후 6당 이상이 분해되어 저분자의 올리고당으로 전환되는 것으로 나타났다(Fig. 47).

마. 반응 수율의 조사

본 연구에 의한 입방화 한천 기질의 경우, 효소가 반응함에 있어 기질 자체의 농도에 영향을 받지 않고 반응할 수 있어 기질 저해작용을 완전히 해소할 수 있었다. 이 방법은 효소자체가 안정적인 환경하에서 반응을 할 수 있으며 첨가되는 원료의 양을 증대시키기에도 용이하며 단순한 조작으로 기질의 농도를 높일 수 있다는 장점이 있다. 더욱이 특정한 물질을 첨가시키지 않고 단순히 천연 한천 그 자체만을 물리학적인 방법으로 변화시킨 것으로 생산물의 분리·정제시 별도의 과정을 첨가하지 않아도 된다는 큰 장점이 있다. 한편, 반응 후 생산되는 양은 한천을 입방화 시켜 생산해낸 양은 37.85 g/L으로써 기존방법에 의한 생산량 2.25 g/L보다 약 16.8배 증가됨을 확인하였다(Table 21). 이와같이 한천 겔을 입방화하여 생산공정에 사용함으로써 기존의 한천을 용해시킨 용액에서 반응시킨 방법보다도 더 높은 농도의 한천 기질을 사용 가능해졌으며 효소반응 생산공정 중에 한천의 고점도, 겔화의 문제점를 해결함으로써 생산물 증대에 크게 이바지함으로써 전체 생산 공정 개선에 크게 기여할 수 있다는 결과를 얻게되었다.

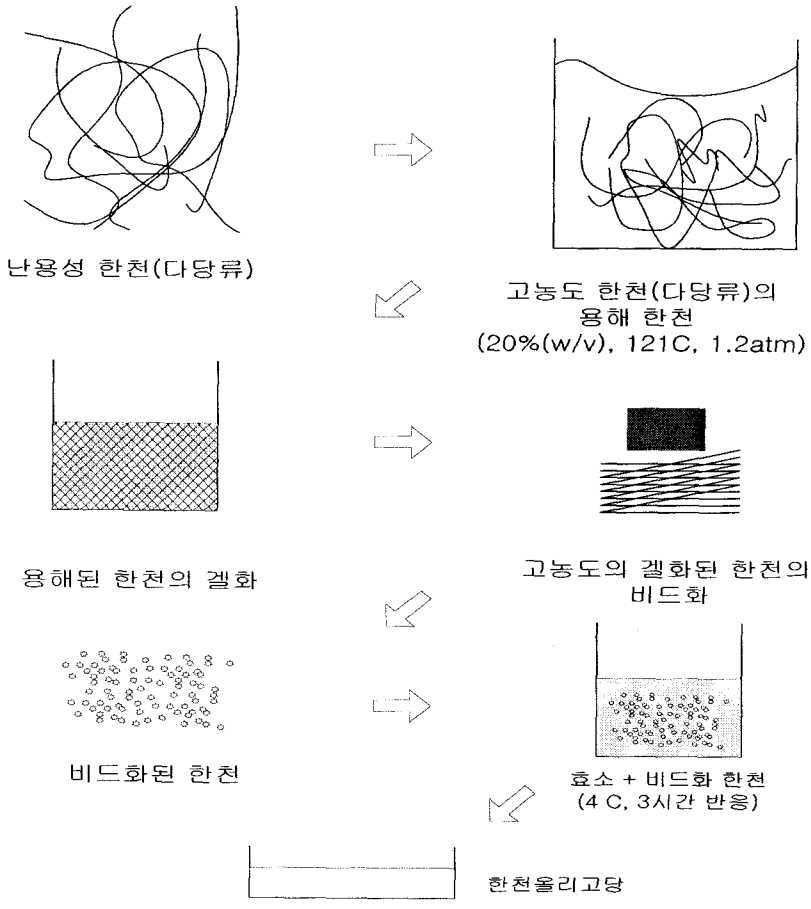


Fig. 44. Schematic diagram of the cubic agar formation process with high concentrated agar gel

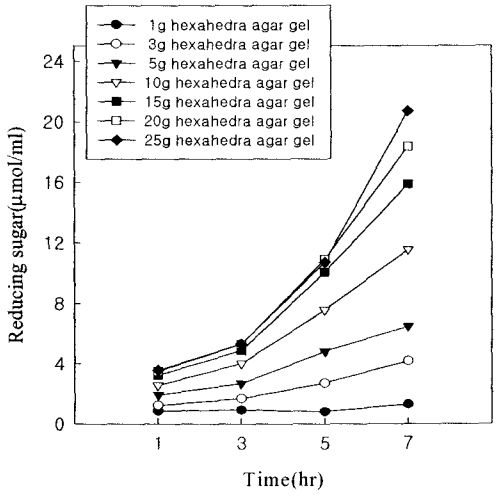


Fig. 45. Effect of substrate amount on the agarooligosaccharides production under 20%(w/v) hexahedra agar as substrate, 40℃, 10mM MOPS buffer, pH 7.0, 50ml.

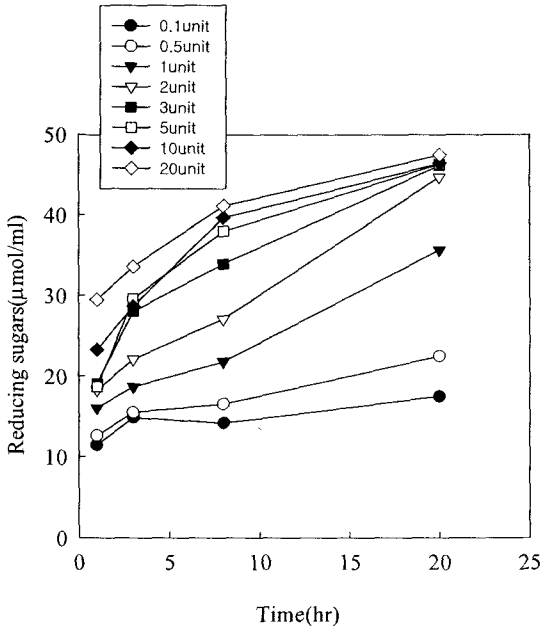


Fig. 46. Effect of enzyme concentrations on the agarooligosaccharides production under 20%(w/v) hexahedra agar as substrate, 40℃, 10mM MOPS buffer, pH 7.0.

10. 한천올리고당 대량생산 process 개발

가. 한천올리고당의 경제성 검토

본 항목에서는 한천올리고당 생산비용을 다른 올리고당 생산 공정과 비교하여 올리고당 생산 공정에서의 경제성을 분석하고자 하였다. 또한 한천올리고당의 원료인 한천원료의 확보가 용이하고 그 가격이 저렴하기 때문에 Agarase의 고정화에의한 올리고당 생산공정이 가능하다면 고부가가치를 창출할 수 있다고 분석되며 다른 올리고당 공정과 비교하여 공정에서의 큰 차이는 없지만 생산되는 한천올리고당의 농도가 낮기 때문에 이를 농축하는 공정에서 소요되는 비용의 증가가 예상되고 단위시간당 한천올리고당의 생산성이 낮아 생산설비의 증대가 요구되어지나 한천올리고당의 기능성이 충분히 연구되어진다면 낮은 한천올리고당 생산성으로도 한천생산공정의 운영이 가능하다고 여겨진다.

한천올리고당은 다른 올리고당에 비해 전분의 노화방지와 항충치성 및 난소화성, 장내의 비피더스균의 증식 활성과 정균작용등의 기능을 가지고 으며, 특히 이들 일반올리고당이 가지지 않은 면역활성, 항암작용, 항산화기능, 항돌연변이능을 가지고 있어 식품의 영양기능, 감각기능과 생체조절기능의 기능성 식품소재로서의 이용이 기대되고 있다. 산업화되어 판매되는 올리고당 중 한천올리고당과 그 기능성 면에서 견줄 수 있는 당으로는 키토올리고당을 예로 꼽을 수 있다(키노올리고당 보다 한천올리고당의 기능성 더 뛰어나다). 가격면에서 보면 일반 올리고당은 kg 당 3,000-6,000원으로 한천올리고당(80,000-100,000원)에 비해 매우 저렴하다. 그러나 기능성 면에서 비교될 수 없는 우수성이 있으므로 이점을 부각시켜 소비자들에게 인식된다면 현재의 넓은 올리고당 시장 진출도 가능할 것으로 분석되고 있다. 한천올리고당보다 비싼 키토올리고당이 다른 올리고당보다 뛰어난 기능성으로 소비자들에게 인지도 높은 건강보조식품으로 각광받는 것을 보면, 한천올리고당의 시장확대도 어려운 일이 아닐 것이며, 특히 키토올리고당 보다 저렴한 제조단가, 그리고 뛰어난 기능성 면을 부각시키면 기존 당류와 경쟁 가능성도 무한하다(Table 22).

또한, 자체적인 시장 조사 결과, 소비자들은 가격보다, 제품의 질과 뛰어난 기능성에 대해 구매욕구를 느끼는 것으로 나타나, 한천올리고당의 시장확대 가능성은 밝다.

나. 한천올리고당의 생산 공정

한천올리고당 생산 공정은 크게 기질인 한천의 액화공정, 효소첨가 후 당화공정, 반응기에서 생산된 한천올리고당의 농축공정으로 분류할 수 있다. 또한 반응물을 여과, 탈염, 탈색하는 공정은 추가로 첨가되어져야 하는 공정이다.

본 연구에서는 이러한 공정을 가지고 한천올리고당을 생산하는 데 있어 각 공정의 운전조건과 공정효율을 높이기 위한 최적 생산 process를 설계하고자 하였다.

기질로 크게 두 가지의 한천을 사용하였다. 1 kg에 단가가 3만원인 식용실한천(1차가공품)과 8 만원/1kg 인 시약용 분말한천(2차 가공품)을 각각 70, 80, 90, 100, 110, 120℃의 온도에서 10~60분간 10분간격으로 가열하며 액화되는 정도를 관찰하였다. 그 결과, 0.3%/5L 기준의 조건

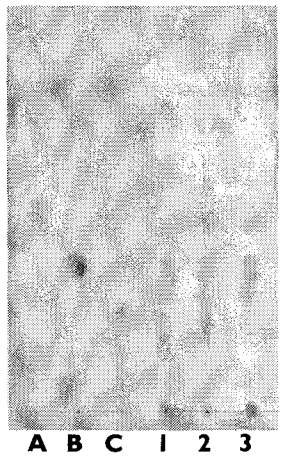


Fig. 47. TLC analysis of enzymatic hydrolytes from hexahedra agar
A, Neoagrobiose; B, Neoagarotetraose; C, Neo-agarohexaose;
1, 1 hr reaction; 2, 2 hr reaction; 3, 5 hr reaction

Table 21. 반응공정에서의 한천 기질의 일반적인 방법과 겔 비드화 방법의 비교

	일반적인 한천 기질	입방화 한천 기질
기질의 사용 가능량(%, w/v)	0.3	20
반응시간(hr)	2	5
전환율(%)	78	79
생산량(g/L)	2.25	37.85

건에서 실한천은 70~80℃에서 30분 반응시 완전히 액화되었으나, 분말한천을 100℃이상에서 가열하여야 완전히 액화되었다.

소규모(100ml)의 조건에서는 3분이내에 모두 액화되던 것에 비해 50배 증가된 부피에 대해 그 속도가 많이 둔화되는 것으로 나타났으며, 이것을 기준으로 하여 반응기의 설계 및 기질 액화 조건을 결정하였다.

0.3% 이상의 농도에서는 효소의 최적 활성 온도인 40℃에서 기질이 semi solid 또는 solid 상태로 굳어버리므로 이런 문제점은 앞서 밝힌 한천 입방화 기질을 사용함으로써 해결 가능하였다.

다. 흐름도의 설계

한천올리고당의 생산에서 기질을 반응기에 공급하여 생산된 올리고당액을 농축공정을 거쳐 분말과 액상농축액으로 제품화하는 전체적인 한천올리고당의 생산공정에 대한 흐름도를 설계하였다(Fig. 48).

기질은 가격이 저렴하며 대량생산에 사용할 수 있는 실한천을 기준으로 하였다.

한천올리고당 생산의 액화공정은 기질인 한천용액을 80℃, 30분간 액화시킨 후, 반응기에서 효소가 고정화된 비드와 40℃, pH 7.0에서 충분히 교반시켜 반응시킨 다음, 반응기에서 생산된 올리고당액을 여과공정을 거쳐 이온교환수지에서 탈색과 탈염을 하고 이를 60℃의 진공증발기에서 농축하고자 하였다. 농축액은 결정화하여 충분히 건조시킨 후 분쇄기에 의해 한천올리고당 분말로 만들거나 농축액을 엑기스로 제품화 하였다.

라. 한천올리고당의 생산

기질 액화, 한천올리고당 제조, 농축까지의 공정을 하나의 반응조내에서 가능하도록 설계된 50L 반응조에서 한천올리고당을 시험 생산하였다(Fig. 49). 이 장치에서 최적조건으로 1batch 당 3.8kg의 분말한천올리고당을 생산하였다.

마. 한천올리고당의 생산을 위한 공정설계

한천올리고당 생산 공정의 설계에서 액화는 80, 90, 100, 110, 120℃에서 10분간 액화시킨 결과 80℃이상에서 완전히 이루어졌다. 본 연구에서는 액화공정을 80℃, 30분, 압력 1 kg/cm^2으로 설계하였으며, 또한 액화된 기질의 겔화에 대한 실험을 행하여 보았다. 0.3% 액화된 기질의 겔화는 교반이 없는 경우 35, 40℃에서 40분이내에 겔화되었고 150 rpm으로 교반을 한 경우에는 40℃에서 겔화가 서서히 진행되어 10시간 이후에도 완전히 겔화되지 않았다. 실험결과로부터 0.3 % 기질을 사용하여 한천올리고당을 생산하는 공정에서 반응기의 온도는 40~43℃를 유지하고 반응기내에 충분 교반이 이루어지도록 해야한다.

Table 22 일반올리고당과 한천올리고당의 비교

특 성		한천올리고당	키토올리고당 (키토산)	기존 올리고당
기능성	정장작용	우수	우수	보통
	항균작용	우수	우수	보통
	콜레스테롤 저하능	우수	우수	보통
	면역활성	우수	우수	없음
	항암작용	우수	보통	없음
	항산화기능	우수	보통	없음
	항돌연변이능	우수	없음	없음
순도		95-96%	50-70%	33-55%
가격(원/kg)		80,000-100,000	80,000-200,000	3,000-6,000원

생성된 올리고당에 고분자 물질이 남아 있어도 올리고당의 기능성에 변함이 없고 올리고당액의 염농도가 우려될 정도가 아니므로 여과공정, 탈색공정, 탈염공정을 거치지 않고 바로 반응기에서 농축공정으로 진행하여도 되었다. 농축공정은 농축할때의 온도를 낮추기위해 증발기내의 압력을 감압하여 올리고당의 비점을 낮게 할 수 있는 진공증발기의 원리를 사용하였다. 농축액은 올리고당 엑기스나 농축액을 결정화하여 건조시킨후 올리고당 분말로 제품화 할 수 있다.

바. Scale-up에 대한 설계기준의 설정

한천 올리고당 생산의 실험장치를 통하여 얻어진 자료와 현재 생산되고 있는 올리고당의 생산공정을 검토하여 한천올리고당 대량생산의 Scale-up에 대한 설계기준과 조작조건을 설정하고자 하였다.

한천올리고당 대량생산 공정에서 액화된 기질을 원료 탱크에서 반응기로 연속적으로 공급하기 위해서는 액화된 기질이 겔화되지 않은 대용량의 원료저장 탱크가 필요하다. 또한 탱크내의 기질 온도를 50℃이상 유지하였다가 반응기로 공급될 때는 41~43℃로 유지시켜야 한다. 회분식으로 기질을 공급하고 일정 시간 후 이를 여과공정과 농축공정으로 보내는 교반식 반응기로 설계하였다. 이는 알지네이트 비드의 기계적 안정성의 저해가 염려되기 때문에 교반식 반응기의 구조 설계시 반응기 내부에 방해판을 설치하여서는 안된다. 그리고 농축 과정을 위해 반응기에는 감압장치를 설치하여야 한다.

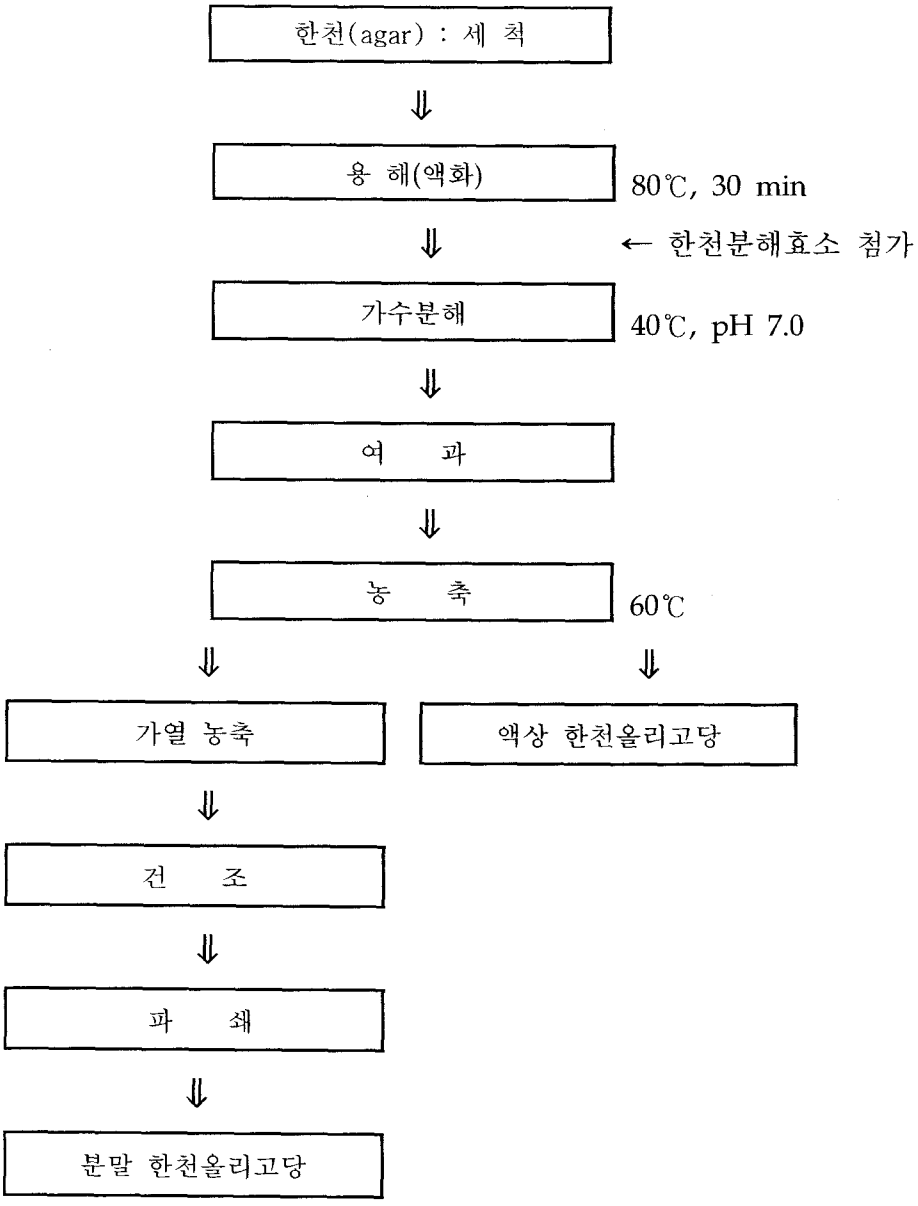


Fig. 48. Poroduction process of agarooligosaccharides.

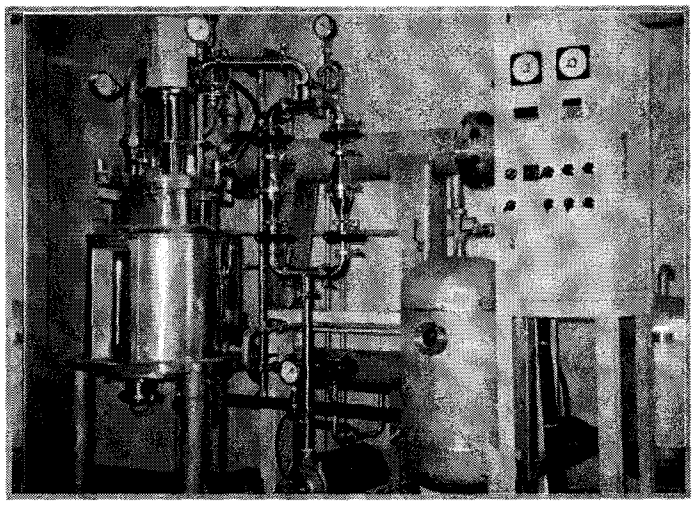


Fig. 49. 한천올리고당 반응조

제 4 절 참고문헌

1. **Agbo, J. A. C., and M. O. Moss.,** 1979. The isolation and characterization of agarolytic bacteria from a low land river. J. Gen. Microbiol. **115**: 355-368.

2. **Baumann, P., A. L. Furniss, and J. V. Lee.,** 1984, In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1-4, Williams & Wilkins, Baltimore.

3. **Belas, R., D. Bartlett, and M. Silverman.,** 1988, Cloning and Gene Replacement Mutagenesis of a *Pseudomonas atlantica* Agarase Gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(1), 30-37.

4. **Bonnin, E., and J. F. Thibault.,** 1996, Galactooligosaccharide production by transfer reaction of an exogalactanase, *Enzyme Microb. Technol.*, **19**(8), 99.

5. **Buttner, M. J., I. M. Fearnley, and M. J. Bibb.,** 1987, The Agarase Gene(dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) : Nucleotide Sequence and Transcriptional Analysis, *Mol. Gen. Genet.*, **209**, 101-109.

6. **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.

7. **Chung, M. C., H. K. Chun, H. J. Lee, C. H. Lee, and Y. H Kho.,** 1995, Characterization of the Mutant of Streptovyces sp. SL-387(KCTK 0102BP) Producing Aminopeptides M Inhibitors, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**(1), 47-52.

8. **Cran, P. S., S. V. Rhee, and D. F. Steel.,** 1970, Experiednce with 1079 case of cancer of the stomach seen in Korea from 1962 to 1968, *Amer. J. Surgery*, **120**, 747.

9. **Dubey, U. K., and V. V. Mistry.,** 1996, Effect of Bifidogenic Factors on Growth Characteristics of Bifidobacteria in Infant Formulas, *J. of Dairy Science*, **79**(7), 1156.

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

11. **Fang, T. J., and T. Y. Chiou.,** 1996, Batch Cultivation and Astrxanthin Production by a

Mutant of the red Yeast, *Phaffia rhodozyma* NCHU-FS501, **16**:175-181.

12. 食品産業バイオリアクタ-システム技術研究組合 (1990), 實踐バイオリアクタ-, 初版, pp87-105, 株式會社食品化學新聞社, Tokyo.

13. 河野敏明, 日高秀昌 1989, ネオアガロオリゴ糖の特性とその生産技術, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **63**(6), 1126-1129.

14. 河野敏明, 山口美樹, 山口吾一, 日高秀昌, 三好照三, 北川廣進, 平賀哲男, 片所 功 1988, 寒天分解酵素生産菌の分離とその酵素の性質, 日本水産學會大會講演要旨集, p345, Tokyo.

15. Han, K. W., B. G. Jung, and S. D. Kim., 1992, Genetic Transformation of Biocontrol Agent *Bacillus* sp. YBL-7 by Plasmid pE194, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(4), 384-389.

16. Hopwood, D. A., K. F. Chater, J. E. Dowding, and A. Vivian., 1973, Advances in *Streptomyces coelicolor* Genetics, *Bacteriological Reviews*, **37**(3), 371-405.

17. Hwang, S. H., S. D. Ha, J. D. Kim, S. K. Kim and J. Y. Kong,, 1995, Isolation and purification of agarase from marine microorganism(*Pseudomonas* sp. W7), The 3rd Academic Plaza in International Exhibition '95, 70-71, Makuhari, Japan.

18. Iwasaki, K. I., M. Nakajima, and S. I. Nakao., 1996, Galacto-oligosaccharide Production from Lactose by an Enzymic Batch Reaction Using β-Galactosidase, *Process Biochemistry*, **31**(1), 69.

19. Lee, H. W., B. J. Kim, S. H. Hwang and J. Y. Kong., 1997, Isolation and identification of marine bacterium Bacillus cereus ASK202 and optimal culture condition for the production of agarase. *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **12**(2), 228-235.

20. Leon, O., L. Quintana, G. Peruzzo, and J. C. Slebe., 1992, Purification and Properties of an Extracellular Agarase from *Alteromonas* sp. Strain C-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(12), 4060-4063.

21. Kim D., and J. F. Robyt., 1994, Production and Selectino of Mutants of *Leuconostoc mesenteroides* Constitutive for Glucansucrases, *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 659-664.

22. **Kong, J. Y., and S. K. Bae.,** 1996, 海洋微生物による機能性食品素材(寒天オリゴ糖)の生産, The 4rd Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition '96, 64, Makuhari, Japan.

23. **Kong, J. Y., S. K. Bae, S. H. Hwang, S. D. Ha, H. T. Kim, S. K. Kim, and B. J. Kim.,** 1996, Purification of Extracellular Agarase from Marine Bacterium (*Pseudomonas* sp. W7) and Molecular Cloning of the Agarase Gene, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**(1), 37-45.

24. **Kong, J. Y., S. H. Hwang, B. J. Kim, S. K. Bae, and J. K. Kim.,** 1997, Cloning and Expression of an agarase Gene from a Marine Bacterium *Pseudomonas* sp. W7, *Biotechnol. Lett.*, **19**(1), 23-26.

24. **Kim, B. J., S. D. Ha, D. J. Lim, C. M. Song and J. Y. Kong.,** 1998, Produciton of agarooligosaccharides using of agarase from marine bacterium Bacillus cereus ASK202. *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **13**(5), 524-529.

25. **Kong, J. Y., S. H. Hwang, B. J. Kim, S. D. Ha, S. K. Kim, and J. D. Kim.,** 1995, Purification of Extracellular Agarase of Marine Microorganism (*Pseudomonas* sp. W7) and Molecular Cloning of the Agarase, The First Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference '95, p57, Shimizu, Japan.

26. **Malmqvist, M.** 1978, Purification and Characterization of Two Different Agarose-Degrading Enzymes, *Biochimica et Biophysica Acta*, **537**, 31-43.

27. **Na, K. H., H. J. Kim, G. W. Kim, K. T. Kim, J. H. Lee, and J. I. Yang.,** 1991, Selection of High Tobramycin-Producing Mutants, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(4), 343-347.

28. **Nord, C. E.** 1996, In Vitro Activity of Quinolones and Other Antimicrobial Agents Against Anaerobic Bacteria, *Clinical Infectious Diseases*, **23**(Suppl 1), S15.

29. **Park, H. K., J. S. So, and T. R. Heo.,** 1995, Acid Adaptation Promotes Survival of Bifidobacterium breve Against Environmental Stresses, *Foods and Biotechnol.*, **4**(4), 226.

30. **Shim, C. W., W. C. Shin, and J. H. Yu.,** (1991), Isolation and Identification of Alkalophilic Microorganism and Its Mutant Growing at Neutral pH, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(6), 543-547.

31. **Somogyi, M,** 1952, Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.

32. **Son, K. H., H. K. Kwon, H. W. Lee, and S. H. Bok.,** 1991, Effect of Some Factors on the Production of an Antifungal Compound KRF-001 from *Bacillus subtilis* subsp. *krictiensis, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**(6), 614-618.

33. **Song, M. R., D. W. Lee, S. W. Park, K. S. Bae, and H. M. Park.,** 1992, Isolation and Characterization of Saccharomyces cerevisiae Mutants Deficient in (1→3)-β-D-Glucan Synthese, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(6), 642-646.

34. **Stanier, R. Y.** 1942, Agar-decomposing strains of the *Actinomyces coelicolor* species-group, *J. Bacteriol,* **44**, 555-570.

35. **Sugano, Y., I. Terada, M. Arita, M. Noma, and T. Matsumoto** (1993), Purification and Characterization of a Nex Agarase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(5), 1549-1554.

36. **Thomas, C. E., and P. F. Sparling.,** 1996, Isolation and Analysis of a fur Mutant of Neisseria gonorrhoeae, *J. of Bacteriol.*, **178**(14), 4224-4232.

37. **Van Hofsten, B., and M. Malmyvist.,** 1975, Degradation of Agar by a Gram-Negative Bacterium, *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 150-158.

38. **Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu, H. Shigeiri, and T. Shibata.,** 1991, Purification and Some Properties of Agarase from *Pseudomonas* sp. PT-5, *Agric. Biol. Chem.*, **55**(10), 2531-2536.

39. **吉村功.** 1989, 毒性・藥效 デ-タの 統計分析 -事例研究によるアプロ-チ- 中 LD_{50}の 推定法, 226-233, サイエン-テスト社

40. **吉積智司, 太田明一, 田村力,** 新食品開發用素材便覽, 157-216, 平成3年, 光琳.

41. **粟飯原景, 昭内山, 充編著,** 1993, 食品의 安全性 評價, 133-163, 한림원.

42. **정은영, 이진성, 배재근, 이완규, 김병홍.,** 1993, 산소와 염농도가 한국전통 발효식품에 생장하는 혐기성 세균과 *Bifidus*균의 생육에 미치는 영향, *Microbial. Biotechnol.*, **21**(1), 82.

43. **박종현, 유진영, 신옥호, 신현경, 이성준, 박관화.,** 1992, 분지 올리고당이 장내 주요 세균의 생육에 미치는 영향, *Microbial. Biotechnol.*, **20**(3), 237.

44. **신현경, 신옥호, 구영조.,** 1992, 감자 단백질이 *Clostridium perfringens* 및 주요 장내 미생물의 생육에 미치는 영향, *Microbial. Biotechnol.*, **20**(3), 249.

45. **박헌국, 강동현, 윤석환, 이계호, 이세경, 지근억.,** 1992, 한국인 분변으로부터 분리한 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 효소 Pattern, *Microbial. Biotechnol.*, **20**(6), 647.

46. **김창곤, 김수일, 신현경.,** 1993, 돼지감자 Fructo 올리고당-inulin이 돼지의 주요 장내세균의 생육에 미치는 영향, *한국식품과학회지*, **25**(4), 395.

47. **여나임, 이세경, 지근억.,** 1993, *Bifidobacterium* sp. Int-57 α-galactosidase의 효소특성, *한국식품과학회지*, **25**(6), 689.

48. **지근억, 이세경.,** 1993, 한국인 분변으로부터 분리된 *Bacteroides fragilis* Roid 8의 Glycosidase 패턴, *한국식품과학회지*, **52**(2), 191.

49. **이기용, 황인범, 허태련.,** 1997, Calcium Carbonate Buffer System을 이용한 *Bifidobacterium longum*의 배양 효율 증대에 관한 연구, *한국식품과학회지*, **29**(1), 126.

50. **이현아, 이상선, 신현경.,** 1997, 사과의 식이섬유질이 장내세균의 *in vitro* 생육에 미치는 영향, *한국식품과학회지*, **29**(1), 107.

51. **전영중.** 1997, 생물변환기술에 의한 기능성 당류의 산업적 생산, *식품산업과영양*, **2**(1), 10.

52. **서진호.** 1994, 국내올리고당 연구 및 개발동향, *식품과학과 산업*, **27**(4), 8.

53. **허경택.** 1995, 올리고당의 생리기능 특성, *식품과학과 산업*, **28**(3), 24.

54. **김상용, 오덕근, 김석신, 김철재.,** 1996, 무설탕 과자 제조에 사용되는 신규 감미료, *식품과학과 산업*, **29**(3), 53.

55. **윤택구.** 1981, 암의 원인과 환경, *한국환경성돌연변이 발암원 학회지*, **1**, 39.

56. 한국과학재단 1993, 녹황색 채소 및 민간 항암 약재로 부터의 항돌연변이 및 항암물질 분리, 동정과 이들의 생화학적 항암 기작에 관한 연구.

57. **김민선, 배재민, 박희준, 정해영, 양한석, 최재수, 박건영.**, 1992, 개오동나무 수피로 부터 항돌연변이 물질의 분리, *한국 환경성 돌연변이발암원 학회지*, **12**(2), 147.

58. **박희준, 문숙희, 박건영, 최재수, 정해영, 양한석, 서석수.**, 1991, 와송의 항돌연변이효과, *약학회지*, **35**(4), 253.

제 3 장 한천올리고당의 수율향상 및 원가절감을 위한 신공정법의 개발

제 1 절 서 론

삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라 연안에는 국내 총수산물 생산량의 약 18 %를 차지하고 있는 다양한 해조류가 풍부하게 존재하고 있다. 해양에 존재하는 대부분의 해조류에는 현재 식품산업에 유용하게 쓰이고 있는 많은 종류의 다당류가 존재하고 있다. 대표적인 종류로 한천(agar)과 알긴산(alginic acid), 카라기난(carrageenan) 등이 있다. 그러나 이와 같은 다당류들은 동종 혹은 이종의 단당류가 결합된 복잡한 구조를 지니고 있으며, 분자량이 크기 때문에 생리·기능성 등에 대한 연구를 수행함에 있어 많은 어려움을 겪고 있다. 그래서 많은 연구자들이 이들의 구조를 밝혀내기 위하여 화학적·효소학적 방법으로 가수분해시켜 이들의 구조를 해석하고 있다. 이 중 비교적 지명도가 높은 것이 한천(agar-agar)이며, 한천은 홍조류(red seaweeds)를 추출·여과시켜 얻은 한천 기질을 냉각하여 한천 겔(gel)을 만들고, 이를 동결 및 융해과정을 반복 수행한 다음, 탈수과정과 건조과정을 거쳐 제조되어지는 점질성 다당류이다.

한천의 원료로 사용되는 홍조류는 우뭇가사리속(Gellidium sp.), 개우뭇속(Pterocladia sp.), 새발속(Acanthopeltis sp.), 꼬시래기속(Gracilaria sp.) 및 싹새기속(Ahanfeltia sp.) 등으로 주로 우뭇가사리와 개우뭇새발 등이 이용된다. 이러한 홍조세포벽의 내층은 셀룰로즈(cellusose)로 되어 있는 것에 반해 외측 및 세포간격을 구성하는 다당류의 주성분은 한천으로 이루어져 있다.

한천은 당일당으로 된 다당류가 아니고, agarose(약 70 %)와 agaropectin(약 30 %)의 혼합물로 구성되어 있다. Agarose는 Fig. 1에서와 같이 β-D-galactose와 3,6-anhydro-L-galactose가 β-1,4 결합으로 된 agarobios의 반복단위로서 각 agarobiose가 α-1,3으로 연결된 직쇄상 다당류이다.

한천은 0.2~0.3 %(w/v)에서 gel 형성 능력을 가지게 되며 1~2 %(w/v)의 농도에서는 매우 단단한 gel이 형성된다. 일단 형성된 gel은 고온에서 잘 견디는 성질을 지니고 있으며, 일정온도를 유지해주면 시간이 경과함에 따라 점도가 점점 증가하는 특성을 지닌다. 또한 한천은 다가전해질(polyelectrolytes)에 속하며(Aspinall, 1983), 특히 미생물을 배양할 때 배지의 gel 상태를 유지시켜 주기 위한 재료로서 현재 널리 사용되고 있다. 또한 한천은 오래전부터 식품첨가물, 의약품, 화장품, 가축사료 및 공업원료 등에 널리 이용되고 있는 대표적인 해조류 유래 다당으로, 국내에서 생산되는 해조류 전체 생산량의 30 %(약 3,600톤, 약 50억원 상당)를 차지하는 비교적 풍부한 수산자원의 하나이다.

그러나 한천의 실제적인 용도 면에서는 전체 생산량의 약 6.5 %만이 자연채취 상태 또는 단순가공을 거친 후 값싼 원료상태로 사용되어질 뿐이며, 그 나머지의 대부분이 방치되고 있어 부존자원량에 비해 부가가치가 매주 낮은 실정이다. 또한, 실험용·의약용·시약용 등으로 사용되는 고가의 한천은 전량 수입에 의존하고 있어 한천의 고부가가치 용도로의 이용을 위해서는 한천 가공기술의 개발이 절실하다 할 수 있다.

올리고당은 단당이 2~10(M.W. 300~2,000)개가 glycoside 결합으로 탈수 축합된 소당류의 총

칭으로서, 난소화성, 저감미성, 장내유해세균 증식억제 및 장내유해세균 증식효과, 변비개선 효과 등을 지니고 있다. 그 밖에도 혈중 콜레스테롤의 저하, 정균작용, 당뇨병, 고혈압 등에 뛰어난 효과가 있음이 밝혀져 고부가가치를 지닌 기능성 소재로서 각광을 받고 있다.

이러한 올리고당 중에서도 특히, 해조류를 대상으로 한 올리고당의 생산은 주로 김, 다시마를 이용한 것으로 일본에서 부분적으로 연구중에 있으나, 그 밖의 해조류에 관해서는 거의 연구가 되어 있지 않으며 아직까지 실용화 단계에는 미치지 못하는 실정이다. 또한 국내에서 개발되거나 연구진행중인 올리고당은 녹말이나 단당을 이용한 공정만이 개발되어 있으며, 특히 풍부한 부존자원임에도 불구하고 그 이용도가 낮은 한천과 같은 해조류 유래의 다당을 이용한 기능성 올리고당의 생산공정개발은 현재까지도 전무한 실정으로 새로운 기능성을 지닌 해조류 유래 기능성 올리고당의 산업화를 위한 국내 고유 기술의 확립이 절실히 요구되고 있다.

홍조류 유래 다당인 한천을 효소나 유기산으로 가수분해시키면 한천올리고당으로 전환되는데 이때 생성되는 한천올리고당은 기능성 식품소재로서의 이용이 가능하기 때문에 높은 부가가치를 지니고 있는 식품소재이다. 한천은 난용성 다당류이므로 그 자체로서는 체내 흡수되어 그 기능성을 발휘하는 것이 거의 불가능하기 때문에 한천올리고당으로 분해시켜 이용하는 것이 효율적이다. 한천올리고당은 생체 내에서는 난분해성으로 소화효소에 의해서는 분해되지 않으나 장내에서 유산균이나 비피더스균 등에 의해서만 분해되어 장내유용세균의 증식효과를 가져오게 된다. 장내 유익균에 의해서만 이용가능하기 때문에 칼로리가 거의 없는 저칼로리의 특성이 있으며, 장내유용세균이 증식함에 따라 장의 연동운동을 활성화 시켜 변비개선 효과, 장내유해세균의 성장을 억제하여 병원성 물질의 체내흡수를 억제효과 등을 가지게 된다. 또한 정균작용, 혈중 콜레스테롤의 저하로 인한 혈압상승억제효과, 충치균(*Streptococcus mutans*)에 대한 비발효성으로 충치예방효과, 혈당치 개선 작용으로 당뇨병 예방효과, 병원균에 대한 항균성, 암세포 증식억제 작용, 노화를 촉진시키는 활성산소의 일종인 일산화질소(NO)의 생체 내 생성을 억제하는 항산화기능, 인체의 면역작용 담당기관인 간의 지라세포(spleen cell)의 증식을 강화하는 면역활성 증가작용 등의 여러 가지 생리활성기능이 알려져 있다.

이러한 기능성 한천올리고당의 생산을 위한 대표적인 방법으로 효소학적 가수분해법과 산 가수분해법 등이 있다. 효소학적 가수분해법의 경우, 다당체의 특정부위에 특이적으로 작용하는 한천분해효소를 사용하여 목적으로 하는 올리고당을 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있으나, 효소가 온도 및 pH에 대해 안전성이 낮고, 당화반응이 진행됨에 따라 효소-기질 복합체가 점점 증가하여 활성이 저하하는 현상 때문에 일정 농도 이상의 기질 증대를 기대하기 힘들다. 또한 균주로부터 효소를 분리·정제하는 비용이 많이 들기 때문에 효소 가격이 비싼 반면, 당화반응 후 효소와 생성 환원당의 분리 및 효소의 재사용이 불가능하다는 단점이 있으며, 특히 한천은 0.2~0.3 % 이상만 첨가되어도 실온에서 굳어지는 성질이 있기 때문에 효소반응 속도가 둔화되어 올리고당 생산효율이 낮아지는 단점이 있어 공업적 응용이 불가능한 실정이다. 반면, 산 가수분해법의 경우에는 온도나 pH에 큰 영향을 받지 않으며, 단시간 내에 반응이 가능하고, 기질을 대량으로 처리할 수 있으며, 비용도 저렴하다는 장점을 가지고 있어 대량공정에 많이 이용되어

지고 있다. 그러나, 무기산인 황산이나 염산 등을 사용할 경우, 올리고당의 갈변문제, 심각한 반응기 재질 부식문제, 식용 가능한 식품첨가물로서의 부적합성, 반응 후 중화과정을 거쳐야 하는 번거로움, 분해 시 단당 및 부산물이 다량 생성, 반응 후 폐수 처리 문제등의 단점을 가지고 있다. 일본에서는 약산 가수분해를 이용하여 제조된 한천올리고당이 암세포 억제 작용 및 항산화 효과를 가진다는 결과가 보고된 바 있는데, 약산인 초산은 인체에 유용한 유기산으로서 이미 산미료로서 식품에 첨가되고 있기 때문에 식품산업에의 응용이 가능하다는 장점이 있으며, 가수분해 시 효소에 의한 가수분해물과 비슷한 패턴의 올리고당으로 분해시키는 것이 1차 TLC 분석에 의해 확인되었고, 강산 가수분해의 경우와 비교하여 반응 부산물 생성과 갈변현상이 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 강산에 의한 산 가수분해법의 여러 단점들을 보완하기 위해 본 연구에서는 약산인 초산을 사용하였다. 인체에 유용한 유기산인 초산은 이미 산미료로서 식품에 첨가되고 있으며, 가수분해시 효소에 의한 가수분해물과 비슷한 크기의 올리고당으로 분해시키는 것이 확인되었으며, 부산물이나 갈변현상이 거의 없고, 중화과정을 거치는 대신 녹는점이 16.7℃인 것을 이용하여 동결건조 시키거나, 진공감압에 의해 직접 초산을 제거할 수 있었다. 가수분해시 사용되는 가열방법의 경우에는, 종래에는 시료를 직접적으로 가열하는 가열방법이 주로 행해져왔으나, 본 연구에서는 최근 여러 분야에서 널리 이용되고 있는 마이크로파 조사법을 함께 응용하였다. 최근에는 화학적으로 분석하고자 하는 무기물이나 생물학적 샘플의 분해 전처리 과정, 가공식품의 건조, 유용물질을 얻기위한 가수분해, 식품 살균 등에 마이크로파 조사법을 응용하는 사례가 늘어나고 있다. 마이크로파를 이용한 가열 방법에 대한 연구는 70여년 전부터 이루어져 왔으며 식품에 대한 가열은 그 중에 하나의 연구 대상으로 발전되어 왔다. 식품의 겉표면부터 가열하여 내부로 열을 전달하는 일반 가열과는 달리 microwave는 전파의 운동에 의하여 식품 자체 내부에서 직접적으로 열을 발생하며 열 전달(heat transfer)은 변수로 작용되지 않는다. 물질 자체를 microwave가 직접 통과하면서 열을 발생시키기 때문에 온도 증가가 짧은 시간 안에 급격히 일어나게 된다. Table 1과 2에서는 현재 마이크로파가 식품산업에서 주로 이용되는 범위와 특징을 요약하여 보았다. 초산을 이용한 산 가수분해법에 의하여 한천으로부터 한천올리고당을 생산하는 공정에서 가열방식으로 microwave irradiation method를 사용하였을 때, hot plate를 이용한 일반가열법과 비교하여 반응시간이 단축되고 침전물의 생성이 감소함을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 microwave의 국내 이용기술은 매우 취약한 실정에 있어 microwave를 이용하였을 경우 많은 장점이 있으나 이를 이용하지 못하고 있으므로 대량생산공정의 개발에는 이용하는 것이 불가능한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내에 풍부한 수산자원의 하나임에도 불구하고 그 이용도 및 부가가치가 낮은 한천으로부터 비용 및 안전성 측면에서 여러 가지 장점을 지닌 산 가수분해법을 이용하여 한천올리고당을 생산하되, 무기산 대신 인체에 유용한 유기산인 초산을 사용하여, 효소분해물과 같은 종류의 올리고당을 효율적으로 제조하는 방법과 대량생산공정개발법을 제시하고자 한다. 더불어 초산에 의한 가수분해법으로 생산된 한천올리고당의 항균성과 장내유익세균 증식효과도 증명해보고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재 료

기질로서 사용된 한천(agar-agar)은, (주) MSC(경남 양산시)에서 제공받은 실한천(agar-agar strip)을 사용하였다. 이것을 반응 전 24시간동안 증류수에 불려 놓았다가 2~3회 세척하는 전처리 과정을 거친 후 사용하였다.

2. 한천올리고당의 제조

가. 효소 분해법

(1) 한천분해효소 생산 균주의 배지조성 및 배양조건

한천분해효소 생산 균주인 *Bacillus cereus* ASK202를 위한 기본배지로서는 1 ℓ의 인공해수(증류수 1 ℓ에 NaCl 23.4 g, KCl 0.7 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.6 g, $CaCl_2$ 1.1 g, Na_2SO_4 3.9 g, $NaHCO_3$ 0.2 g, NH_4NO_3 1.0 g, K_2HPO_4 0.01 g, Tris-base 6.05 g를 첨가, pH 7.5)에 yeast extract 3 g이 첨가된 것을 사용하였다. 균주 보존 배지로는 기본배지에 한천 1.5 %(w/v)을 첨가한 평판고체배지를 사용하였으며, 효소생산을 위한 액체배지는 기본배지에 0.3 %(w/v) 한천이 첨가된 반고체상태의 것을 사용하였다.

한천고체평판배지에 보존된 한천분해효소 생산 균주를 20 ml 삼각 플라스크의 액체배지에 1차 접종하여, 25℃, 18시간, 180 rpm으로 shaking incubator에서 진탕배양한 다음, 액체배지 1.5 ℓ를 함유한 2 ℓ 삼각 플라스크에 전배양액 1 %(v/v)를 2차 접종한 후 25℃, shaking incubator에서 180 rpm으로 36시간 진탕배양하였다.

(2) 한천분해효소의 분리

한천분해효소 생산 균주 *Bacillus cereus* ASK202의 배양액을 8,000 rpm, 20분간 원심분리하여 얻은 배양 상층액을 한외여과기(Millipore, PREP/Scale™-TFF cartridg7,e, 30 kDa)를 이용하여 분리한 효소를 24시간 동결건조하여 한천분해효소 분말을 회수하였다.

(3) 한천분해효소를 이용한 한천올리고당의 제조

한천분해효소를 10 mM sodium-phosphate buffer, pH 7.8에 재 용해시킨 후, 동일한 완충용으로 4℃에서 24시간 투석하여 염을 제거한 효소를 이용하여 한천올리고당 제조에 사용하였다. 이때, 부분 정제된 한천분해효소의 활성은 1분당 1 μmol의 galactose를 생산하는 효소량을 1 unit로 정의하여 사용하였다.

나. 산 가수분해법

(1) 산의 종류에 따른 한천올리고당의 제조

(가) 강산 가수분해법에 의한 제조

강산인 황산과 염산을 이용하여 한천올리고당을 제조하기 위하여, 1.0N의 황산과 염산 용액에 한천 1 %(w/v)를 각각 첨가하여 1시간 동안 100℃에서 교반가열하여 가수분해를 실시하였다.

(나) 약산 가수분해법에 의한 제조

약산인 초산을 이용하여 한천올리고당을 제조하기 위하여, 1.0N의 황산과 염산용액에 한천 1 %(w/v)를 각각 첨가하여 1시간 동안 100℃에서 교반·가열하면서 가수분해를 실시하였다.

(2) 초산을 이용한 한천올리고당의 최적생산조건 검토

(가) 초산 농도 및 한천 농도에 따른 시간별 가수분해

초산을 이용하여 한천올리고당을 제조하기 위하여, 1ℓ 삼각 플라스크에 초산 농도 0.1, 1.0, 5.0 N 용액에 각각 0.5, 1.0 %(w/v)의 한천을 첨가한 후 반응부피를 500㎖로 유지시키면서 100℃에서 교반가열하여 가수분해시키면서, 시간별(10, 20, 30, 40, 50 min, 1, 2, 3, 4h)로 sampling하였다.

(나) 최적 기질 농도의 결정

초산 농도를 고정하고, 기질인 한천을 농도별(2, 4, 6, 8, 10, 15 %(w/v))로 첨가한 후 분해시키고, 시간별(1~4h)로 sampling하여 TLC 분석을 실시한 후, 최적기질농도를 결정하였다.

(다) 최적 초산 농도 및 반응시간의 결정

기질인 한천의 농도를 고정하고, 초산을 농도별(0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0N)로 첨가한 후 가수분해를 실시하여 최적 초산 농도를 결정하였다.

(라) 가열방법에 따른 한천올리고당의 제조

한천의 가수분해시 가열법으로, hot plate를 이용한 교반가열법과 microwave oven (가정용, 2.45-GHz microwaves, 700W)을 이용한 microwave irradiation method를 각각 실시하여 한천올리고당의 생산정도를 비교하였다.

3. 한천올리고당의 분리 공정

가. 반응물의 여과

산 가수분해 반응 후 그 반응용액은 1 ㎛ 여과지(Advantec, Tokyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)에 여과시켜 반응 후 잔여물을 제거한 후 상층액을 분리하였다.

나. 한천올리고당의 회수

(1) 동결건조에 의한 방법

여과된 한천의 산 가수분해 반응물을 농도별(1, 2, 5, 7, 10%)로 준비하여 300 ㎖ 씩 용기에 분주한 후 동결건조하여 한천올리고당 분말을 회수하였다.

(2) 진공감압건조에 의한 방법

여과된 한천의 산가수분해 반응물을 75~80℃로 유지시킨 항온수조(EYELA SB-650, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)와 회전진공증발기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan), aspirator(EYELA A-3S, Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan)를 이용하여 감압 농축하였다. 이것을 분말로 분쇄하여 에탄올에 혼합시켜 stirring하면서 24시간동안 세척한 후, 0.45 ㎛ Teflon membrane filter(Gelman Sciences, Inc.)로 여과시켰고, 이것을 80℃로 유지된 dry oven 내에서 1h동안 건조시켜 한천올리고당 분말을 회수하였다.

4. 한천올리고당의 분석

산 가수분해법을 실시한 반응용액 내에는 다량의 산이 함유되어 있으므로, 일반적으로 이것을 중화하고 그에 따른 부산물을 제거해야하는 과정이 필수적이다. 그러나 중화과정을 거치게 되면 반응 후 다량의 염이 생성되기 때문에 회수율이 낮아져 생산량에 영향을 미치게 된다. 따라서, 본 연구에서는 중화과정을 거치지 않고 동결건조 및 진공감압건조를 이용하여 초산을 제거하였다.

가. TLC에 의한 분석

생성된 한천올리고당의 구성성분 분석은 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석으로 확인하였다. TLC 분석에는 silica gel 60 F254 glass plate(Merck Co., German)를 전개판으로 사용하였고, 전개용매로는 n-butanol, acetic acid, water를 1.8:1:1의 비(v/v)로 혼합한 것을 사용하였다. 한천올리고당 용액을 전개시킨 전개판은 ethanol과 sulfuric acid를 11.5:3으로 혼합한 검출시약으로 처리한 후, 110℃에서 15분간 건조시켜 한천올리고당의 성분을 분석하였다.

나. NMR에 의한 분석

생성된 한천올리고당의 구조를 분석하기 위하여 NMR (nuclear magnetization resonance) 실험을 행하였다, 시료 50 ㎎을 D_2O에 용해시켜 NMR sample tube (5×178mm, ARMAR)에 넣은 후, 400 ㎒ FT-NMR Spectrometer (FEOL, Japan)를 이용한 ^{1}H-NMR 분석을 통하여 구조를 해석하였다.

다. HPLC에 의한 분석

생성된 한천올리고당의 정량분석은 Aminex HPX-42A (7.8mm×300mm, Biorad, Co., USA) column이 장착된 HPLC(High Performance Liquid Chromatography; Pharmacia, LKB, Sweden)를 이용하였으며, 이 때 사용된 detector는 RI-4(Refractive Index, HP 1047A, Germany)였다. 이 때 column 온도는 80℃를 유지, 이동상으로는 초순수 증류수 (18megaohm · cm)를 사용하였고, 유속은 0.8ml/min으로 하여 분석하였다. 한천올리고당의 분석을 위한 표준시약으로는 galactose, agarobiose, agarotetraose, agarohexaose(Sigma Co., USA)를 사용하였다.

라. 전당량 측정

한천가수분해 후, 기질용액 및 반응용액 중의 전당량은 Phenol-sulfuric acid 방법에 의해 측정하였다. 당 시료 용액 0.2 ㎖를 test tube에 취하여 5 %(v/v) phenol 용액 0.2 ㎖를 첨가한 후, 황산원액 1.0 ㎖를 반응액에 직하하여 느린 속도로 발열반응을 진행시키면서 혼합하였다. 이 반응액을 10분간 실온에서 정치한 후, 490nm에서 흡광도를 측정한 후, 한천 용액으로 취한 검량곡선과 비교하여 전당량을 계산하였다.

마. 환원당량 측정

한천가수분해 후, 기질용액 및 반응용액 중의 환원당량은 Somogyi-Nelson 법에 의해 측정하였다. 당 시료 용액을 0.2 ㎖씩 분주한 test tube에 Somogyi 시약을 1.0 ㎖ 씩 첨가한 후, 끓는 물에서 10분간 가열하고, 흐르는 물에서 5분간 냉각시켰다. 이 반응액에 Nelson 시약을 1.0 ㎖ 첨가하여 혼합시킨 다음, eppendorf tube에 각각 옮겨서 2분간 원심분리시켜 510nm에서 흡광도를 측정한 후, galactose 용액으로 취한 검량곡선과 비교하여 환원당량을 계산하였다.

5. 초산 가수분해법을 이용한 한천올리고당의 생산 공정도

상기 실험방법 및 결과에 따라 작성된 초산 가수분해법을 이용한 한천올리고당의 생산공정도는 다음과 같다(Fig. 50).

6. 한천올리고당의 대량생산공정 개발

가. 대량생산공정을 이용한 한천올리고당 생산

500 ㎖ level에서 실시한 초산 가수분해법으로부터 얻은 결과를 토대로 대량생산공정도를 작성하였다(Fig. 51).

나. 대량생산된 한천올리고당의 분석

대량생산공정에 의해 생산된 한천올리고당의 구성성분 분석도 앞의 실험에서와 마찬가지로 TLC 및 HPLC 분석으로 확인하였다.

1. Preparation of substrates (agar 10% (w/v))

2. ↓

3. Solution of substrates by heating (15min in microwave oven)

4. ↓

5. Addition of acetic acid (1.5N)

6. ↓

7. Hydrolysis

8. (Stir-heating: 3h, Microwave irradiation: 70min)

9. ↓

10.Filtration

11. ↓

12.Separation of agarooligosaccharides

13.(Freezed drying method, Vacuum drying method)

14. ↓

15.Powder of agarooligosaccharides

Fig. 50. Producing process of agarooligosaccharides using acetic acid hydrolysis

7. 한천올리고당의 항균활성 탐색

가. 균주의 선정

(1) 병원성 균주

한천올리고당의 항균활성을 측정하기 위해 사용된 병원성 균주로는 *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Listeria monocytogens* (KCTC 3710), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12595), *Salmo -nella typhimurium* (KCTC 1925) 등 식중독 및 식품변패균 4종과 충치균 *Streptococcus mutans* (KCTC 3065) 등의 총 5종이다.

(2) 장내 유용 세균

한천올리고당의 장내유용세균에 대한 증식활성을 측정하기 위하여 사용된 균주로는 *Bifidobacterium infantis* (KCTC 3127), *Bifidobacterium bifidium* (KCTC 3440), *Lactobacillus acido -philus* (KCTC 3145), *Lactobacillus delbrueckil* subsp. *bulgaricus* (KCTC 3635) 등 4종이다.

나. 균주의 배양특성

(1) 병원성 균주의 배지 및 배양방법

병원성 균주의 종류에 따라 사용된 배양 배지의 종류와 그 조성은 다음과 같다.. *Bacillus cereus*(KCTC 1012), *Salmonella typhimurium* (KCTC1925)의 경우 TSB (Tryptic Soy Broth), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12595)의 경우 Micrococcus Medium, *Listeria monocytogens* (KCTC3710), *Streptococcus mutans* (KCTC3065)의 경우 BHIA (Brain Heart Infusion Agar)를 사용하였다. 그리고, 실험에 사용된 모든 병원성 균주는, 10 ㎖ test tube의 4 ㎖ 액체배지에 1 차 접종하고 37 ℃, 180 rpm에서 18~24시간 진탕배양한 다음, 100 ㎖ 삼각 플라스크 내의 20 ㎖ 액체배지에 전배양액 1 %(v/v)를 2차 접종한 후 37 ℃, 180 rpm의 조건으로 shaking incubator 내에서 18~24 시간 진탕배양하였다.

다. 장내 유용 세균의 배양조건

(1) 배양배지

장내 유용 세균의 종류에 따라 사용된 배양 배지의 종류와 그 조성은 다음과 같다.. *Bifidobacterium infantis* (KCTC 3127)의 경우 *Bifidobacterium* Medium, *Bifidobacterium bifidium* (KCTC 3440), *Lactobacillus acidophilus* (KCTC3145), *Lactobacillus delbrueckil* subsp. *bulgaricus* (KCTC 3635)의 경우 *Lactobacilli* MRS Broth를 사용하였다.

(2) 배양방법

실험에 사용된 모든 장내 유용 세균은, KCTC로부터 분양받은 균주의 분말을 100 ㎖ 삼각 플라스크의 20 ㎖ 액체배지에 1차 접종하고 37℃, 180 rpm에서 24~48시간 진탕배양한 다음, 100 ㎖ 삼각 플라스크 내의 20 ㎖ 액체배지에 전배양액 1 %(v/v)를 2차 접종한 후 37℃,

180 rpm의 조건으로 shaking incubator 내에서 24~48시간 진탕배양하였다.

라. 항균활성의 측정법

병원균에 대한 한천올리고당의 항균력을 측정하기 위해 semisolid agar를 이용한 agar diffusion 법을 사용하였다. 각 균주의 배양액이 630nm에서 흡광도 약 0.2가 되었을 때, test tube 내에 40~45℃로 유지시킨 4 ㎖의 semisolid agar(배지 broth에 agar 0.3 %(w/v) 첨가) 배지에 0.5 %(v/v) 접종하여 한천고체평판배지에 도말하였다. 여기에 한천올리고당 용액을 농도별(0.4, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0 %(w/v))로 흡수시킨 paper disk(8 mm, Advantec Toyo, Japan)를 거치한 후, 37℃에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 저지환을 측정하였으며, 대조군으로는 동일한 농도별(0.4, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0 %(w/v)) 설탕 용액을 사용하였다.

마. 장내 유익세균 증식효과 측정

한천올리고당의 장내 유익균에 대한 증식효과를 측정하기 위해, 장내 유익균 각 배양액에 한천올리고당을 농도별(0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 %(w/v))로 첨가하여 배양한 후 630nm에서 흡광도를 측정하여 한천올리고당을 첨가하지 않은 대조군과 증식정도를 비교하였다.

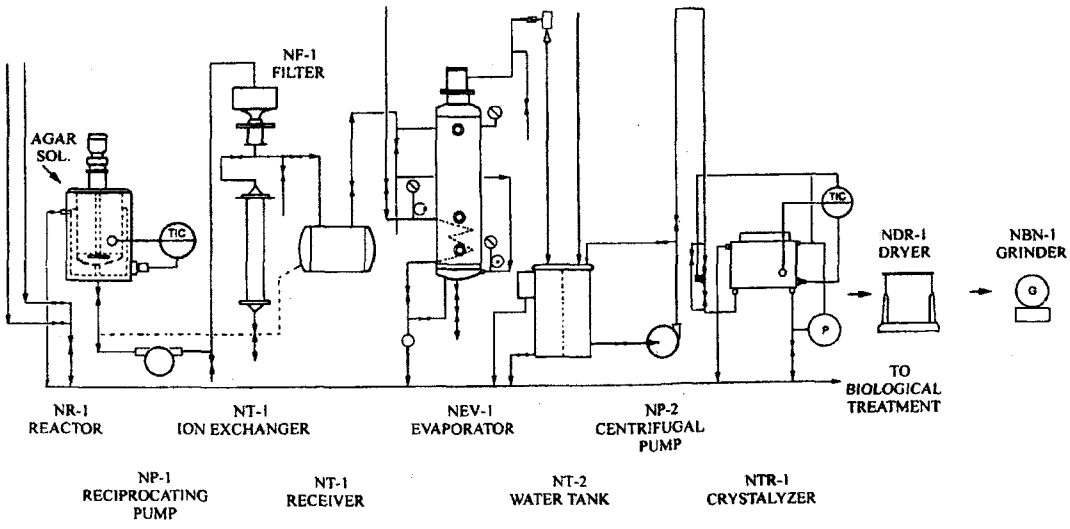


Fig. 51. The process of mass production.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 산의 종류에 따른 한천올리고당의 제조

가. 강산 가수분해법에 의한 제조

약산에 의한 가수분해법 실험에서 얻어진 조건을 적용하여 1.0 N의 황산과 염산 용액에 기질로서 전처리된 한천 1 %(w/v)를 각각 첨가하여 1시간 동안 100℃에서 교반가열하여 가수분해를 실시한 후, 얻어진 상층액을 TLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 52). 두 경우 모두 반응 후 용액의 색깔이 심하게 갈변하였으며, TLC 분석 결과 뚜렷이 구분되는 2, 4, 6당이 거의 없고 단당이나 그 외 부산물이 다량 생성되었음을 알 수 있었다. 단당이나 부산물이 다량 생성되면 올리고당 생산이라는 의미가 없어짐은 물론이고, 분말을 얻기 위한 건조과정에서 점도가 높은 덩어리가 생성되는 것을 확인할 수 있었으며 얻어진 분말의 색깔도 갈변되어 올리고당 제품으로 상품화하고자 할 경우 상품으로서의 가치가 떨어지게 된다.

나. 약산 가수분해법에 의한 제조

초산 농도 0.1, 1.0, 5.0N 용액에 각각 0.5, 1.0 %(w/v)의 한천 기질을 첨가하여 100℃에서 교반가열하면서 가수분해시켰다. 시간별(10, 20, 30, 40, 50min, 1, 2, 3, 4h)로 sampling한 후 TLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 53, 54). 한천 농도를 0.5%(w/v)로 고정하여 반응시키면, 0.1 N의 경우 반응 3시간 이후부터 한천올리고당(2, 4, 6당; Rf=0.56, 0.44, 0.31)이 생성되었고, 1.0 N의 경우 반응 50분 이후부터 한천올리고당(2, 4, 6당; Rf=0.56, 0.44, 0.31)이 생성되었으며, 5.0 N의 경우 40분 이후부터 한천올리고당(2, 4, 6당; Rf=0.56, 0.44, 0.31)이 생성되나 반응 3시간 이상에서 부산물(Rf 0.78)이 생성됨을 확인할 수 있었다. 한천 농도를 1.0 %(w/v)으로 고정하여 반응시키면 0.1 N의 경우 반응 3시간 이후부터 한천올리고당(2, 4, 6당; Rf=0.56, 0.44, 0.31)이 생성되었고, 1.0 N의 경우 반응 2시간 이후부터 한천올리고당(2, 4, 6당; Rf=0.56, 0.44, 0.31)이 생성되었으나 3시간 이후에는 부산물이 생성되었으며, 5.0 N의 경우 40분 이후부터 한천올리고당(2, 4, 6당; Rf=0.56, 0.44, 0.31)이 생성되나 반응 2시간 이상에서 부산물(Rf 0.78)이 다량 생성됨을 확인할 수 있었다.

2. 효소 분해산물과 산 분해산물의 구성성분 비교

Fig. 55는 한천분해효소, 강산(황산, 염산), 약산(초산) 등에 의해 가수분해된 한천올리고당의 각 TLC 분석결과를 비교한 것이다. 약산인 초산에 의한 가수분해법에 의해 생산된 한천올리고당은 강산과는 달리 효소에 의해 생산된 한천올리고당과 거의 비슷한 패턴의 올리고당임을 확인할 수 있었다.

3. 초산을 이용한 한천올리고당의 최적생산조건 검토

가. 최적 기질 농도의 결정

Fig. 56는 초산 농도를 1.0 N로 고정하고, 기질인 한천을 농도별(2, 4, 6, 8, 10, 15 %(w/v))로 첨가하여 가수분해 시키면서 시간별(1~4h)로 sampling하여 TLC분석을 실시한 결과이다. 생산량을 최대로 높일 수 있는 범위에서 최적 기질농도를 결정하였는데, 15 %의 경우(Fig. 55F) 거의 분해가 되지 못하고 부산물만 다량 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 10 % 이상의 한천을 첨가할 경우 용기가 기질 부피를 수용하지 못하며 한천을 미리 녹이는 전처리 단계에서도 한계가 있어, 최적 기질 농도는 10 % (w/v) (Fig. 56E)로 결정하였다.

나. 최적 초산 농도의 결정

Fig. 57은 기질인 한천의 농도를 10 %(w/v)으로 고정하고, 초산을 농도별(0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0 N)로 첨가한 후 가수분해하여 TLC 분석을 실시한 결과이다. 5.0 N 산 농도에서는 너무 많은 분해가 일어나 강산 가수분해 때와 마찬가지로 올리고당이 단당으로 분해가 되는 것을 관찰할 수 있었으며 1.5 N과 3.0 N의 경우 비슷한 분해정도를 보였으므로, 경제성을 고려하여 1.5 N로 결정하였다.

다. 가열방법에 따른 한천올리고당의 제조법의 비교

Hot plate에 의한 교반가열법과 마이크로파 조사법을 이용하여 한천을 용해시키고, 한천올리고당의 생산 정도를 살펴본 결과, 가수분해 후 한천의 분해정도를 비교할 때, 같은 농도의 한천을 첨가한 경우, 교반 가열법은 4시간, 마이크로파 조사법은 70분이 걸리는 것으로 나타났다(Fig. 58). 마이크로파 조사법을 이용할 경우, 반응시간이 단축되며 반응 후 분해되지 않는 잔여물이 훨씬 적었고, 그로 인해 반응물의 여과가 용이했다. 이처럼 마이크로파 조사법이 교반가열법에 비해 그 분해능이 뛰어난 것을 알 수 있으나, 대량생산공정에 응용할 경우에 마이크로파 조사법은 경제성이나 기술면에서 실현불가능하다 판단되어 이후의 대량생산공정에는 직접 열을 가하는 교반가열법을 사용하였다.

라. 기질 전처리 유무에 따른 비교

기질로 사용된 한천을 반응 전 24시간동안 증류수에 불려 놓았다가 2~3회 세척하는 전처리를 실시한 경우와 하지 않은 경우, 가수분해물의 TLC 결과를 비교하였다(Fig. 59). 한천은 해양유래의 홍조류에서 추출한 다당류이므로 염분의 함량이 매우 높다. 한천을 물에 불리고 세척하는 전처리를 실시하였을 경우, 이러한 염분을 1차 제거할 수 있으며, 가공공정에서 발생된 불순물에 의해 발생되는 반응 후 잔여물을 감소시킬 수 있었다. 또한 강산 가수분해나 장시간 가열시 생성되는 부산물이 훨씬 적게 생산됨을 알 수 있었다.

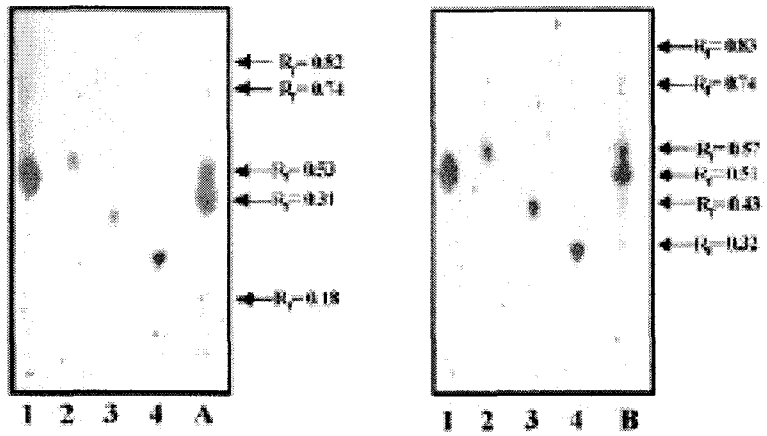


Fig. 52. TLC analysis of acetic acid hydrolysates from agar using strong acids. 1: Galactose; 2: Biose; 3: Tetraose; 4: Hexaose; A: Hydrolysates from sulfuric acid (1.0N) hydrolysis of agar, B: Hydrolysates from hydrochloric acid (1.0N) hydrolysis of agar

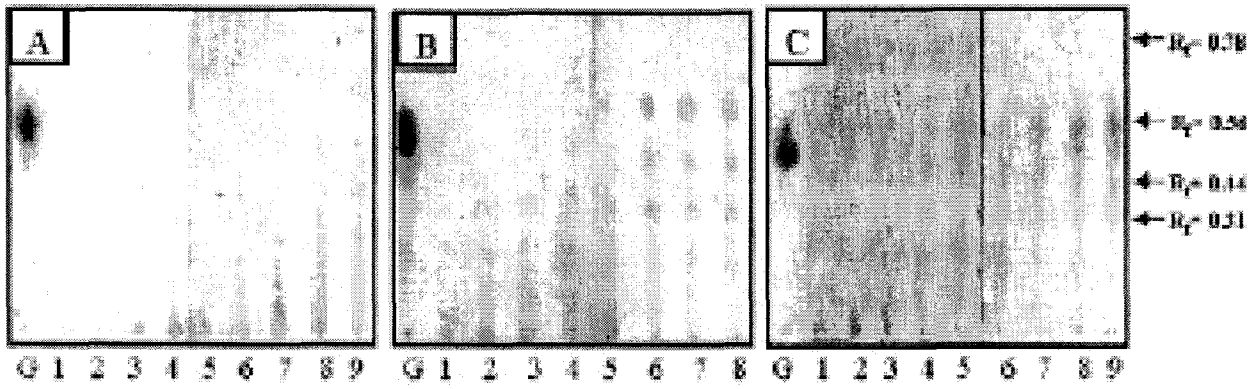


Fig. 53. TLC analysis of acetic acid (0.1, 1.0, 5.0 N) hydrolysates from agar (0.5 %(w/v)). (A) Hydrolysates from 0.1 N acetic acid hydrolysis of 0.5 %(w/v) agar G: Galactose (R_f = 0.54); 1: 10, 2: 20, 3: 30, 4: 40, 5: 50 min; 6: 1, 7: 2, 8: 3, 9: 4 hr (B) Hydrolysates from 1.0N acetic acid hydrolysis of 0.5%(w/v) agar G: Galactose (R_f = 0.54); 1: 10, 2: 30, 3: 40, 4: 50min; 5: 1, 6: 2, 7: 3, 8: 4hr (C) Hydrolysates from 5.0 N acetic acid hydrolysis of 0.5 %(w/v) agar G: Galactose (R_f = 0.54); 1: 10, 2: 20, 3: 30, 4: 40, 5: 50min, 6: 1, 7: 2, 8: 3, 9:4hr

Fig. 54. TLC analysis of acetic acid (0.1, 1.0, 5.0 N) hydrolysates from agar(1.0 %(w/v). (A) Hydrolysates from 0.1 N acetic acid hydrolysis of 1.0 %(w/v) agar G: Galactose (R_f = 0.54); 1: 20, 2: 30, 3: 40, 4: 50 min; 5: 1, 6: 2, 7: 3, 8: 4hr (B) from 1.0 N acetic acid hydrolysis of 1.0 %(w/v) agar G: Galactose (Rf = 0.54); 1: 10, 2: 30, 3: 40, 4: 50 min; 5: 1, 6: 2, 7: 3, 8: 4hr (C) Hydrolysates from 5.0 N acetic acid hydrolysis of 1.0 %(w/v) agar G: Galactose (Rf = 0.54); 1: 10, 2: 20, 3: 30, 4: 40, 5: 50min; 6: 1, 7: 2, 8: 3, 9: 4hr

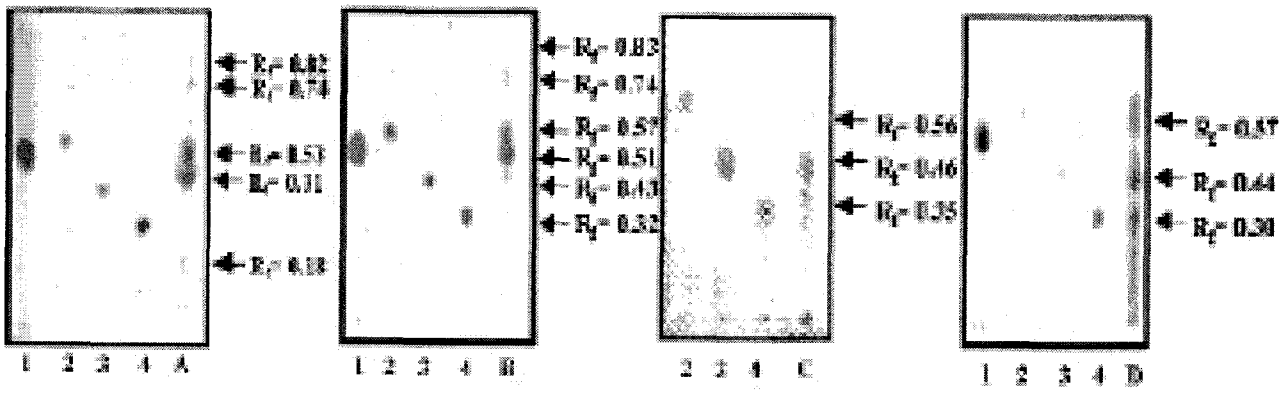


Fig. 55. Comparison of TLC analysis of strong acids hydrolysates, enzymatic hydrolysates and acetic acid hydrolysates from agar. 1: Galactose; 2: Biose; 3: Tetraose; 4: Hexose; A: Hydrolysates from sulfuric acid (1.0 N) hydrolysis of agar B: Hydrolysates from hydrochloric acid (1.0 N) hydrolysis of agar C: Hydrolysates from enzymatic hydrolysis of agar D: Hydrolysates from acetic acid (1.5 N) hydrolysis of agar

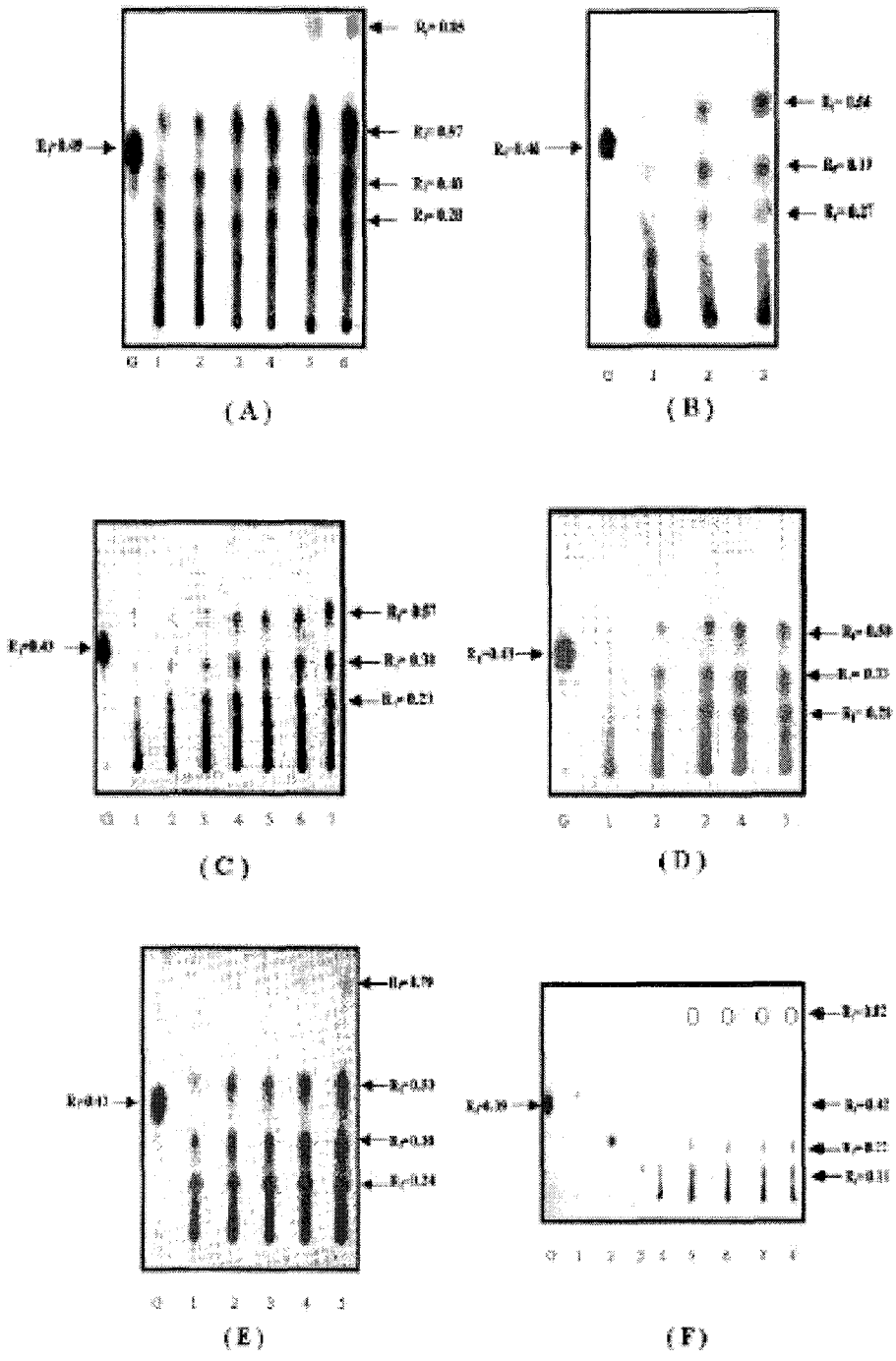


Fig. 56. TLC analysis of acetic acid (1.0N) hydrolysates from agar (2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0% (w/v)) at several reaction times. (A) Agar 2.0% (w/v) (G: Galactose; 1: 1.5hr; 2: 2.0hr 3: 2.5hr, 4: 3.0hr; 5: 3.5hr; 6: 4.0hr) (B) Agar 4.0% (w/v) (G: Galactose; 1: 1.0hr; 2: 2.0hr; 3: 2.5hr) (C) Agar 6.0% (w/v) (G: Galactose; 1: 1.0hr; 2: 1.5hr; 3: 2.0hr, 4: 2.5hr; 5: 3.0hr; 6: 3.5hr; 7: 4.0hr) (D)Agar 8.0% (w/v) (G: Galactose; 1: 1.0hr, 2: 2.0hr; 3: 2.5hr; 4: 3.0hr ; 5: 3.5hr) (E) Agar 10% (w/v) (G: Galactose; 1: 1.5hr; 2: 2.0hr; 3: 2.5hr, 4: 3.0hr; 5: 3.5hr) (F) Agar 15% (w/v) (G: Galactose; 1: Biose (R_f=0.43); 2: Tetraose (R_f=0.23) 3: Hexaose (R_f=0.12); 4: 1.5hr, 5: 5.0hr, 6: 2.5hr 7: 3.0hr; 8: 3.5hr)

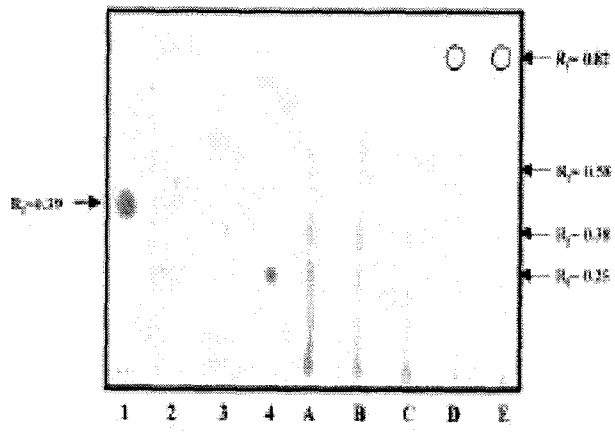


Fig. 57. TLC analysis of acetic acid (0.5, 1.0, 1.5, 3.0, 5.0 N) hydrolysates from agar 10.0 % (w/v)) at several reaction times. 1: Galactose (R_f=0.39); 2: Biose (R_f=0.43); 3: Tetraose (R_f=0.23); 4: Hexaose (R_f=0.12); A: 0.5 N acetic acid; B: 1.0 N acetic acid; C: 1.5 N acetic acid; D: 3.0 N acetic acid; E: 5.0 acetic acid

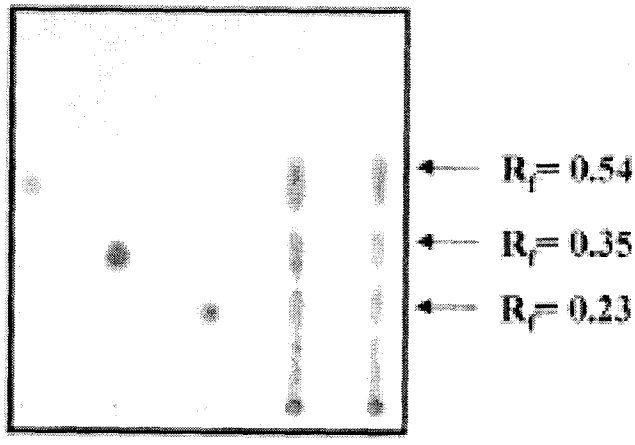
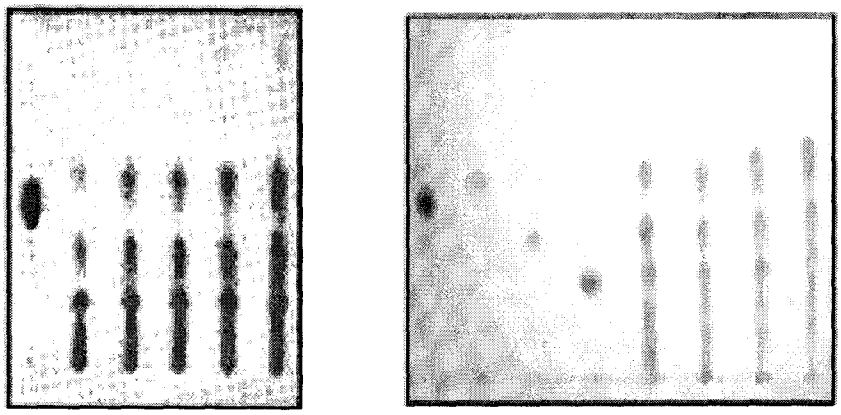


Fig. 58. Comparison of TLC analysis of acetic acid (1.5 N) hydrolysates from agar. A: Biose (Rf=0.50); B: Tetraose (Rf=0.33); C: Hexaose (Rf=0.22); D: Hydrolysates using microwave irradiation method (80min); E: Hydrolysates using stir-heation method (3.5hr)



(A) (B)

Fig. 59. Comparison of TLC analysis of acetic acid hydrolysates from washed agar (A) and non-washed agar (B) (agar 10.0% (w/v), acetic acid 1.0N, reaction times: 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5hr).

4. 한천올리고당이 장내 세균에 미치는 영향 탐색

가. 균주의 선정

(1) 병원성 균주

한천올리고당의 항균활성을 측정하기 위해 *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Listeria monocy -togens* (KCTC 3710), *Staphylococcus aureus*(ATCC 12595), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1925) 등 식중독 및 식품변패균 4종과 충치균 *Streptococcus mutans* (KCTC 3065) 등 총 5종의 병원성 균주를 사용하였다.

(2) 장내 유용 세균

한천올리고당의 장내유용세균에 대한 증식활성을 측정하기 위하여 *Bifidobacterium infantis* (KCTC 3127), *Bifidobacterium bifidium* (KCTC 3440), *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3145), *Lactobacillus delbrueckil* subsp. *bulgaricus* (KCTC 3635) 등 총 4종의 균주를 사용하였다.

나. 병원성 균주의 배양조건

(1) 배양배지

병원성 균주의 종류에 따라 사용된 배양 배지의 종류와 그 조성은 Table 23~26와 같다. *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Salmonellatyp himurium* (KCTC 1925)의 경우 TSB (Tryptic Soy Broth) (Table 24), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12595)의 경우 *Micrococcus* Medium (Table 25), *Listeria monocytogens* (KCTC 3710), *Streptococcus mutans* (KCTC 3065)의 경우 BHIA (Brain Heart Infusion Agar) (Table 26)를 사용하였다.

(2) 배양방법

실험에 사용된 모든 병원성 균주는, 10 ㎖test tube 내의 4 ㎖액체배지에 1차 접종시켜 37℃, 180 rpm에서 18~24시간 진탕배양한 다음, 100㎖삼각 플라스크 내의 20 ㎖액체배지에 전배양액 1 %(v/v)를 2차 접종한 후 37℃, 180 rpm의 조건으로 18~24시간 진탕배양하였다.

Table 23. List of strains and media used for antimicrobial experiments

Strains		Media
Bacillus cereus	KCTC 1012	TSA
Salmonella typhimurium	KCTC 1925	
Staphylococcus aureus	ATCC 12595	*Micrococcus* medium
Listeria monocytogens	KCTC 3710	BHIA
Streptococcus mutans	KCTC 3065	

Table 24. Composition of tryptic soy broth (TSB)

Components	Tryptic soy broth (TSB)
Trytone	17.0 g
Soytone	3.0 g
Dextrose	2.5 g
NaCl	5.0 g
K_2HPO_4	2.5 g
Distilled water	1.0 L
pH	7.4

Table 25. Composition of *Micrococcus* medium

Components	*Micrococcus* medium
Peptone	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Beef extract	1.5 g
Glucose	1.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 L
pH	7.4

Table 26. Composition of brain heart infusion agar (BHIA)

Components	Brain heart infusion agar (BHIA)
Calf brains, Infusion from	200.00 g
Beef heart	250.00 g
Proteose peptone	10.00 g
Dextrose	2.00 g
NaCl	5.00 g
Na_2HPO_4	2.50 g
Agar	15.00 g
Distilled water	1.00 L
pH	7.4

다. 장내 유용 세균의 배양조건

(1) 배양배지

장내 유용 세균의 종류에 따라 사용된 배양 배지의 종류와 그 조성은 Table 27~29에 나타내었다. *Bifidobacterium infantis* (KCTC 3127)의 경우 *Bifidobacterium* Medium (Table 28), *Bifidobacterium bifidium* (KCTC 3440), *Lactobacillus acidophilus*(KCTC 3145), *Lactobacillus delbrue-ckil* subsp. *bulgaricus* (KCTC 3635)의 경우 *Lactobacilli* MRS Broth (Table 29)를 사용하였다.

(2) 배양방법

실험에 사용된 모든 장내 유용 세균은, KCTC로부터 분양 받은 균주의 분말을 100㎖삼각플라스크의 20㎖액체배지에 1차 접종하고 37℃, 180rpm에서 24~48시간 진탕배양한 다음, 100㎖삼각 플라스크 내의 20㎖액체배지에 전배양액 1%(v/v)를 2차 접종한 후 37℃, 180rpm의 조건으로 24~48시간 진탕배양하였다.

라. 장내 유해 세균에 대한 항균 활성 측정

병원균에 대한 한천올리고당의 항균력을 측정하기 위해 semi-solid agar를 이용한 한천평판법(agar diffusion method)을 사용하였다. 각 균주의 배양액이 630nm에서 흡광도가 약 0.2가 되었을 때, test tube 내에 40~45℃로 유지시킨 4 ㎖의 semisolid agar (기본배지에 agar 0.3 %(w/v) 첨가) 배지에 0.5 %(v/v) 접종하여 한천고체평판배지에 도말하였다. 여기에 한천올리고당 용액을 농도별(0.4, 0.7, 1.0, 3.0, 5.0 %(w/v))로 흡수시킨 paper disk (8 mm, Advantec Tokyo, Japan)를 거치시키고 37℃에서 24시간 배양한 후, 그 저지환을 측정하였다.

병원성 균주 *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Listeria monocytogens* (KCTC 3710), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12595), *Streptococcus mutans* (KCTC 3065), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1925) 등 5종에 대해 한천평판법을 이용한 항균활성 검증결과는 Fig. 60와 같다. *Bacillus cereus* (KCTC 1012), *Streptococcus mutans* (KCTC 3065), *Salmonella typhimurium* (KCTC 1925) 등 3종에 대해서는 0.7 %의 한천올리고당을 첨가했을 때 저지환의 크기가 10~ 12mm로 항균활성을 보였으며, 1.0 % 이상에서는 저지환의 크기가 12~23mm으로 매우 높은 항균활성을 보였다. *Listeria monocytogens* (KCTC 3710), *Staphylococcus aureus*(ATCC 12595) 등 2종에 대해서는 높은 항균성을 나타내지는 않았으나, 1.0% 이후의 한천올리고당 첨가의 경우 그 저지환의 크기가 10~13 mm로 항균활성이 존재하는 것을 알 수 있었다. 각 균주에 대한 저지환의 직경을 측정하여 Table 30에 나타내었다.

Table 27. List of strains, media and sources for useful intestinal bacteria

Strains		Media	Sources
Bifidobacterium infantis	KCTC 3127	*Bifidobacterium* media	from infant intestine
Bifidobacterium bifidium	KCTC 3440	*Lactobacilli* MRS broth	from adult intestine
Lactobacillus acidophilus	KCTC 3145		from human intestine
Lactobacillus delbrueckil subsp. *bulgaricus*	KCTC 3635		from bulgarian yoghourt

Table 28. Composition of *Bifidobacterium* medium

Components	*Bifidobacterium* medium
Yeast extract	5.0 g
Peptone	3.0 g
Tryptone	1.5 g
Casitone	1.0 g
Glucose	20.0 g
Tween 80	2.0 ㎖
Dilute tomato juice	1.0 L
pH	6.8

Table 29. Composition of *Lactobacilli* MRS broth

Components	*Lactobacilli* MRS broth
Proteose peptone	10.00 g
Beef extract	10.00 g
Yeast extract	5.00 g
Dextrose	20.00 g
Sorbitan monooleate complex	1.00 g
Ammonium citrate	2.00 g
CH_3COONa	5.00 g
$MgSO_4$	0.10 g
$MnSO_4$	0.05 g
Na_2HPO_4	2.00 g
Distilled water	1.00 L
pH	6.5

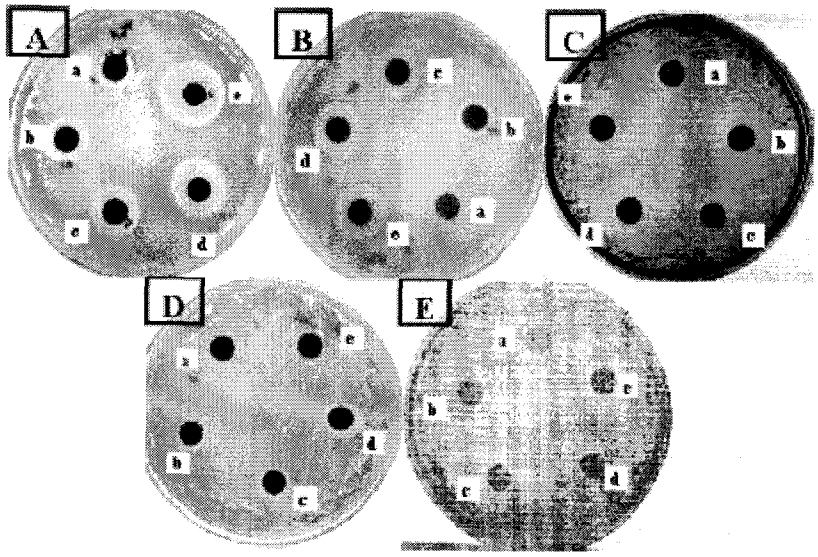


Fig. 60. Antimicrobial activity of agarooligosaccharides to several pathogens. A: *Bacillus cereus* (KCTC 1012); B:*Listeriamonocy togens* (KCTC 3710); C: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12595); D: *Streptococcus mutans* (KCTC 3065); E: *Salmonellatyp himurium* (KCTC 1925) a: 0.4 % agarooligosaccharides b: 0.7 % agarooligosaccharides; c: 1.0 % agarooligosaccharides; d: 3.0 % agarooligosaccharides; e: 5.0 % agarooligosaccharides

Table 30. Antimicrobial activity of agarooligosaccharides against several pathogens

Strain / *A.O. Content(%)	Clear Zone (mm)				
	B. cereus	*S. typimurium*	*S. mutans*	*L. monocytogens*	*S. aureus*
0.4	-	-	-	-	-
0.7	-	-	-	-	-
1.0	12	10	13	-	-
3.0	18	16	18	12	11
5.0	23	19	23	15	13

* A.O. : Agarooligosaccharides

마. 장내 유익 세균 증식효과 측정

한천올리고당의 장내 유익균에 대한 증식효과를 측정하기 위해, 장내 유익균 각 배양액에 한천올리고당을 농도별(0.2, 0.5, 1.0 %(w/v))로 첨가하여 배양한 후 630nm에서 흡광도를 측정하여 한천올리고당을 첨가하지 않은 대조군과 증식정도를 비교하였다.

장내 유용 세균 *Bifidobacteriuminf antis* (KCTC 3127), *Bifidobacterium bifidium* (KCTC 3440), *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3145), *Lactobacillus delbrueckil* subsp. *bulgaricus* (KCTC 3635) 등 4종에 대한 한천올리고당의 증식효과를 측정하기 위해 각 균주의 배양액에 한천올리고당을 농농도별(0.2, 0.5, 1.0 %(w/v))로 첨가하여 첨가하지 않은 대조군과 증식정도를 비교하였다(Fig. 61). *Bifidobacterium infantis* (KCTC 3127)와 *Lactobacillus delbrueckil* subsp. *bulgaricus* (KCTC 3635)의 경우에는 균주 자체의 증식정도가 낮아 한천올리고당에 의한 증식효과도 거의 나타나지 않은 것으로 보여지며, 반면 *Bifidobacterium bifidium* (KCTC 3440), *Lactobacillus acidophilus* (KCTC3145)의 경우에는 0.5 % (w/v)의 한천올리고당을 첨가했을 경우 가장 높은 증식효과를 나타냄을 알 수 있었다. 특히 *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3145)의 경우에는 배양 후 35시간만에 2배 이상의 증식효과를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 산 가수분해에 의해 생성된 한천올리고당의 경우에도 장내 유용세균에 대해 증식효과를 나타냄을 알 수 있었다.

5. 최적반응 process 및 대량분리 공정법의 개발

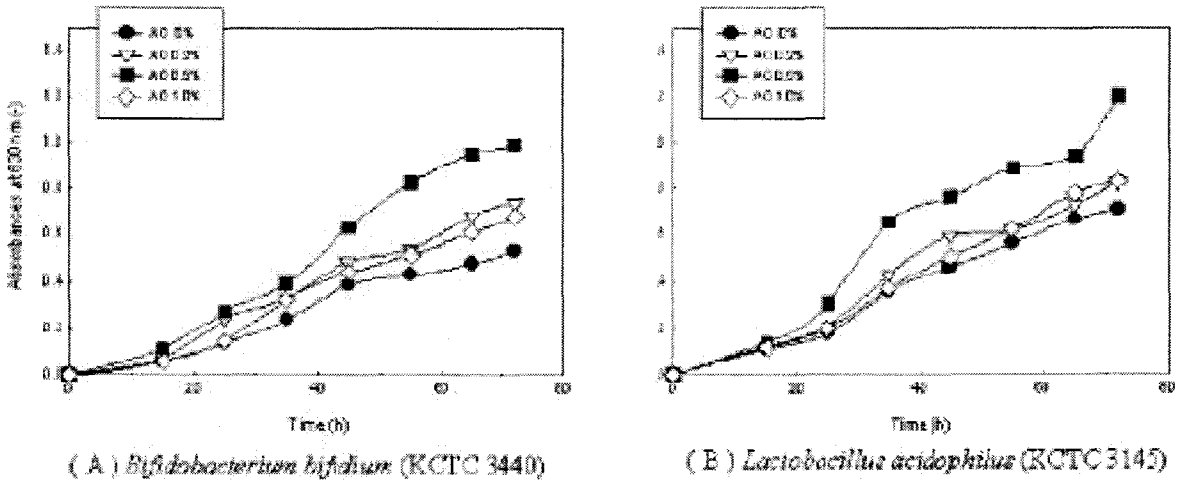
산 가수분해법을 실시한 반응용액 내에는 다량의 산이 함유되어 있으므로, 일반적으로 이것을 중화하고 그에 따른 부산물을 제거해야하는 과정이 필수적이다. 그러나 중화과정을 거치게 되면 반응 후 다량의 염이 생성되기 때문에 회수율이 낮아져 생산량에 영향을 미치게 된다. 따라서, 중화과정을 거치지 않고 동결건조 및 진공감압건조를 이용하여 초산을 제거하는 방법에 대하여 연구하였다.

가. 중화에 따른 영향

산 가수분해법에서 필수적인 반응물의 중화과정이 생산물의 회수율에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 62). 반응액을 NaOH로 중화시킨 후 동결건조한 것과, 중화과정을 거치지 않은 반응액을 동결건조 및 진공감압건조 시킨 올리고당 분말의 전당량을 비교하였다. 산가수분해물 내의 전당량은, 중화시켰을 경우가 가장 낮았으며 동결건조에 의해 회수된 것이 가장 높았다. 즉, 중화시킬 경우 반응물 내에 염의 양이 증가하여 전체적인 회수율에 크게 영향을 미치게 됨을 알 수 있다.

나. 진공감압건조에 의한 분리방법

산 가수분해 반응물 내에 잔존해 있는 초산을 제거하는 또 다른 방법으로, 항온수조와 회전진공증발기를 이용한 진공감압건조법을 실시하였다. 감압 농축된 분말은 에탄올에 혼합시켜 stirring하면서 24 h 동안 세척한 후 여과시켰고, 이것을 80℃ dry oven 내에서 건조시켜 한천



(A) *Bifidobacterium bifidum* (KCTC 3440)　　(B) *Lactobacillus acidophilus* (KCTC 3145)

Fig. 61. Effect of agarooligosaccharieds produced by acetic acid hydrolysis on the growth of intestinal microorganisms of human.

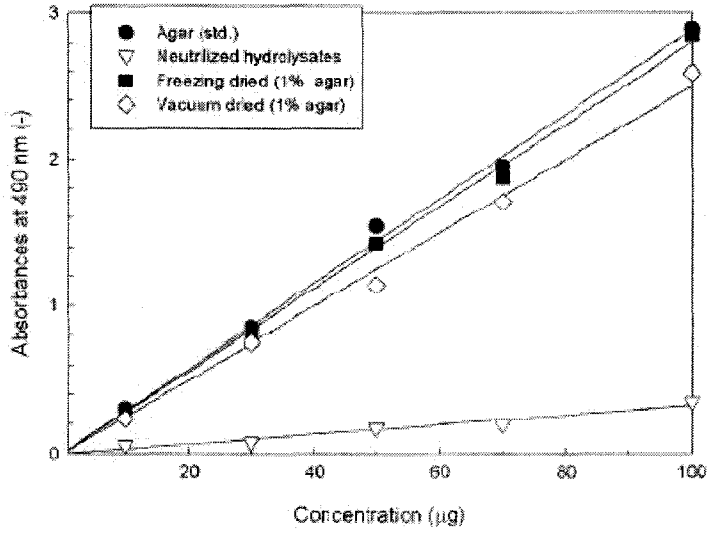


Fig. 62. Comparison of total sugar contents in agar (std.) and acid hydrolytic products separated by freezing drier and vacuum drier and neutralized by NaOH.

올리고당 분말을 회수하였다. 회수된 분말을 증류수에 녹여 농도별로 전당량을 측정하여 비교한 결과, 동결건조의 경우와 마찬가지로 낮은 농도의 반응액일수록 전당량이 높아짐을 알 수 있었다(Fig. 63).

다. 동결건조에 의한 분리방법

(1) 동결건조된 한천올리고당의 전당량 측정

산 가수분해 반응물 내에 잔존해 있는 초산의 제거방법으로, 초산의 어는점이 16.7℃인 것을 이용하기 위하여 동결건조를 실시하였다. 첨가된 한천 농도별(1, 5, 10 %)로 동결건조를 실시한 결과, 연황색 분말을 얻을 수 있었다. 동결건조에 의해 분리된 농도별 한천올리고당 분말을 증류수에 녹여 전당량을 측정한 결과, 낮은 농도에서 더욱 초산 제거 효율이 높게 나타났다(Fig. 64).

(2) NMR 분석

산 분해로 생성된 한천올리고당과 효소 분해 한천올리고당의 구조를 1H-NMR 분석 비교해 본 결과, 두 경우 모두 생성된 한천올리고당이 β-D-galactose와 3,6-anhydro-L-galactose가 동일하게 연결되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 65).

6. 한천올리고당의 대량생산공정 개발

가. 초산 가수분해법을 이용한 한천올리고당의 생산공정도

한천올리고당 생산 공정은 크게 기질인 한천의 액화공정, 초산 첨가 후 당화공정, 반응기에서 생산된 한천올리고당의 농축공정으로 분류할 수 있다. 또한 반응물을 여과, 탈염, 탈색하는 공정은 추가로 첨가되어져야 하는 공정이다.

본 연구에서는 이러한 공정을 가지고 한천올리고당을 생산하는 데 있어 각 공정의 운전조건과 공정효율을 높이기 위한 최적 생산 process를 설계하고자 하였다.

상기 실험방법 및 결과에 따라 작성된 초산 가수분해법을 이용하여 정리한 소규모의 한천올리고당 생산공정도는 다음과 같다 (Fig. 66).

나. 대량생산공정

실험실 상에서 500㎖ level로 실시한 초산 가수분해법으로부터 얻은 결과를 바탕으로 50ℓ 반응기를 제작하여 대량생산에 응용하였다(Fig. 67).

다. 생산된 한천올리고당의 분석

본 반응조에서는 감압, 가열 방식으로 한천을 분해하였으며, 한천올리고당 생산 공정의 설계에서 액화는 80, 90, 100, 110, 120℃에서 10분간 액화시킨 결과 80℃이상에서 완전히 이루어졌

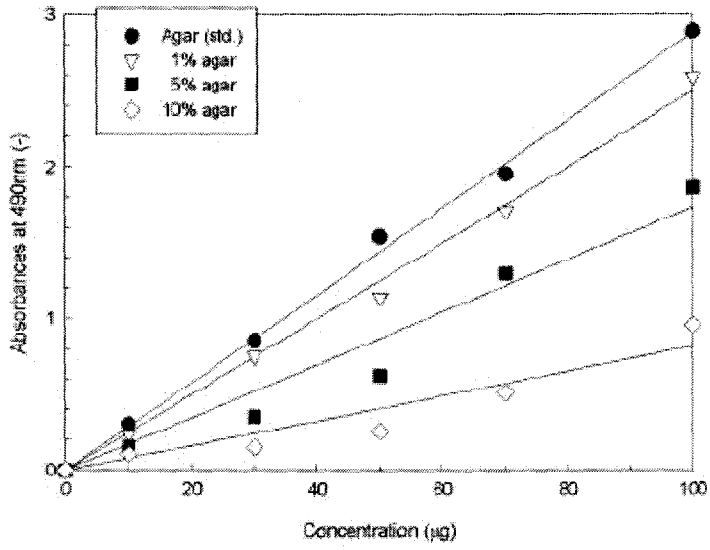


Fig. 63. Comparison of total sugar contents in agar (std.) and acid hydrolytic products separated by vacuum drier.

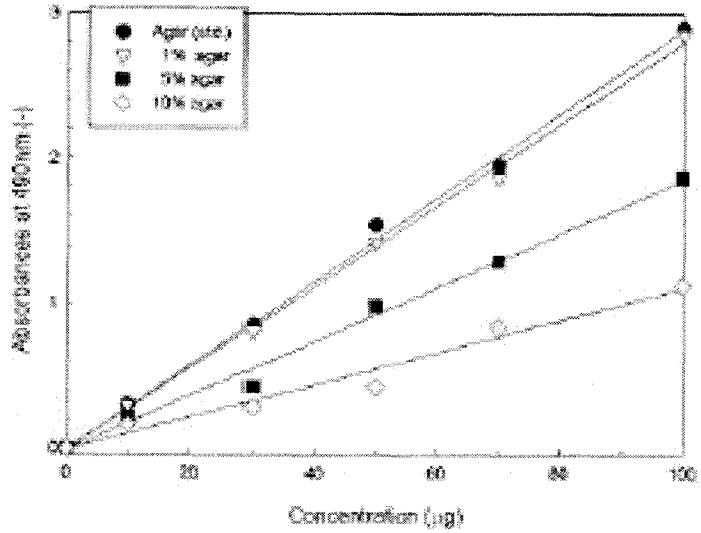
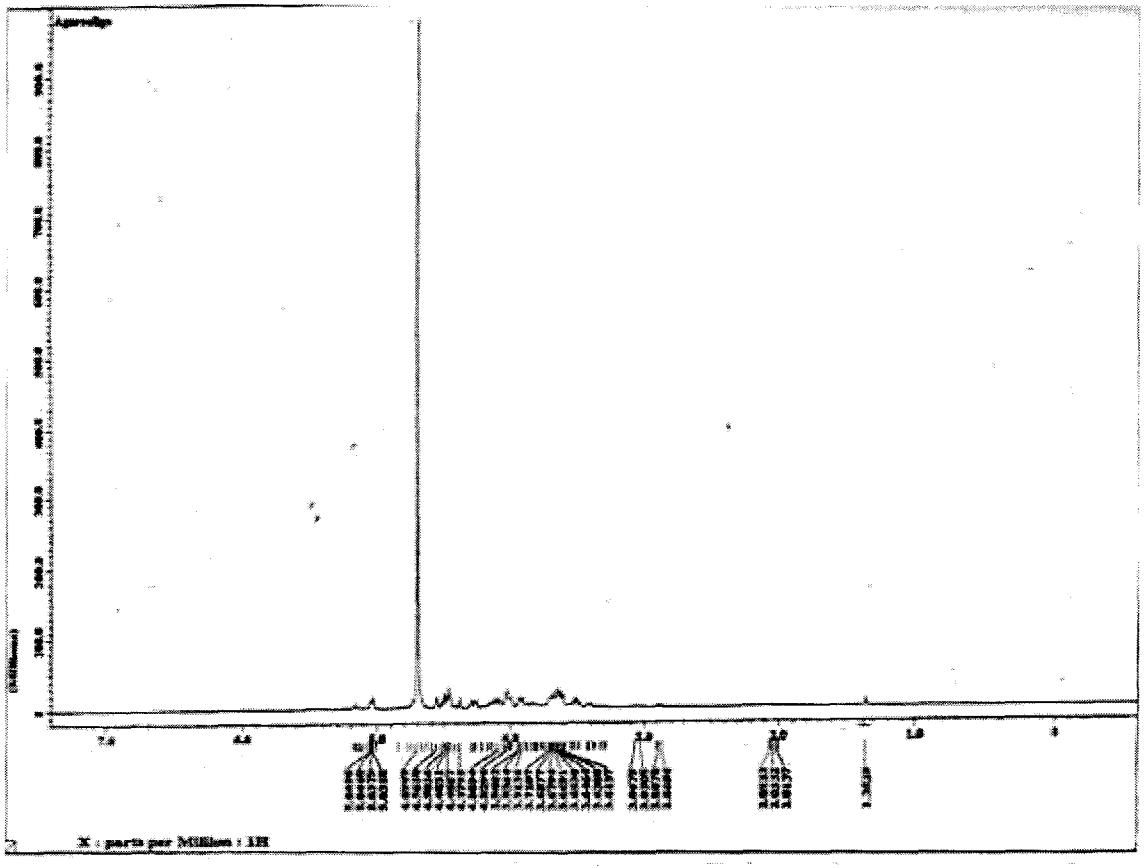


Fig. 64. Comparison of total sugar contents in agar (std.) and acid hydrolytic products (added 1, 5, 10% (w/v) agar) separated by freezing drier.

(A)



(B)

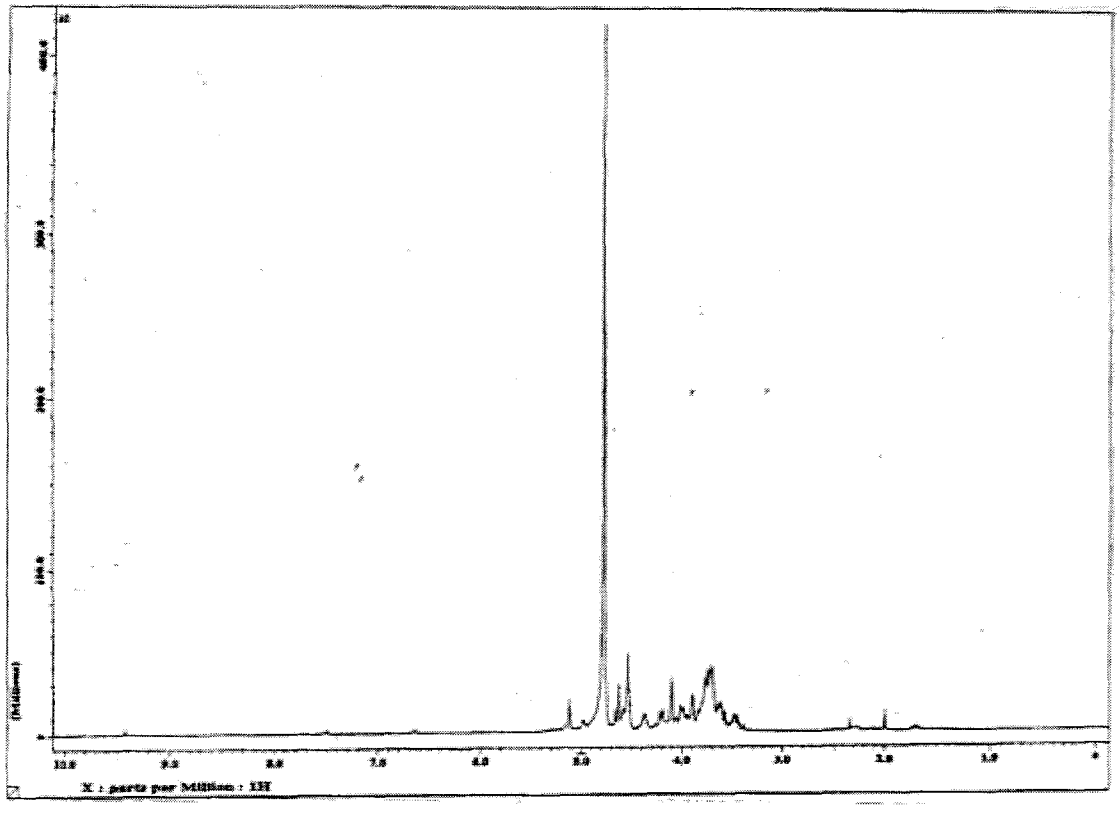


Fig. 65. ^{1}H-NMR spectrum of agarooligosaccharides produced by acetic acid hydrolysis(A) and enzymatic hydrolysis(B).

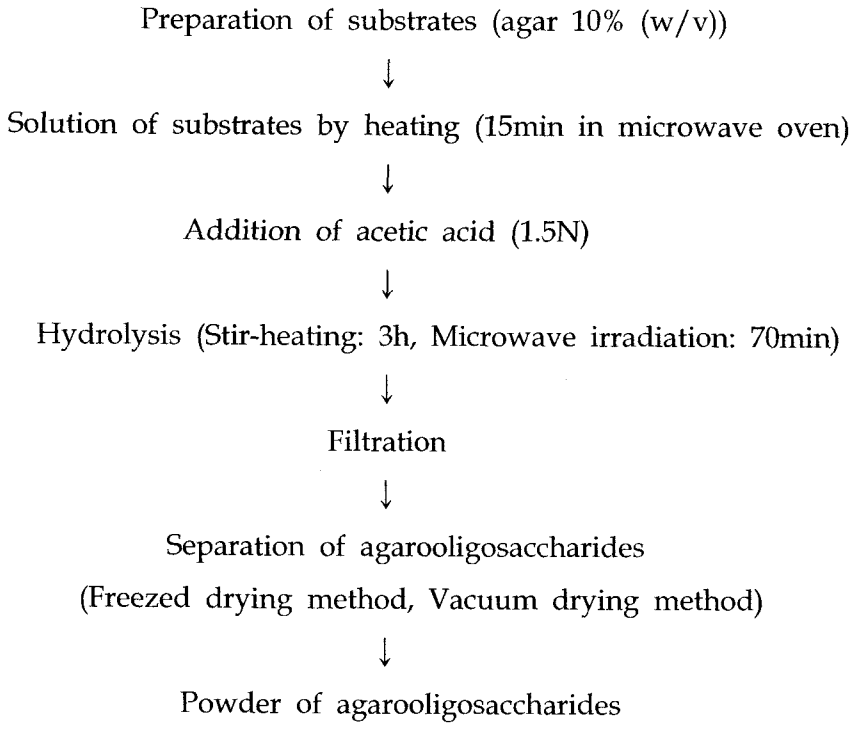


Fig. 66. Producing process of agarooligosaccharides using acetic acid hydrolysis

다. 본 연구에서는 액화공정을 80℃, 30분, 압력 1kg/cm^{2}으로 설계하였으며, 선행된 실험결과로부터 10 % 기질을 사용하여 한천올리고당을 생산하는 공정에서 반응기의 온도는 60~70℃를 유지하고 반응기내에 충분 교반이 이루어지도록 하였다. 효소 반응시 액화된 기질을 30~40℃까지 냉각시킨 후 반응시켜야하는 공정이 필요하므로 낮은 온도에서 기질의 겔화를 방지하기 위하여 0.5 % 이상의 기질을 사용할 수가 없었다. (이 문제점을 해결하기 위해 한천 겔의 입방화라는 새로운 개념을 도입하였으며 보완된 결과치를 얻어내었다) 그러나 산 가수분해시에는 반응온도를 내릴 필요가 없으므로 기질의 농도를 10.0 % 이상까지 고농도에서 분해를 실시할 수 있었으므로 효소가수분해에 비해 30배 이상의 한천올리고당을 생산해 낼 수 있었다.

반응기의 특성상 동결건조는 고가의 장치 및 비용이 소비되므로 감압을 이용한 초산의 휘발을 유도하였으며, 감압 조건하에서 농축, 분말 상태로 제품화할 수 있었다.

대량생산공정에 따라 생산된 한천올리고당의 성분을 TLC로 살펴본 결과, 500 ㎖ level에서의 결과와 동일하게 2, 4, 6당으로 뚜렷이 분해되었다(Fig. 68).

7. 한천올리고당의 경제성 검토

본 항목에서는 한천올리고당 생산비용을 다른 올리고당 생산 공정과 비교하여 올리고당 생산 공정에서의 경제성을 분석하고자 하였다.

한천올리고당은 다른 올리고당에 비해 전분의 노화방지와 항충치성 및 난소화성, 장내의 비피더스균의 증식 활성과 정균작용 등의 기능을 가지고 있으며, 특히 이들 일반올리고당이 가지지 않은 면역활성, 항암작용, 항산화기능, 항돌연변이능을 가지고 있어 식품의 영양기능, 감각기능과 생체조절기능의 기능성 식품소재로서의 이용이 기대되고 있다. 또한 한천올리고당의 원료인 한천원료의 확보가 용이하고 그 가격이 저렴하며 한천올리고당이 고유의 다양한 기능성을 가지고 있으므로 고부가가치를 창출할 수 있다고 분석된다. 산업화되어 판매되는 올리고당과 가격면에서 비교해 보면 일반 올리고당은 kg 당 3,000-6,000 원으로 효소로 가수분해하여 얻어진 한천올리고당(100,000-200,000원)에 비해 매우 저렴하다. 그러나 산 가수분해를 통하여 그 단가를 15~20배 가량 낮출 수 있었으며, 다음 년도의 과제를 충실히 수행한다면 가격의 차이를 좀 더 좁힐 수 있고, 또한 기능성 면에서 비교될 수 없는 우수성이 있으므로 이점을 부각시켜 소비자들에게 인식된다면 현재의 넓은 올리고당 시장 진출이 가능하다고 분석된다.

한천올리고당보다 비싼 키토올리고당이 다른 올리고당보다 뛰어난 기능성으로 소비자들에게 인지도 높은 건강보조식품으로 각광받는 것을 보면, 한천올리고당의 시장확대도 어려운 일이 아닐 것이며, 특히 키토올리고당 보다 저렴한 제조단가, 그리고 뛰어난 기능성 면을 부각시키면 기존 당류와 경쟁 가능성도 무한하여 한천올리고당의 시장확대 가능성은 밝다고 할 수 있다.

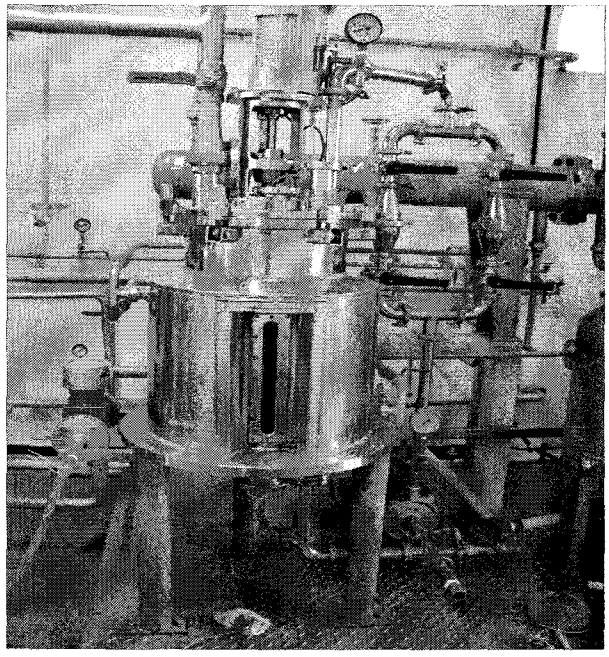


Fig. 67. The reactor for mass-production of agarooligosaccharides from agar

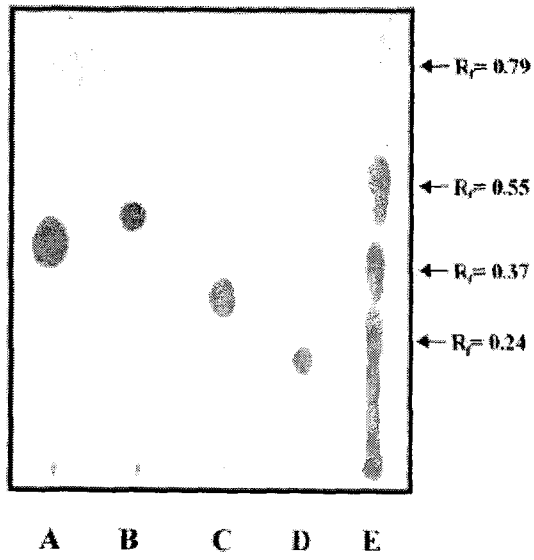


Fig. 68. TLC analysis of acetic acid hydrolysates from agar using mass-production process

8. Scale-up에 대한 설계기준 설정

한천 올리고당 생산의 실험장치를 통하여 얻어진 자료와 현재 생산되고 있는 올리고당의 생산공정을 검토하여 한천올리고당 대량생산의 Scale-up에 대한 설계기준과 조작조건을 설정하고자 하였다.

한천올리고당 대량생산 공정에서 액화된 기질을 원료 탱크에서 반응기로 연속적으로 공급하기 위해서는 액화된 기질이 겔화되지 않은 대용량의 원료저장 탱크가 필요하다. 효소 반응과 달리 유기산에 의한 한천올리고당 생산시 온도에 대한 영향을 전혀 받지 않으므로 냉각시간과 반응시간을 절대적으로 절약할 수 있다. 또한 효소 반응시 기질 농도가 최종 제품량에 큰 영향을 미친데 반하여 10 % 이상의 고농도 한천을 반응에 사용할 수 있어 한천올리고당 생산 단가를 매우 낮출 수 있었다.

제 4 절 참 고 문 헌

1. **Barbry, D., Pasquier, C., and Faven C.,** 1995, Alkylation and hydrosysis of phenylaceton -itriles under microwave irradition. *Synthetic Communications,* **25**(19), 3007-3013.

2. **Boyes, S., Chevis, P., Holden, J. and Perera, C.,** 1997, Microwave and water blanching of corn kernels: Control of unifomity of heating during microwave blanching. *J. of Food Processing and Preservation,* **21**, 461-484.

3. **Cheng, M. C., Wang, K. T., Inoue, S., Inoue, Y., Khoo, K. H., and Wu, S. H.** 1999, Controlled acid hydrolysis of colominic acid under microwave irradiation. *Analytical Biochemistry,* **267**, 287-293.

4. Difco laboratories. 1984. Difco manual(Dehydrated culture madia and reagents for microbiology), DETROIT, USA, 10th, p561, Difco laboratories.

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

6. **Hwang, S. H., S. D. Ha, J. D. Kim, S. K. Kim and J. Y. Kong,,** 1995, Isolation and purification of agarase from marine microorganism(Pseudomonas sp. W7), The 3rd Academic Plaza in International Exhibition '95, 70-71, Makuhari, Japan.

7. **Kennedy, J. F., A. J. Griffiths, and D. P. Atkins.** 1984, The application of hydrocolloids, recent developments, future trends. In: Gums and stbilizers for the food industry. Philips, G. O., D. J. Wedlock, and P. A. Williams. p.417.

8. **Kennedy, J. F., C. A. White.** 1983, Bioactive carobohydrates. In: Chemistry biochemistry and biology, Edis Horwood. Ltd.

9. **Kim, B. J., S. D. Ha, D. J. Lim, C. M. Song and J. Y. Kong.,** 1998, Produciton of agarooligosaccharides using of agarase from marine bacterium Bacillus cereus ASK202. *Kor. J. Biotech. Bioeng.,* **13**(5), 524-529.

10. **Lee, H. W., B. J. Kim, S. H. Hwang and J. Y. Kong.,** 1997, Isolation and identification

of marine bacterium Bacillus cereus ASK202 and optimal culture condition for the production of agarase. *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **12**(2), 228-235.

11. **March, J. G., Grases, F., and Salvador, A.** 1998, Hydrolysis of phytic acid by microwave treatment pharmaceutical preparations. *Microchemical Journal*, **59**(3), 413-416.

12. **Meer, W.** 1980, In: Handbook of water soluble gums and resins. Davidson, R. L. (ed.), McGraw Hill, p.71-719.

13. **Morley, R. G.** 1984, Utilization of Hydrocolloids in formulated foods in gums and stabilizers for the food industur 2. Philips, G. O., D. J. Wedlock, and P. A. Williams,(eds.), p.211. Pergamon Press, Oxford.

14. **Pereiro, I. R., Schmitt, V. O., Szpunar, J., Dibard, O. F. X, and Lobinski, R.** 1996, Speciation analysis for organotin compounds in biomaterials after integrated dissolution, extraction, and derivatization in a focused microwave field. Anal. Chem, **68**, 4135-4140.

15. **Perry, E. S., and A. Weissberger,** 1967, Thin-layer chromatography, p. 168-169. Interscience Publishers, New York.

16. **Plazl, I., Leskovsek, and S., Koloini, T.,** 1995, Hydrolysis of sucrose by conventional and microwave heating in stirred tank reactor. *The Chemical Engineering Journal*, **59**, 253-257.

17. **Schmitt, V. O., Szpunar, J., Donard, O. F. X., and Lobinski, R.,** 1997, Microwave accelerated sample preparation for speciation analysis of organotin compounds in biomaterials. *Canadian Journal of Anaylical Sciences & Spectroscopy*, **42**(2), 41-49.

18. **Sierra, I., Vidal-Valverde C., Olano, A.,** 1999, The effects of continuous flow microwave treatment and conventional heating on the nutritional value of milk as shown by influence on vitamin B_1 retention. *Eur. Food Res. Technol.*, **209**, 352-354.

19. **Somogyi, M,** 1952, Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.

20. **Yu, H. M., Chen, S. T., Suree, P., Nuansri, R., and Wang, K. T.** 1996, Effect of microwave irradiation on acid-catalyzed hydrolysis of starch. *J. Org. Chem.*, **61**,

9618-9609.

21. 中村良 외 3인, 1998, 식품기능화학, 지구문화사, chap. 6.

22. 加藤之進. 1999, 寒天とアガロオリゴ糖の機能性, 食品と開發, **33**(12), 44-46.

23. 福井作藏. 1969, 환원당の정량법, 일본, p8-14, 학회출판センタ-.

24. 금준석, 1999, 마이크로파를 이용한 식품의 가공공정. *식품과학과 산업*, **32**(1), 12-18.

25. 금준석, 조윤성, 2000, 식품산업에서 마이크로파를 이용한 살균방법. *식품과학과 산업*, **33**(2), 12-18.

26. 서진호. 1994. "국내올리고당 연구 및 개발동향", *식품과학과 산업*, **27**(4), 8-11

27. 손종철, 1999, 전자레인지(Microwave Oven)란 무엇인가?, *식품과학과 산업*, **32**(1), 2-11.

28. 해양수산부, 1997, 해양수산통계연보, p.987.

제 4 장 한천올리고당 pilot의 제작 및 산업화 기술개발

제 1 절 서 론

최근에 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연식품 소재 개발에 많은 연구가 이루어지고 있으며 또한 기능성 식품인 여러종류의 올리고당에 대한 수요가 늘어나고 있다.

올리고당은 고부가가치 천연 감미료로 다양한 기능성 때문에 새로운 식품소재로 각광 받고 있다. 특히 한천올리고당은 전분의 노화방지와 항충치성 및 난소화성, 장내의 비피더스균 증식 활성과 정균작용이 있다. 이런 특성으로 식품의 영양기능, 감각기능과 생체조절기능의 기능성 식품소재로 이용이 기대된다. 한천올리고당은 한천분해 미생물이 생성하는 분해효소인 Agarase의 작용으로 생산되는데 한천올리고당의 원료로 사용되는 한천은 국내에 풍부한 수산자원으로 이를 이용한 올리고당 생산은 고부가가치를 창출할 수 있다. 그러나 한천분해능을 가진 균주로부터 효소를 분리정제하는 비용이 많이 들고, 효소의 구입가격이 비싸서 한천올리고당의 생산 비용을 낮추기 위해서는 효소고정화가 요구 되어진다. 효소는 일반적 화학촉매와는 달리 상온 및 상압이라는 조건에서 높은 효율로 반응의 촉매작용은 함은 물론 그 작용의 특이성이 대단히 높다. 그러나 이 효소도 본래 그 생물이 살아있는 환경하에서 가장 높은 효율로 작용하기 때문에 촉매로서 이용하려는 면에서 본다면, 효소가 반드시 이상적 촉매라고는 할 수 없다. 즉, 효소는 단백질로 된 것으로서 열, 산, 알카리 및 유기용매 등에 불안정하며, 효소반응을 일으키기에 적절한 환경하에서도 비교적 활성을 잃기가 쉽다. 만일 효소가 그 촉매 활성을 보존하고 있는 채로 물에 불요성으로 만든 고정화 효소를 만들 수 있다면, 위에서 언급한 결점이 많이 해소되므로 화학반응에서 쓰이는 고체 촉매처럼 취급할 수가 있어서 효소의 이용이 아주 유리하게 된다. 효소가 물에 불용성이 되어도 활성을 가진다는 것은 1916년 Nelson과 Griffin에 의해 처음 보고되었다. 일반적으로 화학반응에 쓰이는 고체 촉매와 마찬가지로, 고정화 효소도 공업적 연속 사용을 목적으로 하여 1960년대 초부터 아실아미노산 가수분해효소를 사용하여 DL-아미노산을 광학 분해하는 연속 효소반응의 공업화에 성공하였다. 1960년대 후반에는 일본, 미국, 유럽 등에서 고정화효소에 관한 연구가 급속하게 진전되어 고정화 효소는 고정화 미생물, 고정화 생체촉매로 발전하였다.

고정화 효소(immobilized enzyme)란 어떤 일정한 공간내에 갇힌 상태로 있는 효소로서, 연속적인 효소반응을 행할 수 있고 반응후에 효소를 회수하여 재이용 할 수 잇는 상태의 효소를 말한다. 따라서, 어떠한 조작으로든지 물에 불용성이된 효소는 고정화 효소로서의 조건을 만족하는 것이다. 또, 고분자 화합물을 통과시키지 않는 반투막성 한외여과막을 장치한 용기내에 효소를 넣고 고분자 기질을 가하여 효소반응을 시키면 저분자가 된 반응생성물은 막을 통과하여 연

속적으로 밖으로 나오게 되며, 효소는 한외여과막으로부터 누출되지 않으므로 회수나 재이용이 가능하다. 이 경우도 고정화 효소의 일종이라 할 수 있다. 마찬가지로 고정화 미생물 (immobilized microorganism) 및 고정화 생체 촉매 (immobilized biocatalyst)도 같은 개념으로 정의할 수 있다.

현재까지 모든 고정화 방법에 공통적으로 적용한 이상적인 고정화법은 없고, 각각의 고정화 방법에 따라 특징이 있고 장점과 단점이 다르다. 따라서, 실제로 이용 목적에 맞는 고정화 방법을 선택하여 적용하고 있는 실정이다. 효소 고정화에는 크게 3가지로 나누어 이용되는데 담체 결합법, 가교법 및 포괄법 등이 응용되고 있다. 이중에서 포괄고정화법은 효소를 그대로 고분자 소재를 사용하여 둘러싸는 것과 가두는 고정화 방법이다. 포괄법에 사용되고 있는 고분자 소재로는 콜라겐, 젤라틴, 한천, 카라기난, 아세트산셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 에폭시 수지, 광 경화성 수지, 폴리에스테르, 폴리스티렌, 폴리우레탄 등이 있다.

이 중에서 폴리아크릴아미드, 알지네이트, 카라기난, 광 경화성 수지 등을 많이 사용한다.

포괄법에 의한 활성저하는 포괄할 때 효소가 변성되든지, 겔 또는 막에 의해 기질 또는 반응생성물의 투과속도가 영향을 받는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 포괄고정화에 알지네이트와 키토산을 사용하고자 하였다.

알지네이트나 키토산 비드에 효소 등을 고정화하여 반응시킬 때 용액내의 용질이 효소가 있는 비드의 내부로 전달될 수 있어야 하는데 비드 내부로 용질의 확산전달은 대부분 분자들의 불규칙한 운동에 의하여 발생되는 것으로서 용액상에서 용질의 물질전달에 대한 특성은 기상에 비해서 정확히 규명되지 않았으며 실험자료 또한 충분하지 않은 실정이다.

본 연구팀은 고정화 생체촉매의 입자의 크기 및 형태를 관찰하고자 먼저 포괄고정화 방법으로 많이 이용되고 용이한 알지네이트와 키토산을 담체로 이용한 방법으로 고정화장치(MIA-1 type, EYELA Co., Japan)에서 생성되는 입자의 크기와 형태, 일정한 크기의 입자를 생산할 수 있는 최적조건과 입자의 안정성을 고찰하여 고정화된 효소에 의한 한천올리고당 생산의 기초 자료로 활용하고자 하였다. 또한, 생활수준의 향상에 따른 기능성 식품에 대한 수요의 증대로 여러종류의 올리고당이 생산되고 있으며 한천올리고당에 대한 관심과 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

한천올리고당에 대해서는 한천 분해능을 가진 균주의 분리와 한천올리고당의 기능성에 대한 연구가 대부분으로 최근의 연구에서 한천올리고당이 기존의 올리고당 제품에 비해 체내에 흡수되는 당류의 함유량이 적어 기능면에서 우수하다고 알려져 있어 다른 올리고당보다는 생산성이 낮지만 한천올리고당의 독특한 기능의 연구로 충분한 경제적 가치를 창출할 수 있다고 여겨진다. 하지만 한천올리고당 생산에 효소가 차지하는 비용이 많아 경제성이 낮으므로 효소의 효율적 이용에 관한 연구가 이루어져야 한다. 본 연구에서는 사용된 효소의 회수보다는 효소 고정화에 의한 한천올리고당 생산성을 검토하고자 고정화효소 반응기에서 한천올리고당을 생산하여

고정화에 의한 한천올리고당 생산 가능성을 살펴보았다.

본 연구팀은 고정화된 효소의 최적 활성 조건과 올리고당의 생성율을 높일 수 있는 반응기 형태와 한천올리고당의 대량 생산공정을 설계하여 올리고당을 생산하고자 하였다.

먼저, 효소고정화의 최적조건을 알아보고자 효소 고정화 조건에 다른 효소활성을 살펴보았으며, 올리고당생산에 사용할 반응기의 선정을 위해 여러 가지 반응기에서 전환율을 비교하였다.

생산된 한천올리고당의 농도를 높이고자 1.0 % 한천을 기질로 사용하여 전환율을 향상시키고자 하였다. 자체 제작한 장치에서 올리고당을 생산한 실험 결과로부터 한천올리고당 생산고정을 설계하였으며 각 공정이 조건에 적합하도록 용량과 재질, 사용될 기기 등을 선정하였다. 설계된 공정상의 문제점을 파악하고자 다른 올리고당 생산 공정과 비교 검토하였으며 생산된 한천올리고당의 경제성 비교와 한천올리고당의 대량생산이 가능한지 대형 반응기에서 공정에 대한 최종 확인을 하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 한천분해효소를 이용한 한천올리고당 생산 process의 검증 및 보완

50 L 반응조에서의 한천올리고당 생산 조건 검토 하였다.

2. 유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당 생산 process의 검증 및 보완

2차년도에 나온 실험 결과를 바탕으로 200 L의 대형 반응조를 이용한 한천올리고당 생산을 위한 최적 생산 process를 각각 설계하였다.

3. Process의 설계 및 제작

200 L 대형 반응조에서의 한천 올리고당 대량생산을 위한 공정을 설계하고, 제작한 후 현재, 시험 가동중에 있다.

4. 시제품 생산

본 연구 결과로 생산되는 한천올리고당은 목적에 따라 분말형 또는 액상의 제품형태로 제조중이다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 한천분해효소를 이용한 한천올리고당 생산 process의 검증 및 보완

한천분해효소를 이용한 한천올리고당 생산 공정은 크게 기질인 한천의 액화공정, 효소첨가 후 당화공정, 반응기에서 생산된 한천올리고당의 농축공정으로 분류할 수 있다. 또한 반응물을 여

과, 탈염, 탈색하는 공정은 추가로 첨가되어져야 하는 공정이다.

본 연구에서는 이러한 공정을 가지고 한천올리고당을 생산하는데 있어 각 공정의 운전조건과 공정효율을 높이기 위한 최적 생산 process를 설계하였다.

한천올리고당의 생산에서 기질을 반응기에 공급하여 생산된 올리고당액을 농축공정을 거쳐 분말과 액상농축액으로 제품화하는 전체적인 한천올리고당의 생산공정에 대한 흐름도는 다음과 같다(Fig. 69).

반응조를 50L 크기로 대형화 시킨 후 1차년도 결과인 소형 반응조에서의 반응조건을 기준으로 기질액화 온도 및 시간, 반응기에서 효소의 액화와 관련된 최적온도 및 시간을 조사한 다음, 반응기에서 생산된 올리고당액을 여과공정을 거쳐 이온교환수지에서 탈색과 탈염을 하고 이를 진공증발기에서 농축 건조시킨후 분쇄기에 의해 한천올리고당 분말로 만들거나 농축액을 엑기스로 제품화 하는 전과정을 살펴보았다.

2. 유기산 가수분해법에 의한 한천올리고당 생산 process의 검증 및 보완

유기산 가수분해법을 이용한 한천올리고당 생산 공정은 크게 기질인 한천의 액화공정, 초산 첨가 후 당화공정, 반응기에서 생산된 한천올리고당의 농축공정으로 분류할 수 있다. 또한 반응물을 여과, 탈염, 탈색하는 공정은 추가로 첨가되어져야 하는 공정이다.

초산 가수분해법을 이용한 소규모의 한천올리고당 생산공정도는 다음과 같다(Fig. 70)..

본 공정을 바탕으로 200 L의 대형 반응조 내에서 한천올리고당을 생산하는 데 있어 각 공정의 운전조건과 공정효율을 높이기 위한 최적 생산 process를 설계하고자 한다.

한천올리고당 대량생산 공정에서 액화된 기질을 원료 탱크에서 반응기로 연속적으로 공급하기 위해서는 액화된 기질이 겔화되지 않은 대용량의 원료저장 탱크가 필요할 것으로 예상된다.

3. Process의 설계 및 제작

200 L 대형 반응조에서 한천 올리고당의 대량생산을 위한 공정의 설계 및 계획을 위하여 다음과 같은 항목을 예상할 수 있으며, 이 내용을 검증하였다(Fig. 71).

- Sterilization : 대량생산 시 원료와 설계의 단가를 최대한 절감시킬 수 있고 그 효과를 증가시킬 수 있는 증기에 의한 살균법을 선택했다.
- Vessel size : 기존의 50 L reactor에서 용량을 200 L로 증가시키며 열을 잘 전달시킬 수 있는 stainless로 제작했다.
- Impeller type : 한천이 가수분해됨에 따라서 점도가 높아지게 된다. 이 때 가장 효율적인 turbine Impeller를 사용하였다.
- Evaporator : 한천 가수분해물의 양을 최소화시켜 건조시키기 위해서 농축기를 설치하도록 한다. 농축기는 reactor에 진공을 걸어주는 방법으로 선택했다.

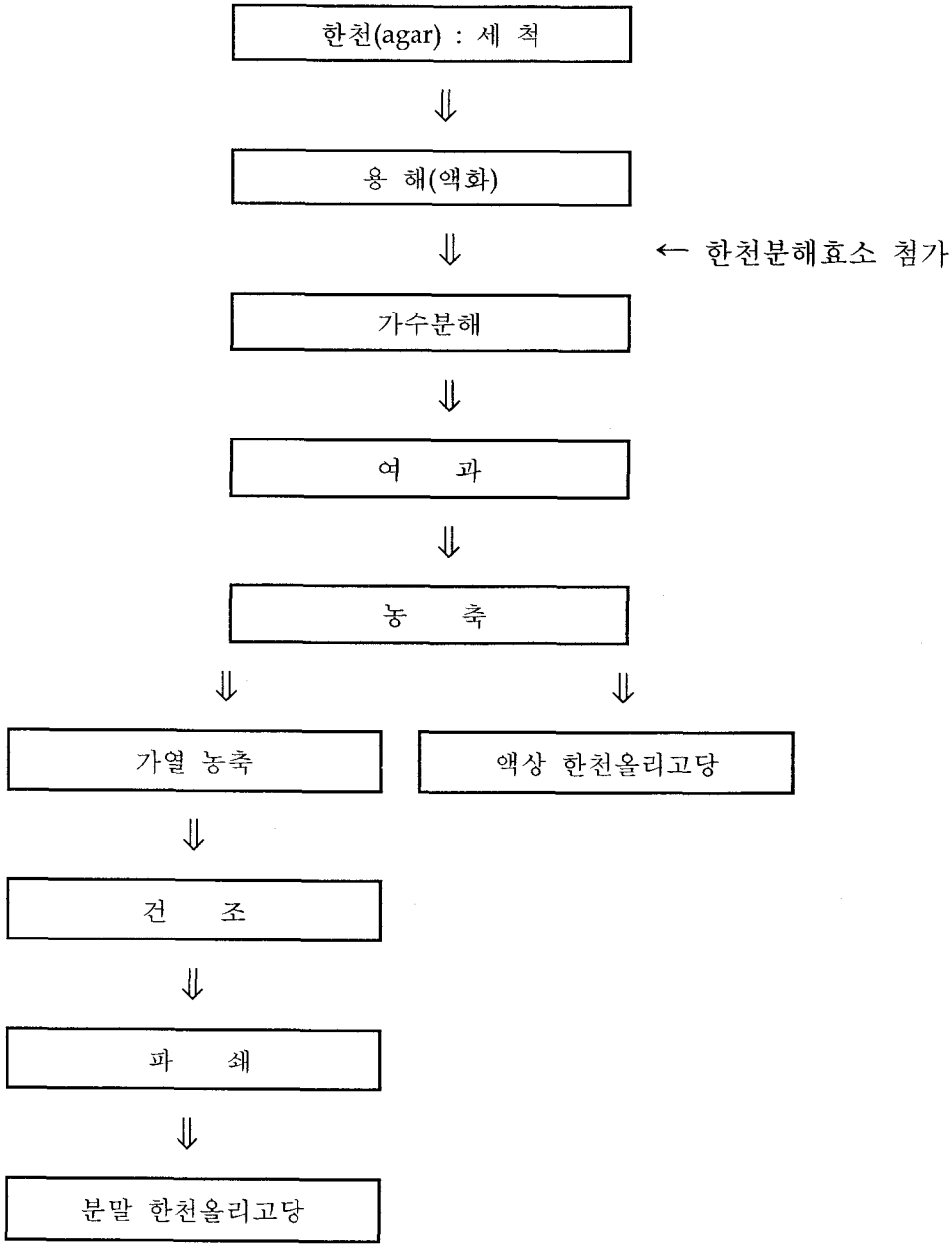


Fig. 69. 생산공정에 대한 흐름도

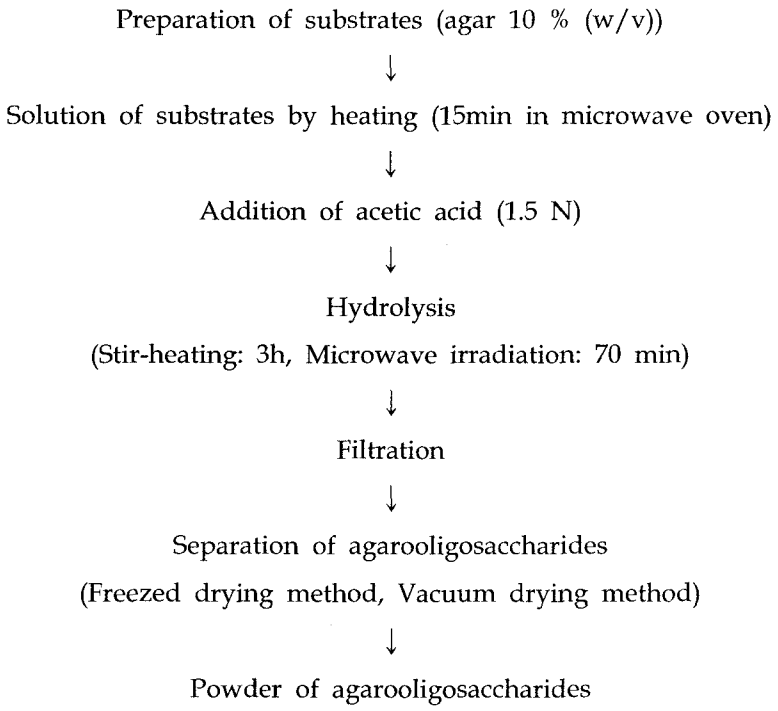


Fig. 70. 초산 가수분해법을 이용한 한천올리고당 생산 공정도

- Dryer : 설비 단가를 낮추고 효율적으로 이용할 수 있는 감압 건조법에 의한 건조기를 제작한다. 건조기 내에 tray를 넣고 농축된 일정 volume의 한천 가수분해물을 넣을 수 있도록 하며 stainless로 제작하여 열이 충분히 전달될 수 있도록 제작했다(Fig. 72-73).
- Controller : 반응기의 온도와 교반기의 속도를 조절할 수 있도록 하고 건조기의 온도를 제어할 수 있도록 설계했다
- 기타 : 온도 및 반응시간 등은 여러 조건으로 실시한다.

4. 시제품 생산

제품의 기능성과 원재료의 특성을 살려 '아가로헬씨 A(Agaro- Healthy A)'로 명명하여 상표등록 선행 조사를 실시한 결과, 사용 가능한 것으로 판명된 바 있으므로, 분말, 타블렛 그리고 젤리형태로 본 제품을 시판할 예정이다(Fig. 74-75).

5. 향후 추진계획

3차년도(2003. 8. _ 2004. 7.) 기술 개발은 한천올리고당 생산 process의 개발과 개발된 process의 검증 및 보완에 주안점을 두고 있다. 2004년도에는 설계된 process를 제작하여 시제품을 생산하고 직접적인 판매에 돌입할 계획이다.

(2004년)

- 본 연구결과에 의거하여 설계된 한천올리고당 생산을 위한 200L pilot plant 설치.
- 생산규모 : 15톤 / 년
- 한천올리고당에 대한 대대적인 홍보
- 일본 기업체와의 협력 추진 2004년 7월 19일
  : 일본, Ideamar Co. Ltd의 Ishihara 대표이사와 수출 관련 논의 마침.
- 한천올리고당의 본격적인 판매 개시.
  : 2004년 12월에는 개인투자가 및 벤처운영자금을 지원 받아 80톤 / 년 생산 규모의 자동화 설비 (1 ton pilot plant)를 확충할 계획임.
- 공장 및 설비 확보계획

(2005년)

- 생산규모 : 80톤 / 년
- 공장 및 설비 확보계획
  : 2005년 7월에 200톤 / 년 생산 규모의 pilot plant를 추가 설비할 계획임.

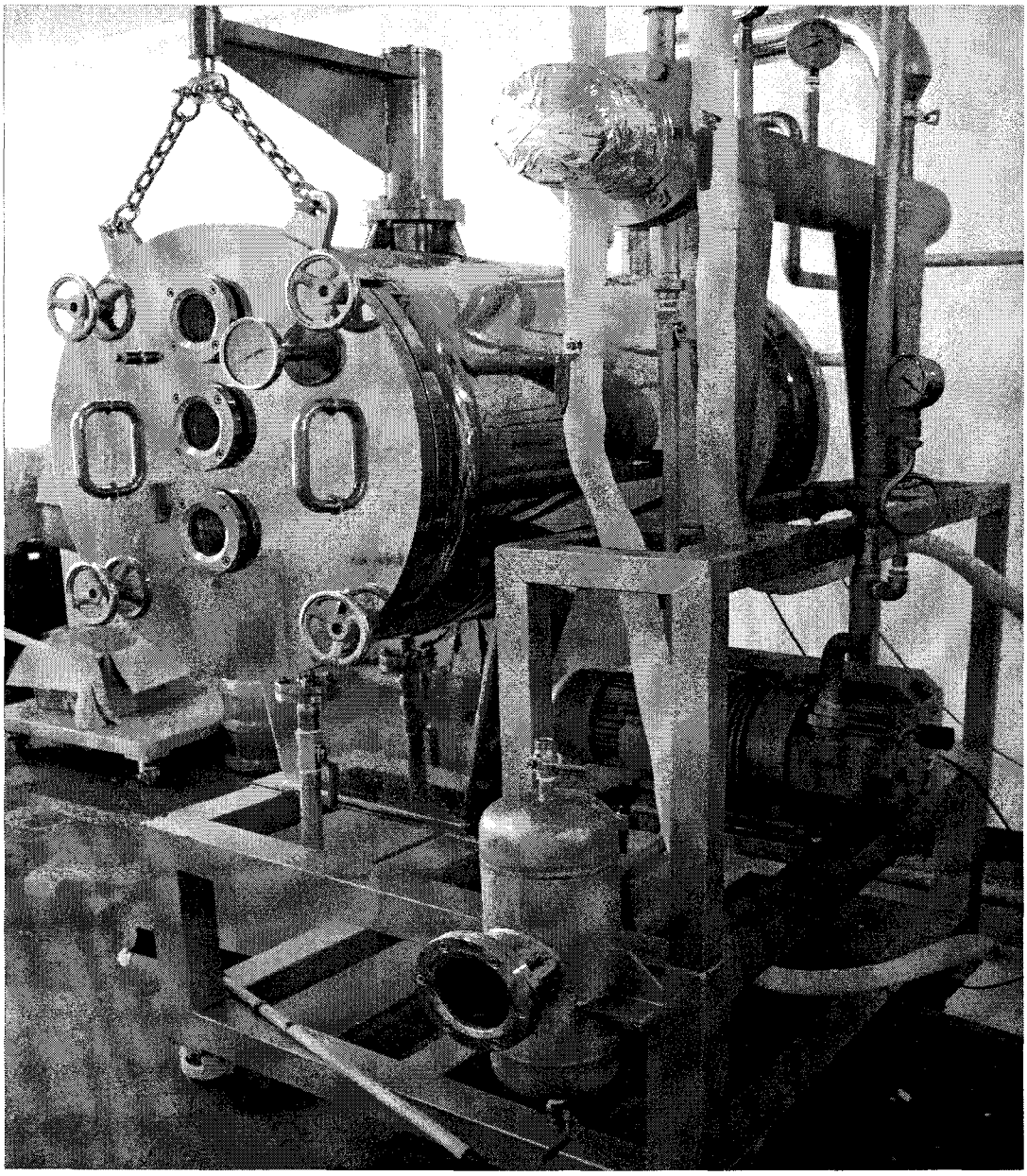


Fig. 72. Dryer

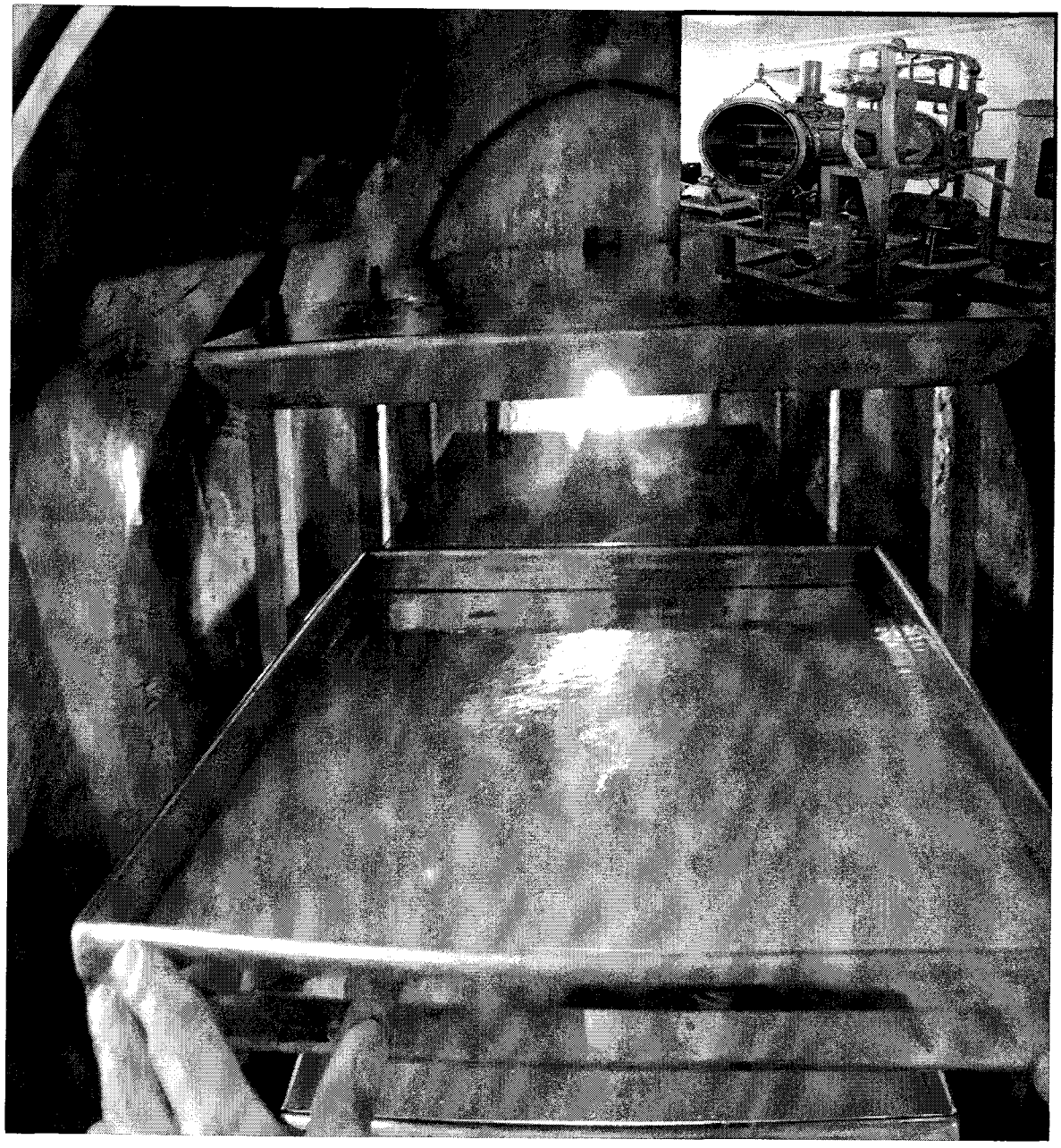


Fig. 73. Tray(Dryer 내부)

Fig. 74. 시제품: 아가로헬씨 A(젤리)

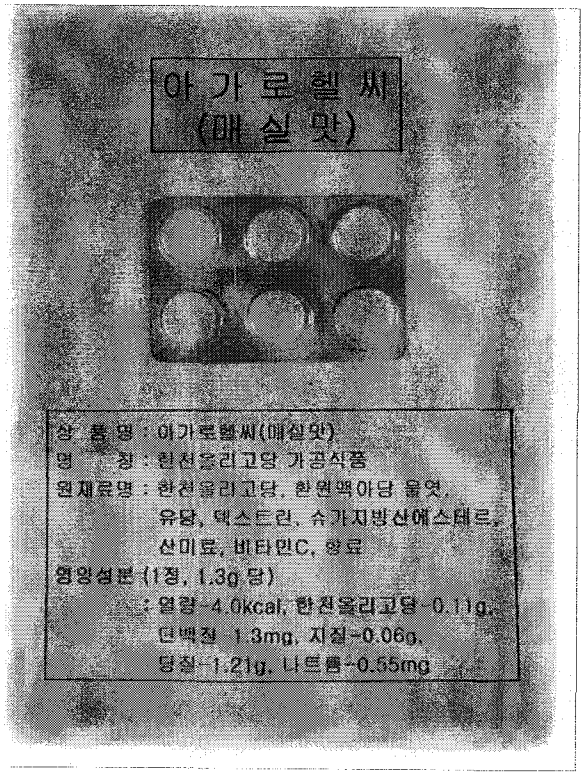


Fig. 75. 시제품: 아가로헬씨 A (분말, 타블렛)

제 4 절 참고문헌

1. **Belas, R., D. Bartlett and M. Silverman,** 1988, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(5), 1549.

2. Difco Laboratories. 1984, Difco Manual.

3. **Nelson, J. M. and Griffin, E. G,** 1976, *J. Am. Chem. Soc.*, 38(12), 1109.

4. **Rower, P. N. and Henwood, G. N, Trans,** 1961, Inst. Chem. Eng., 39, 43.

5. **T. Mori, T. Tosa, I. Chibata,** 1974, *Cancer Res.*, 34, 3066.

6. **M. Banerjee, A. Chakravarty, S. K. Majumder,** 1984. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 271.

7. **Bart, D. V. Ferderik, and L. D. Vuyst,** 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics, and process enginerring of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11, 747-757.

8. **Kawase, Y. and M. Y. Moon,** 1988, Volumetric mass transfer coefficients in aerated stirred tank reactors with Newtonian and Non-newtonian media. *Chem. Eng. Res. Des.*, 66, 284-288.

9. 해양수산부. 2000, 1999년도 수산물 수출입 통계연보, p. 31.

10. **주동식, 조순영, 이용호,** 1998, 한국생물공학회지., 13(4), 378.

11. **S. Nelson, J. Biol. Chem.,** 1944, 153, 375.

12. **Michael L. Shuler, Fikret Kargi** 著, 구윤모, 선진호, 장용근, 박태현, 공역, 1994, "생물공정공학", 교보문고.

13. **Jong Won Yun, and Seung Koo Song,** 1996, Biotechnol, Bioprocess. Eng., 1, 18.

해양수산부 해양수산중소·벤처기업기술개발지원사업
사업결과 보완사항

1. 사업화에 대한 대안 계획구상

향후 추진계획

3차년도(2003. 8. - 2004. 7.) 기술 개발은 한천올리고당 생산 process의 개발과 개발된 process의 검증 및 보완에 주안점을 두고 있다. 2004년도에는 설계된 process를 제작하여 시제품을 생산하고 직접적인 판매에 돌입할 계획이다.

(2004년)

- 본 연구결과에 의거하여 설계된 한천올리고당 생산을 위한 200L pilot plant 설치.
- 생산규모 : 15톤 / 년
- 한천올리고당에 대한 대대적인 홍보
- 일본 기업체와의 협력 추진 2004년 7월 19일
  : 일본, Ideamar Co. Ltd의 Ishihara 대표이사와 수출 관련 논의 마침.
- 한천올리고당의 본격적인 판매 개시.
  : 2004년 12월에는 개인투자가 및 벤처운영자금을 지원 받아 80톤 / 년 생산 규모의 자동화 설비 (1 ton pilot plant)를 확충할 계획임.
- 공장 및 설비 확보계획

(2005년)

- 생산규모 : 80톤 / 년
- 공장 및 설비 확보계획
  : 2005년 7월에 200톤 / 년 생산 규모의 pilot plant를 추가 설비할 계획임.

2. 해당당류의 분자량 및 구조분석 규명 자료

1. 한천분해효소를 이용한 한천올리고당의 분리 및 생산

가. TLC를 이용한 한천올리고당의 분석

Agar, agarose, neoagarohexaose, neoagarotetraose로부터 *Bacillus cereus* ASK 202가 생산하는 한천분해효소에 의한 한천올리고당의 생성유무를 확인하였다 (Fig. 1). 부분정제된 조효소 용액 20 unit/ml를 0.1%(w/v)의 각 기질용액에 첨가하여 40℃에서 10분간 반응시킨 후, TLC를 행한 결과, 올리고당의 생성을 확인하였다. 그리고 생성되는 올리고당과 표준한천올리고당의 R_f

값을 비교한 결과, 중합도 2, 중합도 4 그리고, 중합도 6 이 주로 생성됨을 확인하였다(Table 1). 중합도 2,4,6당의 분자량은 더욱이, agar, agrose, neoagarotetraose 그리고 neoagarobiose을 이용하여 충분한 양의 효소와 24시간 반응시킨 결과 최종적인 효소반응산물로서는 중합도 2인 올리고당이 생성됨을 확인하였다 (Fig. 2). 한편, α-1,3 결합 구조를 가지고 있는 표준물질인 neoagarobiose는 분해되지 않으므로 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 agarase는 β-1,4 결합만 선택적으로 분해하는 것으로 확인되었다.

나. HPLC를 이용한 한천올리고당의 정량분석

상기 TLC 분석에 사용된 동일한 효소분해 생성물에 대하여 HPLC를 이용한 분석을 행하였다 (Aminex HPX-42A column; flow rate 0.8 ml/min; 이동상은 초순수 증류수). 그 결과, 반응생성물로서는 중합도 4의 올리고당이 생성되었으며, 그 밖에도 중합도 6과 2의 올리고당이 생성되었다 (Fig. 3). 따라서, 중합도 2,4,6당의 분자량은 대략 324, 630, 936 이다. 그리고 이들 올리고당의 생성율은 각각 74%, 18%, 8% 이었다. 또한, 그림에서 나타낸 바와 같이 중합도 2, 4, 6의 올리고당을 제외한 다른 성분은 거의 검출이 되지 않음에 따라 부분 정제된 조효소 용액을 이용한 올리고당의 생산이 가능함을 확인하였다. 한편, 생성올리고당에 대한 TLC 및 HPLC 분석 결과로부터 기존에 보고된 agarase와 그 특성을 비교검토한 결과, *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 효소는 β-agarase 임을 확인하였다.

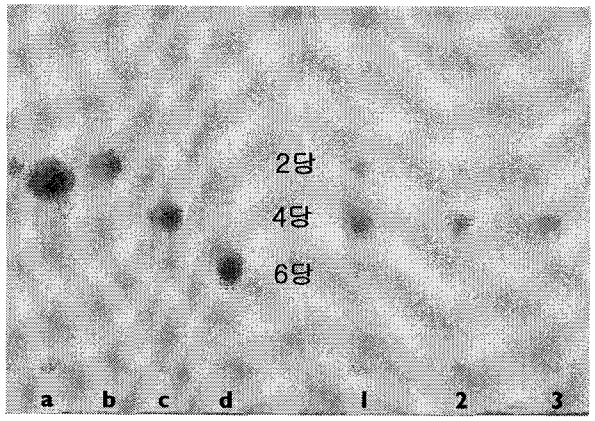


Fig. 1. TLC analysis of enzymatic hydrolysis products from agarose (1), neoagarohexaose (2) and neoagarotetraose (3). Sample taken at 10 min were analyzed by TLC. Lane a, galactose; b, neoagarobiose; c, neoagrotetraose; d, neoagarohexaose represents the standard sugars

Table 1. Comparison of agarooligosaccharides obtained by agarase[a] hydrolysis from agar, neoagarooligosaccharides.

Substrate	Oligosaccharide	Degrees of polymerization	R_f[b]
Standard	Neoagarohexaose	6	0.27
	Neoagarotetraose	4	0.40
	Neoagarobiose	2	0.53
	Galactose		0.46
A	Product 1		0.54
	Product 2		0.39
	Product 3		0.27
B	Product 1		0.54
	Product 2		0.40
C	Product 1		0.54
	Product 2		0.40

[a] Thin-layer chromatography was perform on glass plates containing silica gel 60

[b] Solvent is n-butanol-acetic acid-water (2:1:1, v/v/v)

A : agar, B : neoagarohexaose, C : neoagarotetraose

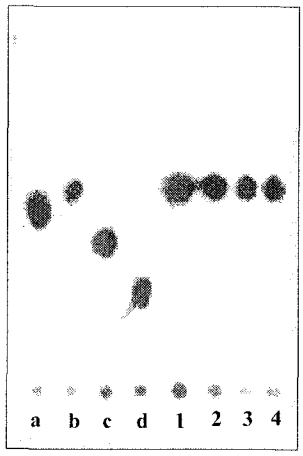


Fig. 2. TLC analysis of enzymatic hydrolysis products from agarose(1), neoagarohexaose(2), neoagarotetraose(3), neoagarobiose (4). Sample taken at 24h were analyzed by TLC. Lane a, galactose; b, neoagarobiose c, neoagarotetraose; d, neoagarohexaose represents standard sugars.

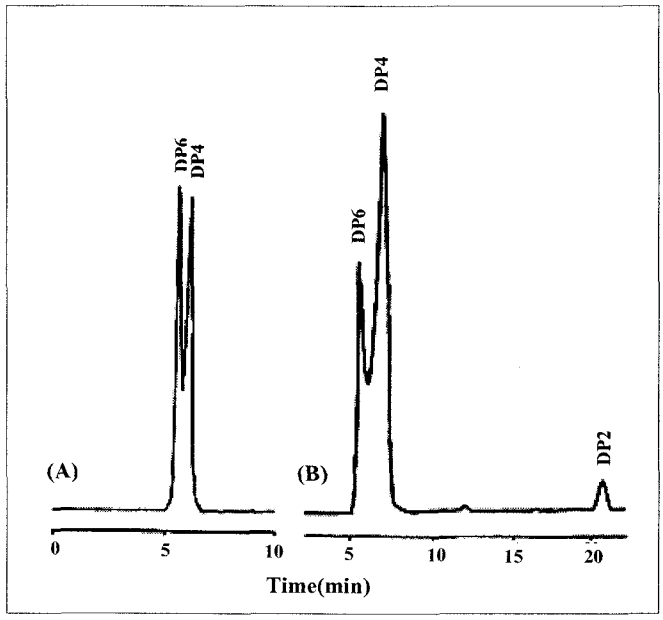


Fig. 3. HPLC pattern of the agarooligosaccharides produced by the enzymatic hydrolysis of agar. DPs refer to degrees of polymerization of the products. (A), Standard of agarooligosaccharides; (B), Agar hydrolyzates.

다. 한천올리고당의 구조분석

1. FT-IR spectrum

β-agarase와 기질로서 한천을 사용하여 얻은 한천올리고당과 표준물질인 neoagarobiose, neoagarotetraose, neoagarohexaose의 관능기를 비교하여 생성된 올리고당을 확인하기 위하여 FT-IR를 행하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 생성된 한천올리고당의 검출파장은 3423.1 cm^{-1}, 2850 cm^{-1}, 1649.9 cm^{-1}, 1144.1 cm^{-1}으로 확인되었으며, 이것은 표준물질 파장에서 검출된 관능기와 비교분석한 결과 이미 한천올리고당의 구조에서 밝혀진 바와 같이 OH, C-H, aromatic ring, C-O의 관능기를 가지고 있음을 확인하였다.

2. NMR 분석

산분해로 생성된 한천올리고당과 효소 분해 한천올리고당의 구조를 1H-NMR 분석 비교해 본 결과, 두 경우 모두 생성된 한천올리고당이 β-D-galactose와 3,6-anhydro- L-galactose가 동일하게 연결되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 5).

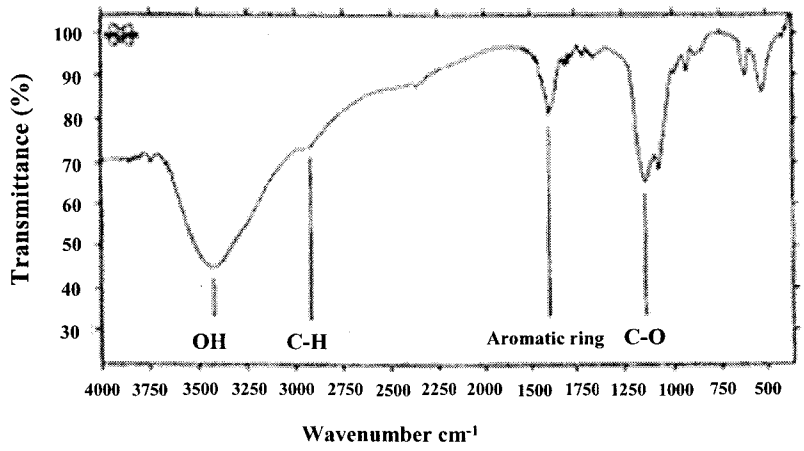


Fig. 4. FT-IR spectrum of neoagarooligosaccharides produced by β-agarase.

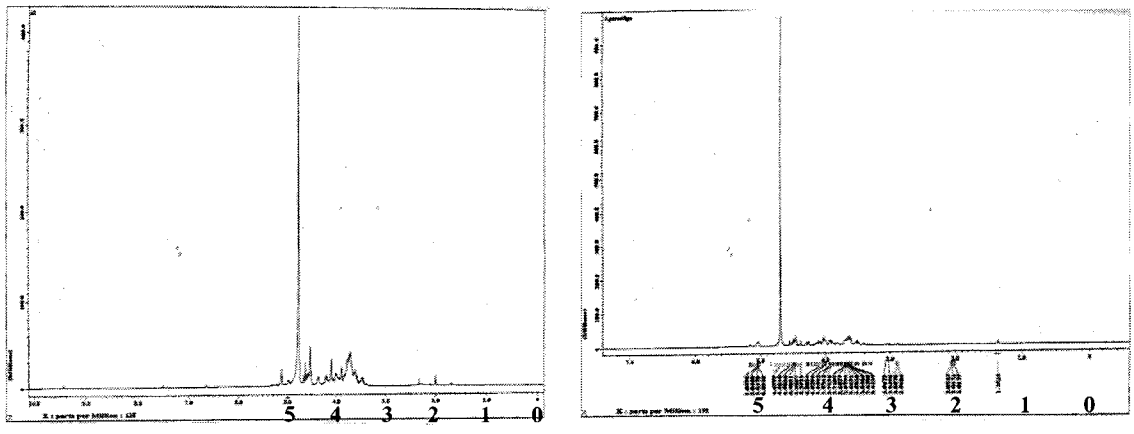


Fig. 5. ^{1}H-NMR spectrum of agarooligosaccharides produced by acetic acid hydrolysis(A) and enzymatic hydrolysis(B).

3. 원 균주에서 생산하는 효소에 대한 분석 자료

제 1 절 재료 및 방법

1. 재료 및 장치

기질로서 사용된 한천(agar-agar)은 (주) MSC (구 명신화성, 경남 양산시)에서 제공받았고, 효소활성측정 기질로서 사용된 agarose, 생성되는 한천올리고당의 분석을 위하여 사용된 neoagarobiose, neoagarotetraose, neoagarohexaose, sodium-alginate는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)의 특급시약을 사용하였다. 분리된 해양세균 동정에는 *Bacillus* sp. 동정 API kit을 사용하였고, 투석막은 (Spectra/por, MWCO: 12,000~14,000, Texas, USA)를 사용하였으며, 그 외 사용된 모든 시약은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다.

한천분해효소의 분리·정제를 위해 겔 투과 크로마토그래피의 수지로 사용된 Sepharose CL-6B, Sephadex G-100 그리고 Superose 6HR 10/30 겔은 Pharmacia Co.(Uppssala, Sweden)로부터 구입하였으며, 분자량 표준품은 Promega Co. (Madison, USA)의 Mid-range protein molecular weight markers (MW 97,400~14,400 Da)를 사용하였다. 한천올리고당의 생산을 위한 한외여과막 장치는 Millipore Co.의 제품(Massachusetts, USA)을 사용하였고, 이 때의 분리막은 분자량 한계범위 (molecular weight cut-off: MWCO) 가 각각 10,000 그리고 30,000Da의 것을 사용하였다.

HPLC장치로서는 Bio-Rad Co. (Richmond, USA)의 Aminex HPX-42A carbohydrate column(300×7.8 mm)이 장착된 Pharmacia Co.(Uppssala, Sweden)의 LBK-LCC 2252 모델을, 당굴절률 검출기(RI detector)로는 Hewlett Packed 사의 HP1047A 모델, 그리고 integra-tor는 Pharmacia Co.의 LKB 2221 integrator를 각각 사용하였다. UV-spectrophotometer는 Ultrospec 3000 (Uppssala, Sweden) 모델을 사용하였고, FT-IR은 Bruker IFS 66 모델, 아미노산 분석기는 Applied Biosystems Co. (USA) 모델을 각각 사용하였다.

2. 미생물배양 및 배지조성

균주배양을 위한 기본배지로서는 1L의 인공해수 (증류수 1 ℓ에 NaCl 23.0 g, KCl 0.7 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 10.6 g, $CaCl_2$ 1.1 g, Na_2SO_4 3.9 g, $NaHCO_3$ 0.2 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, K_2HPO_4 0.01 g, Tris-base 6.05 g를 첨가, pH 7.8) 에 bacto peptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric citrate 0.1 g, ammonium nitrate 0.0016 g, disodium phosphate 0.008 g이 첨가된 기본배지를 사용하였다.

균주분리 배지로는 기본배지에 한천 1.5 %(w/v)을 첨가한 평판고체배지를 사용하였으며, 효소생산을 위한 액체배지는 기본배지에 0.3 %(w/v) 한천이 첨가된 반 고체상태의 것을 본 실험에 사용하였다. 그리고 균주분리에 사용된 해조류는 잘게 파쇄하여 멸균된 인공해수에 6시간 동안 교반시킨 후, 교반시킨 배양액을 멸균된 인공해수에 10배 희석하여 한천고체 평판배지에

도말한 후 30℃ 배양기에서 72시간 동안 정치배양 하였다. 한천고체평판배지에서 얻어진 각종 분리균주를 10 ml test tube의 액체배지에 1차 접종하고, 25℃, 48시간 진탕배양 한 다음, 액체배지 50 ml를 함유한 250 ml 삼각 flask에 전배양액 1 %(v/v)를 2차 접종한 후 25℃, shaking incubator에서 180 rpm 으로 36시간 진탕배양 하였다.

3. 단백질의 정량

배양액중의 단백질양은 UV spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Co., Sweden)를 이용한 280 nm에서의 흡광도 측정과 Bradford method에 의해 구하였으며, 표준물질로는 Bovine serum albumin (Boehringer Mannheim Co., Germany)를 사용하였다.

4. 효소활성 측정

한천분해효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogyi-Nelson법으로 행하였다. 0.1 %(w/v)의 agarose가 포함된 기질용액(10 mM Na-phosphate buffer, pH 7.5)을 중탕가열 하고, 40℃까지 서서히 냉각시킨 후에 조효소용액을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 그 다음, 반응액에 Somogyi시약을 첨가하여 10분간 끓인 후, 실온으로 냉각시켜, arsenomolybdate 시약을 첨가하고, 12,000 rpm에서 2분간 원심분리한 상층액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 이때, 한천분해효소의 활성은 1 분당 1nmol의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit로 정의하였으며, 표준적정곡선으로 galactose를 사용하였다.

제 2 절 결과 및 고찰

1. 한천 분해효소 생산능을 지닌 해양세균의 분리 및 동정

가. 균주의 분리

우리나라 연안해역의 여러장소에서 해수 15종, 갯벌 10종, 해조류 32종을 채집하여 한천 분해균 분리시료로 사용하였다. 채집된 각종 시료를 Table 7에서 서술한 바와 같이 기본배지인 MMM (Modified marine medium)를 이용하여 25℃, 96시간동안 정치배양 시키면서 한천분해능을 지닌 균주를 분리한 결과, 약 350여 균주를 1차 분리하였으며 이들 중 한천 평판배지를 함몰시키는 한천분해능이 뛰어난 48균주를 2차 선별하였다. 2차 선별된 48균주를 0.3%(w/v) 한천을 포함한 기본배지에서 각각 25℃, 180rpm, 48시간 진탕배양한 후, 배양액중의 환원당 값을 Somogyi-Nelson 방법에 의해 조사함으로써, 한천분해능을 측정 하였으며, 측정 결과로부터 한천분해능이 가장 뛰어난 균주를 선별하여 이 균주를 marine bacterium ASK202 (Agarase Sinji Korea)로 명명하였다. 그리고 marine bacterium ASK 202균주의 뛰어난 한천분해능은 1.5%(w/v) 한천평판배지 상에서 25℃, 48시간 정치배양 후 나타나는 한천 고체배지의 분해정도에 의해서도 확인되었다 (Fig. 1).

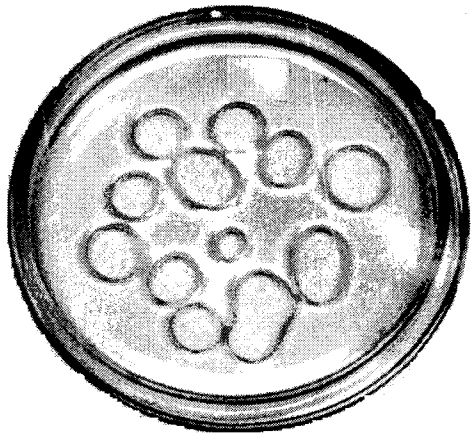


Fig. 1. Degradation of agar medium plate by marine bacterium ASK202 The inoculated agar medium was incubated at 25℃ for 48 h..

2. 한천분해효소의 분리 · 정제 및 특성조사

가. 효소의 분리 및 정제

균배양액으로부터 생산된 agarase를 정제하기 위해서 배양액을 8,000rpm에서 20분간 원심분리하여, 배양상층액을 동결건조하였다. 동결건조된 단백질은 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.8를 이용하여 24시간 투석을 행하였다. 투석을 행한 조효소액에 대해서 이온 크로마토그래피를 행하였다. DEAE Sepharose CL-6B matrix를 column에 충진하여 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8로 충분히 세척한 후 농축 조효소액을 칼럼을 통해서 흡착시켰다. 또한 동일한 완충용액을 이용하여 흡착되지 않은 단백질을 제거한 후 0.0~1.0 M NaCl 용액을 이용하여 효소를 분리하였다. 그 결과 0.15 M 농도이하의 NaCl 용액에 의해 활성을 지닌 agarase분획이 용출되었으며, 용출된 효소액을 모아 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8 완충액에서 투석을 행하였다. 투석한 효소를 동결건조한 후, 동결건조된 효소를 50 mM NaCl이 포함된 동일 완충용액에 녹인 후 HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Pharmacia, Sweden)를 사용하여 Superose 6HR 10/30 column에 통과시켜 한천분해 효소를 최종적으로 정제하였다. 그 결과 정제된 효소는 HPLC상에서 단일 peak를 지니고 있음이 확인 되었다. *Bacillus cereus* ASK 202가 생산하는 한천분해효소의 정제단계는 Table 1에 나타내었다. 수율은 27.8 % 였으며, 정제도는 31.5배 정도 증가하여, 최종적으로 3,780 unit/mg의 specific activity를 지닌 정제된 agarase을 얻을 수 있었다.

나. 효소의 분자량 결정

또한, 정제된 효소단백질에 대하여 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 행한 결과에 의해서도 약 90,000 daltons 위치에서 단일 band의 단백질임을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

다. 정제된 효소의 K_m 및 V_{max}

정제된 agarase에 대한 agarose의 기질 친화력을 측정한 결과를 Lineweaver-Burk plot로 나타내었다 (Fig. 3). 이 plot로부터 산출된 Michaelis constant (K_m) 값은 0.41 mg/ml 였으며, V_{max}값은 3.48 mg/ml · min인 것으로 확인 되었다.

Table 1. Summary of the purification steps of agarase from the culture supernatant of *Bacillus cereus* ASK202.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (㎎)	Specific activity (U/㎎)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	125,000	1029.0	120	100.0	1.0
Dialyzed sample	68,000	89.7	760	54.7	6.3
DEAE Sepharose CL-6B	36,000	11.3	3,250	29.5	27.1
Superose 6 HR 10/30 (HPLC)	34,000	9.2	3,780	27.8	31.5

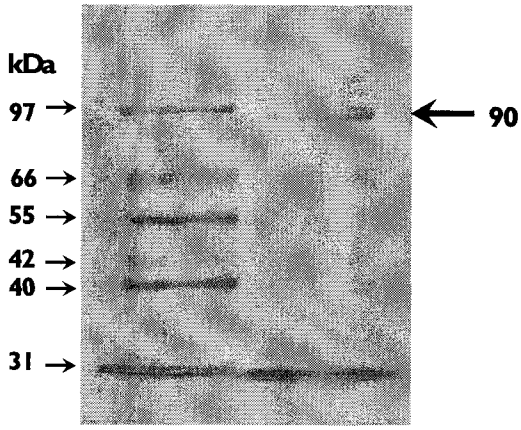


Fig. 2. SDS-Polyacrylamied gel electrophoresis of purified agarase from *Bacillus cereus* ASK202. The purified enzyme was subjected to electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel in R-250. Lane 1, Markers(Phosphorylase B, 97kDa; Bovine serum albumin, 66kDa; Glutamate dehydro -genase, 55kDa; Ovalbumin, 42kDa; Aldolase, 40kDa; Carbonic anhydrase, 31kDa) were used as standards for molecular mass determination. Lane 2, Purified agarase, 90kDa.

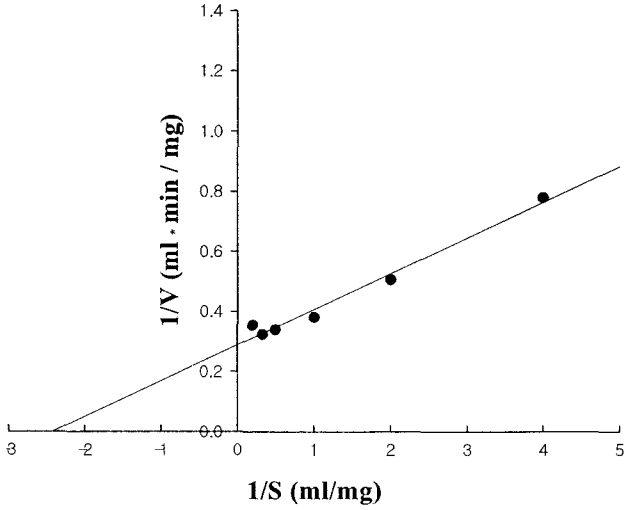


Fig. 3. Lineweaver-Bulk plot for determining K_m of agarase

3. 한천분해효소의 효소학적 특성조사

가. 최적온도와 안정성

Bacillus cereus ASK202가 생산하는 agarase의 효소 활성의 최적온도를 알아보기 위해 20~50℃ 까지 각 온도별로 효소활성을 측정한 결과 Fig. 4에서와 같이 40℃에서 최대활성을 나타내었다.

효소의 온도안정성을 검토하기 위해 각 온도에서 24시간 방치한 후 잔존효소활성을 Somogyi-Nelson 방법을 이용하여 측정하였다. 10mM sodium phosphate buffer, pH 7.8 에다 0.1%(w/v) agarose 용액 1.3ml, agarase 0.005unit/200㎕를 첨가하여 4℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃에서 조사하였다 (Fig. 5). 그 결과 50℃에서 24시간 방치한 후 잔존효소 활성을 측정한 결과 약 83%의 효소활성을 유지하는 것으로 보아 이 효소는 열에 대한 안정성이 다소 뛰어난 것으로 보여진다.

나. 최적반응 pH 와 안정성

Bacillus cereus ASK202가 생산하는 agarase의 효소반응에 있어 최적 pH를 조사하였다. pH 3~7은 10 mM citric acid-sodium citrate buffer, pH 5.8~8.0 는 10 mM sodium phosph -ate buffer, pH 8.0~10.6은 10 mM glycine-NaOH buffer을 사용하여 0.1%(w/v) agarose 기질용액 1.3㎖에 한천분해효소 0.005 unit/200㎕를 첨가하여 40℃에서 효소활성을 측정한 결과 Fig. 6에서와 같이 pH 7.8에서 최대 활성을 나타내었다.

또한, 각 pH별로 제조한 완충용액에 효소용액을 첨가하여 40℃에서 24시간 방치한 후 효소의 pH 안정성을 조사한 결과, 효소의 잔존활성을 측정함으로써 확인하였다. 그 결과 Fig. 7에서와 같이 pH 5.0~10.0 까지의 범위에서의 효소활성의 안정성이 확인되었다.

다. 기질 특이성

효소의 기질 특이성을 알아보기 위해 다양한 polysaccharides을 기질로 하여 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8에서 효소 반응을 행한 결과 Table 2에 나타난 것과 같이 효소를 정제하기 전배양상층액을 이용한 경우에는 agar, agarose에 대하여 뛰어난 분해능을 그리고 alginate, cellulose, λ-, κ-, ι- carrageenan에 대해서는 약 20~40% 정도의 분해능을 나타내었다. 그러나, 정제된 한천분해효소의 경우 alginate, cellulose, carrageenan 에 대해서는 전혀 분해능을 나타내지 않았으며, 오로지 agar, agarose에 대해서만 기질 특이성을 보였다. 이 결과로부터 *Bacillus cereus* ASK202에서 생산되는 agarase는 agar, agarose에 대해 특이적으로 반응하는 효소로 추정된다. 그리고, 배양 상층액을 이용하여 확인한 기타 기질에 대한 분해능은 배양과정 중에 균주로부터 한천의 곁사슬인 α-1,6 결합을 분해하는 debranching enzyme도 일부 생산하기 때문인 것으로 사료된다.

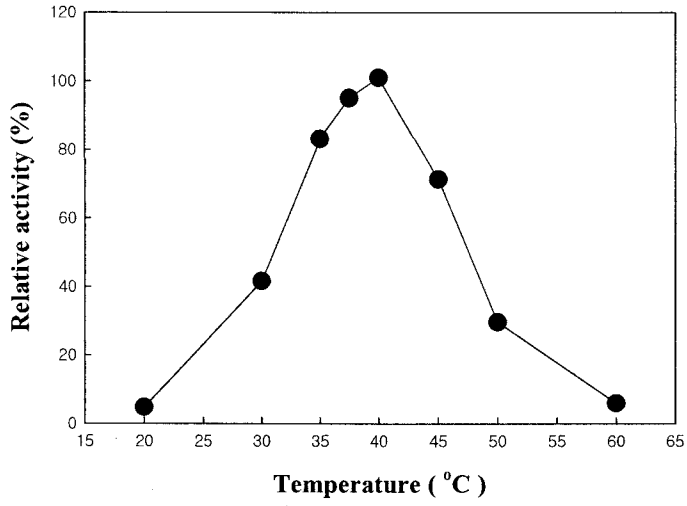


Fig. 4. Effect of temperature on the agarase activity enzyme activity was measured at various temperatures in 10 mM MOPS buffer, pH 7.0 for 40 min, respectively.

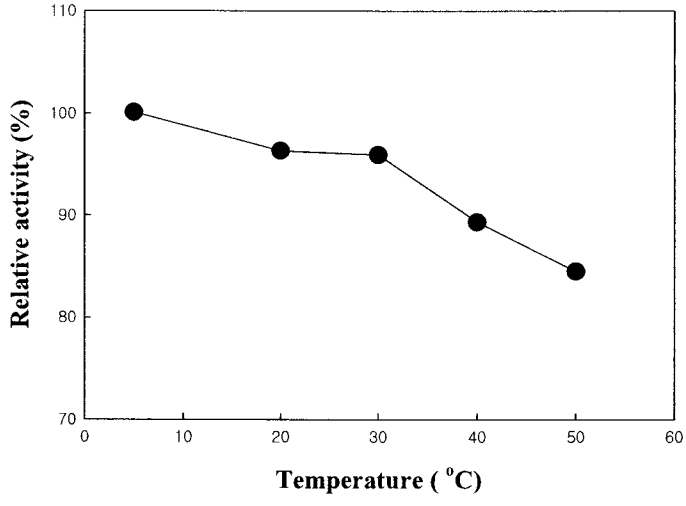


Fig. 5. Stability of the agarase activity at various temperature. Enzyme activity was measured at various temperatures in 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.8 for 40 min, respectively.

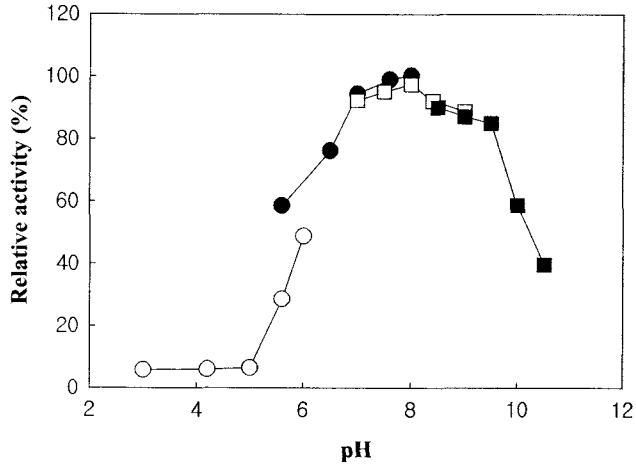


Fig. 6. Effect of pH on the agarase activity with various buffer solution The buffers used: ○, 10 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 3.0 to 7.0); ●, 10 mM sodium phosphate buffer(pH 5.8 to 8.0); □, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0 to 9.0), and ■, 10 mM glycine-NaOH buffer(pH 8.0 to 10.6). The agarase reaction was carried out various pHs for 30 min at 40℃.

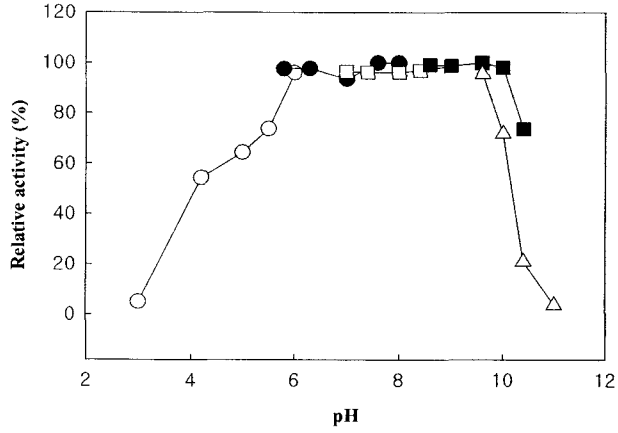


Fig. 7. Effect of pH on the agarase stability. The buffers used: ○, 10 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 3.0 to7.0); ●, 10 mM sodium phosphate buffer(pH 5.8 to 8.0); □, 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0 to 9.0), and ■, 10 mM glycine-NaOH buffer(pH 8.0 to 10.6). The agarase reaction was carried out at 4 ℃ for 24 h in various pHs and the remaining activity was measured at pH 7.8.

Table 2. Substrate specificity of the supernatant and the purified agarase from *Bacillus cereus* ASK202.

Substrate	Supernatant (%)	Purified agarase (%)
Agar	100.0	100.0
Agarose	76.7	97.6
Alginate	27.2	-
Cellulose	24.4	-
ι- Carrageenan	25.6	-
λ- Carrageenan	41.9	-
κ- Carrageenan	27.9	-

라. Detergent의 영향

효소활성에 대한 영향을 조사하기 위해서 각종 detergent를 1 %(v/v)가 되도록 효소액에 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 효소의 잔존활성을 측정 하였다 (Table 3). 그 결과 SDS첨가시는 효소활성이 안정함을 알 수 있었고, Tween 20에서는 효소활성이 약 70 %정도 증가하는 경향을 보였다. 이는 detergent에 의해서 기질의 용해도가 증가해서 나타난 결과로 사료된다. 그러나, Tween 40, Tween 80에서는 상대적으로 효소활성이 감소하는 경향을 보였다.

마. 저해제의 영향

효소의 활성에 미치는 저해제의 영향을 조사하기 위하여 최종 농도가 0.5mM, 1.0 mM, 5 mM, 10 mM이 되게 저해제를 효소용액 에 첨가하여 40℃에서 40분간 반응시킨 후 그 잔존활성을 측정한 결과는 Table 4과 같다.

효소 제해제로는 cysteine protease에 작용하는 3-Iodoacetic acid, NEM (N-ethylmaleimide)와 serine protease에 작용하는 TLCK (N-α-p-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone), TPCK (N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone), Antipain, PMSF(phenylmethyl sulfonyl fluoride)를 사용하였다. Metalloprotease 저해제로는 1,10-phenanthroline과 asparticprotease 저해제로는 pepstain A를 사용하였으며, cysteine, serineprotease 의 공동 저해제로는 leupeptin를 이용하였다. 저해제에 대한 효소활성도 조사 결과 본 실험에 사용한 한천분해효소는 Metallo protease를 저해하는 1,10-phenanthroline에 의해서 약간 저해작용을 받았으며, serine에 작용해서 저해하는 TPCK에 강한 저해를 보였다. 따라서 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 한천분해효소는 serine계열의 효소인 것으로 추측된다.

바. 금속이온의 영향

효소에 대한 금속이온의 영향을 알아보기 위하여 각종 금속이온을 1 mM 농도로 0.1% agarose를 포함한 10mM sodium phosphate, pH 7.8 용액 1.3㎖에 0.005unit/200㎕ 효소를 첨가하여 40℃에서 1시간을 방치한 후 metal ion들이 한천분해효소 활성에 미치는 영향 을 잔존 효소활성을 조사하여 측정한 결과는 Table 5과 같았다. 효소활성은 $K_2Cr_2O_7$과 $SnCl_2$ 에서는 강한 저해를 받았으나, $MnCl_2$, $FeCl_3$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, LiCl에서는 약간의 저해를 받았다. 그리고, $Zn(NO_3)_2$ 에서는 약 63 %정도의 효소활성의 상승효과가 있었다. Manachini 등은 Ca^{2+}가 효소의 안정화 및 효소활성의 증가에 영향을 준다고 보고 하였으며, Rhaman 등은 Ca^{2+}과 Zn^{2+}가 효소활성을 상승시킨다고 보고하였고, Ahn 등은 단백질 분해 효소 저해제인 puromycin 첨가시 Mg^{2+}의 농도를 첨가하는 경우에는 효소활성이 강한 저해를 받았다고 보고하였다. 그리고, Cowan과 Daniel은 Ca^{2+}가 고온성 단백질 분해효소의 효소활성 증가에 크게 영향을 미친다고 보고하였고, Murphy 등은 젤라틴 분해성 metalloprotease가 저해제 존재시 Ca^{2+}와 Zn^{2+}를 첨가할 경우 저해제의 효과를 줄일 수 있다고 보고하였다. 따라서, 금속이온은 효소반응에 있어서 상승작용 또는 저해작용를 유발하는 인자가 될 수 있다.

Table 3. Effect of detergents on the agarase activity.

Detergents (1%, v/v)	Residual activity (%)
None	100
Tween 20	172
SDS	100
Tween 40	62
Tween 80	15
Triton X-100	0

SDS : Sodium dodecyl sulfate

Tween 20 : Polyoxyethylene sorbitan monolaurate

Tween 40 : Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate

Tween 80 : Polyoxyethylene sorbitan momooleate

Triton X-100 : Oxtylphenoxy polyethoxy ethanol

Table 4. Effects of inhibitors on the agarase activity.

Inhibitors	Amino acid	Residual activity(%)	
		5mM	10mM
None		100	100
3-Iodoacetic acid	Cysteine	100	100
NEM	Cysteine	100	100
1,10-phenanthroline	metallo protease	93	77
PMSF	Serine	100	100
TPCK	Serine	76	57
TLCK	Serine	100	100
		0.5mM	1.0mM
Antipain hydrochloride	Serine	100	100
Pepstatin A	Aspartic acid	100	100
Leupeptin	Cysteine, Serine	100	100

NEM: N-ethylmaleimide,

PMSF: Phenylmethyl-sulfonyl fluoride,

TPCK: N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone,

TLCK: N-α-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone

사. 아미노산 조성 분석

효소 단백질을 110℃에서 24시간 동안 6 N HCl 용액에서 산 가수분해를 한 후 Pico-Tag Free Amino Acid analysis column을 사용하여 아미노산 분석을 행하였다. 효소 단백질을 구성하는 아미노산 수는 효소의 분자량을 기준으로하여 각 아미노산 peak 면적비로부터 계산하였다 (Table 6). 한천분해효소의 전체 아미노산 조성 중 Asp, Glu와 같은 산성아미노산 함량이 Arg, His와 같은 염기성 아미노산의 함량에 비해 높았으며 Asp, Glu, Gly 함량이 전체 함량에 50 %이상을 차지하였다. 또한 protein conformation에 영향을 주는 cysteine 함량이 0.63%, proline 함량은 3.94%였다. 이는 기존에 보고된*Pseudomonas* sp. Strain PT-5의 경우 aspartic acid (asparagine 포함)가 15.8%, alanine 12% 그리고, serine 7.8%였으며, *Pseudomonas*-like bacterium에서는 aspartic acid (asparagine 포함)는 11.1% 그리고, serine 13.5%인 것으로 보고된 것과 비교하여 볼 때, 아미노산 조성이 전혀 다른 agarase인 것으로 추정된다.

아. N-말단 아미노산 서열 확인

정제된 단백질을 SDS-PAGE를 행하고 PVDF membrane으로 electrotransfer한 후 Coomas-sie Brilliant Blue로 염색하였다. 염색된 band로부터 단백질을 추출하여 automatic Edman degradation방법으로 N-말단 부위의 아미노산 서열을 분석 하였다 (Table 7). 분석된 아미노산의 서열은 Ala-Glu-Gly-Iso-Thr-Lys-Asp-Phe-Asn-Ala인 것으로 확인되었다. 이 결과는 기존의 보고된 *Peudomonas* sp. W7, *Peudomonas* atlantica, *Streptomyces coelicolor* A3(2) 그리고, *Vibrio* sp. Strain JT0107에서 분리한 agarase와는 N-terminal amino acid 배열순서는 일치하지 않는 것으로 확인되었다. 그리고, SWISS-PROT, BLASTP의 data bank에 자료들과 비교시에도 유사성을 보이는 것은 없었다. 따라서 본 효소는 novel한 효소로 추정된다.

Table 5. Effect of various metal ions on the agarase activity

Reagents	Relative activity (%)
None	100
$Zn(NO_3)_2$	163
NaCl	103
LiCl	95
$MgCl_2$	87
$CaCl_2$	76
$MnCl_2$	70
$FeCl_3$	63
$CuSO_4$	54
$SnCl_2$	26
$K_2Cr_2O_7$	19

The agarase activity was measured in the presence of final concentration of metal ion of 1mM.

Table 6. Amino acid composition of the purified agarase.

Amino acid	Content (%)
Asp	17.55
Gly	15.39
Glu	13.69
Ala	8.18
Ser	6.68
Val	6.42
Thr	5.98
Leu	5.51
Pro	3.94
Ile	3.74
Trp	2.93
Phe	2.83
Arg	2.00
Lys	1.57
His	1.45
Tyr	1.16
Cys	0.63
Cys2	0.30
Met	0.04

Table 7. Comparison of N-terminal amino acid sequences of the purified agarases.

agarases	N-terminal sequences	references
agarase	Ala-Glu-Gly-Iso-Thr-Lys-Asp-Phe-Asn-Ala	This study
pSW3	Met-Lys-Arg-Ala-Phe-Ile-Met-Val-Leu-Asp	Kong et al.,1997
agrA	Thr-Thr-Glu-Val-Val-Val-Asn-Leu-Asn-Val	Belas, 1989
dagA	Ala-Asp-Leu-Glu-Trp-Glu-Gln-Tyr-Pro-Val	Buttner et al., 1987
AgaA	Ala-Thr-Leu-Tyr-Thr-Ser-Phe-Glu-Glu-Ala	Sugano et al., 1993