

理學碩士學位論文

Arylsulfatase 생산균주의 분리와 그 이용에 관한 연구

指導教授 卞 大 錫

이 論文을 理學碩士學位論文으로 提出함



2002年 2月

釜慶大學校 大學院

食 品 生 命 科 學 科

韓 舜 在

韓舜在의 理學碩士 學位論文을 認准함

2001年 12月 26日

主 審

崔 鎮 浩



委 員

金 亨 洛



委 員

卞 大 錫



목 차

List of Table	iv
List of Figure	v
Abstract	vii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	6
1. 실험 재료	6
1.1. 균주 분리용 시료	6
1.2. 균주 분리 배지	6
1.3. 효소 활성 측정 기질	6
1.4. 한천	6
2. 실험 방법	7
2.1. Arylsulfatase 생산 균주의 분리	7
2.1.1. 균주의 선발	7
2.1.2. 선별균주의 보존	7
2.1.3. 16S rRNA PCR 과 primer design	7
2.1.4. DNA Sequencing	9
2.1.5. 균주의 동정	7
2.1.6. 염기서열분석	9
2.1.7. 선별균주의 최적배양조건	9
2.1.8. 단백질 농도측정	9
2.1.9. Arylsulfatase 활성 측정	10
2.1.10. 균체량 측정	10
2.2. Arylsulfatase생산 최적배지 조성	12
2.2.1. 질소원	12

2.2.2. 탄소원	12
2.2.3. 인산염	12
2.2.4. NaCl농도	13
2.2.5. MgSO ₄ 농도	13
2.3. Arylsulfatase생산 최적배양 조건	13
2.3.1. pH, 배양온도, 배양시간	14
2.4. Arylsulfatase 부분 정제	14
2.4.1. 대량배양	14
2.4.2. Ion-chromatography를 이용한 조효소 분리	14
2.4.3. SDS-PAGE	16
2.5. Arylsulfatase를 이용한 한천중의 황산기분해	16
2.6. Arylsulfatase로 제조된 agarose의 물리화학적 특성	17
2.6.1. 황산기의 함량	17
2.6.2. 황산이온측정	17
2.6.3. Gel strength의 측정	17
2.6.4. Viscosity의 측정	19
2.6.5. Melting point 및 Gelling temperature의 측정	19
2.6.6. Syneresis ratio의 측정	19
2.6.7. Turbidity의 측정	20
2.6.8. EEO (Electrodosmosis) 의 측정	20
2.6.9. DNA 분리능	20
III. 결과 및 고찰	21
1. Arylsulfatase 생산 균주의 분리	21
1.1. 분리 균주의 16S rRNA 서열에 의한 계통학적 분석	21
1.2. 분리 균주의 Arylsulfatase 활성	25
1.3. 분리 균주의 최적성장조건	25

2. Arylsulfatase생산 최적배지조성	25
2.1. 질소원	25
2.2. 탄소원	27
2.3. 인산염	27
2.4. NaCl농도	29
2.5. MgSO ₄ 농도	29
2.6. Arylsulfatase생산 최적배양조건	32
3. Arylsulfatase의 부분정제	36
3.1. 대량배양	36
3.2. Ion-chromatography를 이용한 조효소 분리	36
3.3. SDS-PAGE	40
4. Arylsulfatase로 제조된 agarose의 물리화학적 특성	43
4.1. 황산기와 황산이온	43
4.2. Gel strength	43
4.3. Viscosity	45
4.4. Melting point 및 Gelling temperature	45
4.5. Syneresis ratio, Turbidity, EEO (Electroosmosis)	45
4.6. DNA 분리능	48
IV. 요약	50
V. 참고문헌	52

List of Table

Table 1. List of PCR amplification and sequencing primers.

Table 2. Result of Similarity Analysis.

Table 3. Purification of arylsulfatase from *Sphingomonas*. sp. nov.

Table 4. Physical and chemical properties of agarose prepared with arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. nov.

List of Figure

Fig. 1. Structure of agarose and agaropectin.

Fig. 2. Standard curve for determination of protein concentration.

Fig. 3. Experimental procedure in partial purification and application of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 4. Standard curve for determination of sulfate concentration.

Fig. 5. Full sequence of 16S rDNA of *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 6. Phylogenetic neighbor-joining tree obtained from the 16S rDNA sequence analysis.

Fig. 7. Effect of tryptone concentration on cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 8. Effect of glucose concentration on cell growth and arylsulfatase activity of *Shpingomonas* sp. nov.

Fig. 9. Effect of phosphate concentration on cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 10. Effect of NaCl cocentration in cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 11. Effect of MgSO_4 concentration on cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 12. Effect of initial medium pH on cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 13. Changes in cell mass and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 14. Q-sepharose chromatogram of the crude extract from *Sphingomonas* sp. nov.

Fig. 15. Phenyl-sepharose chromatogram of arylsulfatase from Q-sepharose fractions.

Fig. 16. SDS-PAGE of the proteins during partial purification steps.

Fig. 17. Change in sulfate and sulfur contents of samples from the enzyme reaction mixture during agarose preparation.

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

Screening and Identification of Arylsulfatase Producing Bacterium and a Potential Utilization of Arylsulfatase

Soon Jae HAN

*Faculty of Food Science and Biotechnology, Graduate school,
Pukyong National University*

ABSTRACTS

Agar is a representative agal polysaccharides in red algae. It is also composed of agarose (60 - 70%) and agarpectin (30 - 40%). Agarose is composed of β (1-3)-D-galactose and α (1-4)-3,6-anhydro-D-galactose. Agarpectin has sulfate groups in agarose. In order to remove sulfate groups from agar, the arylsulfate degrading bacteria was screened from a marine environment.

The arylsulfatase, intracellular enzyme, was hydrolyzed arylsulfate esters to aryl compound and inorganic sulfate. This arylsulfatase was partially purified and its enzymatic properties were characterized. In addition, after the production of agarose from a sulfate of agarpectin using this arylsulfatase, the functional properties of agarose fraction was examined. The results are summarized as follows;

1. Marine bacteria was screened for arylsulfatase production and three strains were isolated. The strain producing highest arylsulfatase activity was identified as *Sphingomonas* sp. nov. using biochemical properties, fatty acid composition, and 16S rDNA sequencing. Complete 16S rRNA gene sequence aligned with other *Sphingomonas* 16S rRNA gene sequence, levels of sequence similarity and a phylogenetic dendrogram was constructed. 16S rDNA sequence of the bacteria in this study is closely related to *Sphingomonas xenophaga* (96.35% similarity), which showed the bacteria was identified as a new species.

2. Optimum medium compositions for the production of arylsulfatase by *Sphingomonas* sp. nov. was identified as 1.4% of tryptone, 0.25% of glucose, 0.15% of K_2HPO_4 , 2.5% of NaCl, 0.012% of $MgSO_4$. Optimum culture condition was determined to be at 30°C and pH 7.0, using a laboratory bioreactor with a capacity of 8 l (KoBioTek, Korea) under constant cultivation conditions.

3. Arylsulfatase was partially purified from *Sphingomonas* sp. nov. through ionic exchange and hydrophobic chromatographies for the preparation of agarose with enzymatic reaction.

4. With the reaction of agar with partially purified arylsulfatase in the ratio of $1:10^5$ (w/w) for 2hr at 45°C, sulfur contents in the agar rapidly decreased in the reaction time of 4hr, gel strength increased to

1.6 fold, and 93% ($p<0.01$) of sulfate in agar was removed. The gel showed similar qualities in gel strength, electroendosmosis, and gelling temperature to the commercial electrophoretic agarose. Furthermore, the content of sulfate was much lower than the commercial agarose. The DNA separation pattern of enzymatically produced agarose shows a better resolution than those from commercial agaroses.

I. 서 론

해양으로부터 유래되는 다당류는 오래 전부터 이용되어 왔는데, 해조류 유래의 agar-agar, alginate, carageenan이나 갑각류 유래의 chitin, chitosan 등이 그 예이다 (Sawabe *et al.*, 1998). 이 중 한천은 홍조류의 세포벽을 구성하는 성분이며, 난소화성 복합 다당류로서 (Matsushashi, 1977; 林, 1970), α (1-4)-3,6-anhydro-D-galactose와 β (1-3)-D-galactose가 교차 결합한 골격을 가지며 (Mackie and Preston, 1974), 70%의 agarose와 30%의 agaropectin으로 구성되어 있다 (Duckworth and Yape, 1971; Yoon and Park, 1984). Agarose는 이당류인 agarobiose가 연속적으로 결합된 형태로 하전을 띄는 반응기가 없으나, agaropectin은 agarose에 6% 정도의 황산기가 ester 결합을 이루고 있기 때문에 (Rudolph, 1999; Jol *et al.*, 1999), 실질적으로 음전하를 띄고 있으므로 전기장하에서 물질의 이동에 영향을 준다 (Hayashi and Okazaki, 1970). agaropectin의 황산기는 종 및 성장시기에 따라 methyl ether 또는 pyruvate acetal group으로 치환되는 경우도 보고되고 있다 (Craigie, 1990). 한천은 온도의 변화에 따라서 가역적으로 sol과 gel로 변화하는 물리적 성질을 가지고 있어, 식품용 (우무, 중국요리, 식품첨가물), 공업용 (호료용, 화장품), 의약품 (정장제), 학술용 (세균배지, 전기영동의 지지체)으로 널리 사용되고 있는 고분자 화합물이다 (Patil and Kale, 1973). 이러한 고분자화합물의 부가가치는 다양한데 식품용 agar의 경우 15\$/Kg 이나 시약용의 전기영동용 고품질 agarose는 1,000-2,000\$/Kg 수준이며, 원료에 비해 무려 200배가 넘는 고부가가가치가 있다. 국내의 한천생산량은 전 세계 생산량의 12%를 차지하고 있는 비교적 풍부한 수산 자원의 하나라고 할 수 있다. 그러나, 실제 한천의 이용 현황에 있어서는 전체 생산량의 약 6.5%정도만이 단순 가공 처리

되어 값싼 원료로 사용되고 있으며, 이중 60-70%는 외국으로 수출되고, 나머지는 식품가공용으로 국내에서 소비되고 있는 실정이다 (수산연감, 1998).

국내의 한천 및 agarose에 관한 연구는 계절과 지역에 따른 한천 원조의 성분변화 (Kim *et al.*, 1995), 한천을 추출하기 위한 전처리 조건 그리고 한천의 성분 조성에 관한 연구가 대부분이다 (Do, 1997; Lee *et al.*, 1975; Park *et al.*, 1985). 한천으로부터 agarose 및 고순도 agarose의 정제법에 관한 연구보다는 홍조류로부터 한천의 제조에만 국한되어 있는 실정이다. 외국의 경우, 의학, 생명공학의 발달과 더불어 agarose 수요가 급증하여 agarose 제조방법이 다양하게 연구되어지고 있다. 예를 들면, 무수초산법 (荒木, 1962), dimethylsulfoxide 분리법 (勝浦 *et al.*, 1965), cetylpyridinium chloride 및 cetyltrimethyl ammonium 추출법 (布施, 1968), polyethylene glycol 추출법 (Polson, 1965), sodium iodide 분리법 (布施, 1967), NaI-acrinol 분리법 (布施, 1969), ethanol 침전법 (Peters, 1964) 및 양이온 계면활성제 분리법 (Ureil, 1961)등 이다. 그러나, 이러한 유기용매에 의한 agarose의 정제법은, 고가의 폐수처리비용과 증류장치의 설비, 작업환경의 악화, 위험한 제조공정 등을 내포하고 있으며, agaropectin을 단순히 제거시켜 agarose를 얻는 방법이므로 그 수율면에서도 경제적인 손실이 크다.

최근, 생명공학기술의 발달과 더불어 산업적으로 유용한 효소를 개발하기 위한 미생물자원의 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나, 연구된 대부분의 효소는 육상 유래 미생물로부터 개발되었으며, 해양으로부터 이용되는 자원은 전체의 1% 이하인 것으로 알려져 있다 (Colwell, 1993). 지구 표면적의 70%를 차지하고 있는 해양은 전 생물종의 약 절반 가량인 300만 내지 500 만 정도의 다양한 생물종이 분포하고 있으

로, 여러 가지 유전자원의 보고라 할 수 있다 (deVries and Beart, 1995). 해양생물로부터 유래되는 대부분의 효소는 육상생물 유래 효소와 유사하지만, 해양에 서식하는 해조류의 분해와 해조류중의 특정 화학기를 수식하거나 가수분해하는 효소들은 육상 생물에는 존재하지 않는 것으로 보고되고 있다 (Chandrasekaran, 1997).

해조류의 다당류에는 sulfate가 다량으로 함유되어 있으며, 식이 중에 함유되어 있는 다당류의 sulfate ester 결합을 분해하여 해조 다당류의 체내 이용도를 높이기 위해 해조류를 섭취하는 해양동물 중에는 소화효소의 일부로써 arylsulfatase (arylsulfate sulfohydrolase E.C. 3.1.6.1)가 분포한다 (Milanesi and Bind, 1972). 여러 가지 연체동물의 소화관은 arylsulfatase의 활성이 높은 것으로 알려져 있다 (Dhevendaran *et al.*, 1980). 어류 (Dhevendaran, 1984), 갑각류 (Dhevendaran *et al.*, 1980), 해양 미생물 등 여러 가지 해양생물로부터 arylsulfatase의 분포에 대하여 몇몇 연구가 시도되었으나 (Maya *et al.*, 1990), arylsulfatase의 활성이 해양동물의 소화효소로 분비되는지, 소화관에 상존하는 세균에 의한 것인지에 대한 자료는 미미한 정도이다. 최근 여러 종의 어류, 새우류 및 조개류를 대상으로 소화관과 소화관내 내용물을 취하여 arylsulfatase 활성을 측정한 결과 생물의 식습관이나, 소화관에 상존하는 세균수는 arylsulfatase의 활성과 상관관계가 없는 것으로 나타났다 (Dhevendaran and Maga, 1998).

이 연구에서는 해양 미생물이 생산하는 효소를 이용하여 해조다당류의 구조적인 분해를 시도하고자 해수로부터 arylsulfatase를 생산하는 균주인 *Sphingomonas sp. nov.* 를 분리하고, 이 분리 균주의 배양 및 arylsulfatase를 생산하는 최적생산조건을 확립하여, 한천 agaropectin 중의 황산기에 적용시킨 후, 물리·화학적 특성을 비교 분석 하고자 한다.

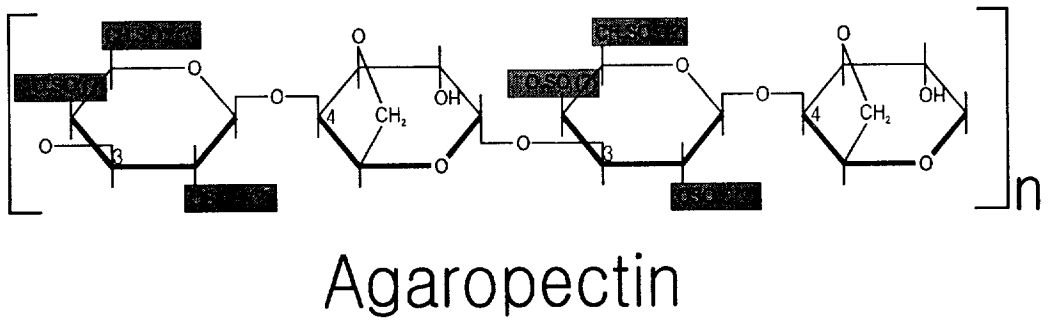
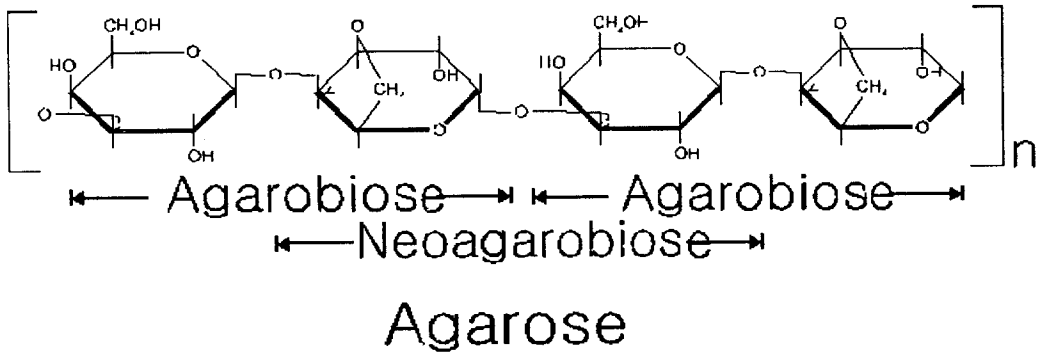


Fig. 1. Structure of agarose and agaropectin

II. 재 료 및 방 법

1. 실험 재료

1-1. 균주 분리용 시료

균주 분리용으로 사용한 시료는 2000년 9월 여수시 돌산도 일대의 해수에서 채취하였다.

1-2. 균주 분리 배지

본 실험에 사용된 배지 중 arylsulfatase 생산 균주를 검색하기 위한 배지로서는 ρ -nitrophenylsulfate (Sigma chemical Co. USA)를 5mM의 농도로 첨가한 sea water agar medium (Zobell's 2216e medium: beef extract, 1%; peptone, 1%; agar, 2%; sea water, 75%; tap water, 25%)을 사용하였다. 균주의 배양에는 최소배지로 TSB 배지 (Czapek-Dox medium, NaNO_3 0.3%, K_2HPO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, sucrose 3%)를 사용하였고, 고체배지는 상기의 액체배지에 1.5%의 한천을 첨가하여 조제하였다.

1-3. 효소 활성 측정 기질

효소정제 및 특성 실험에 사용된 기질은 potassium salt 형태의 기질인 ρ -nitrophenylsulfate를 25 mM되게 0.2 M Tris-HCl, pH 7.0 buffer에 용해하여 사용하였다. 그 외 사용된 시약은 시약용 특급시약을 사용하였다.

1-4. 한천

효소에 의한 agarose제조에 사용된 한천은 국내 한천 회사 ((주) 명신화성)에서 생산된 식용한천을 이용하였다.

2. 실험 방법

2-1. Arylsulfatase 생산 균주의 분리

2-1-1. 균주의 선발

Arylsulfatase를 생산하는 균주를 검색하기 위하여 *p*-nitrophenylsulfate를 5 mM의 농도로 첨가한 sea water agar medium (Zobell's 2216e medium: beef extract, 1%; peptone, 1%; agar, 2%; sea water, 75%; tap water, 25%)에 시료를 도말하고 30℃에서 2일간 배양 후 콜로니 주변에 황색의 환을 생산하는 균주를 분리하였다.

2-1-2. 선별균주의 보존

선별된 균주의 보존은 TSB배지에 각각 접종하여 30℃에서 2일간 배양하고, 배양된 균체를 원심분리 후 수집하여 50% 글리세롤에 균체를 희석하여 -40℃에 냉동보존하면서 본 실험에 사용하였다.

2-1-3. 16S rRNA PCR 과 primer design

Genomic DNA는 변형된 Rochelle방법 (Rochelle *et al.*, 1994)으로 분리하였고, *E. coli*의 16S rDNA의 50-70과 1374-1394 지역의 염기서열을 primer로 사용하여 PCR로 증폭시킨 후 16S rDNA의 1차 구조를 분석하여 동정하였다. PCR 및 sequence 용 primer (Lane, 1991)는 *E. coli*의

Table 1. List of primers for amplification and sequencing of 16S rDNA region of *Sphingomonas* sp. nov.

Primer		Type	Sequence(5'-3')	Tm	Ori.
ASF1	8-27	PCR & Sequencing	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	60.4	Forward
ASF2	330-348	Sequencing	CGGYCCAGACTCCTACGGG	63.4	Forward
ASR1	515-535	Sequencing	TTACCGCGGCTGCTGGCAC	71.5	Reverse
ASR2	803-785	Sequencing	CTACCAGGGTATCTAATCC	52.4	Reverse
ASR3	927-942	Sequencing	GGGCCCGCACAAGCGG	72.1	Reverse
ASF3	1107-1088	Sequencing	GCTCGTTGCGGGACTTAACC	68.9	Forward
ASR4	1477-1492	PCR & Sequencing	GGTTACCTTGTTACGACTT	53	Reverse

8-27 지역의 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'와 1477-1492 지역의 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'를 사용하였고 direct sequence-용 primer는 *E. coli*의 330-348 지역의 5'-Sequencing CGGYCCAGACTCCTACGGG-3', 515-535 지역의 5'-TTACCGCGGCTGCTGGCAC-3', 803-785 지역의 5'-CTACCAGGGTATCTAATCC-3', 927-942 지역의 5'-GGGCCCCGACAAGCGG-3' 및 1107-1088 지역의 5'-GCTCGTTGCGGGACTTAACC-3'을 사용하였다

PCR 생성물을 pGEM-T Easy vector system (Promega Co. Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 cloning 후 *E. coli* 에 형질전환하고, 16S rDNA 정제는 Wizard PCR Preps DNA Purification system (Promega Co. Madison, WI, U.S.A.)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다 (Table.1.).

2-1-4. DNA Sequencing

GenAmp[™] PCR System 9700 (Perkin-Elmer)으로 ABI PRIBM[™] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer)와 ABI PRIBM[™] 310 Genetic Analyzer (Perkin-Elmer)를 이용하여 DNA 서열을 분석하였다.

2-1-5. 균주의 동정

16S rDNA의 분석은 rRNA이차구조를 참고하여 sequence를 alignment 하고, %Similarity 값 (Felsenstein, 1993)을 구하였다. Evolutionary distance는 Jukes and Cantor (1969)model에 의해 계산하였다. Phylogenetic tree는 Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)로 작성하였다.

2-1-6. 염기서열분석

Lagergene software (DNA STAR Inc., Madison, U.S.A.)와 Gene Bank의 BLAST search를 통하여 분석하였으며, Jukes and Cantor (1969)의 Neighbor-Joining 방법을 이용하여 계통발생학적으로 분석하였다.

2-1-7. 단백질 농도측정

효소 단백질의 농도는 Bradford (1976)의 방법에 따라 시판되는 protein assay kit (Bio-Rad Co., LTD. U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 즉, 적당히 희석된 효소용액 10 μ l와 D.W 790 μ l를 혼합한 후 protein assay 시약 200 μ l를 가하여 vortex로서 교반하여 실온에 5분간 방치 후, UV/Vis spectrophotometer (Ultrospec 3000, England)로써 595nm에서 흡광도를 측정하였다. bovine serum albumin (BSA)표준 단백질 용액으로서 측정한 표준 검량선에 의하여 단백질 농도를 결정하였다 (Fig 2).

2-1-8. Arylsulfatase 활성 측정

시료 1ml (in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.0)에 25 mM ρ -nitrophenyl sulfate 기질 용액 250 μ l를 가하여 45 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 N NaOH를 1 ml을 가하여 유리된 ρ -nitrophenol을 발색시켜 UV/Vis spectrophotometer (Ultrospec 3000, England)로써 파장 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성 단위는 ρ -nitrophenol으로 표준곡선을 작성하여 효소 반응 시간(분) 당 유리되는 ρ -nitrophenol의 μ mole수로 계산하였다.

$$\text{Specific activity (U/mg)} = \frac{1.348 \times A_{410} \times D}{\text{반응시간 (분)} \times \text{단백질 농도 (mg/ml)}}$$

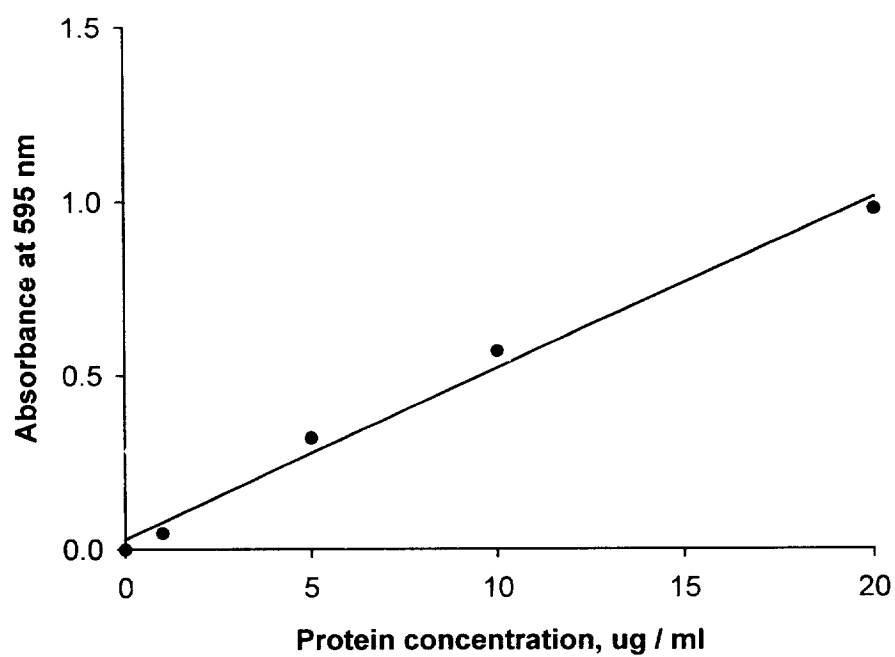


Fig 2. Standard curve for determination of protein concentration.

식 중 상수 1.348은 유리되는 ρ -nitrophenol과 흡광도 간의 관계식에서 구한 기울기, D는 희석배수, A_{410} 은 파장 410nm에서 측정한 흡광도이다.

2-1-9. 균체량 측정

균체량은 배양액을 일정량 취해 UV/Vis spectrophotometer (Ultrospec 3000, England)로써 파장 600nm에서 흡광도를 측정하였다.

2-2. Arylsulfatase생산 최적배지 조성

2-2-1. 질소원

질소원에 의한 균의 증식과 효소생산능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소생산용 basal medium (0.5% K_2HPO_4 , 0.5% glucose, 1% NaCl)에 trypton농도가 0, 0.40, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 및 1.8%로 각각 조제하여 121℃에서 15분간 멸균한 후, 균주를 접종하고, 회전식 진탕 배양기 (30℃, 200rpm)에 3일간 배양, 원심분리 (2,500×g, 30min) 시킨 후 균체 파쇄 후 원심분리하여 얻은 상층액으로 효소활성을 측정하여 배지 중 최적 질소원 농도를 결정하였다.

2-2-2. 탄소원

탄소원에 의한 균의 증식과 효소생산능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 적정 수준의 질소원을 첨가한 basal medium에 glucose농도가 각각 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 및 0.5%로 조제하여 멸균 (121℃, 15min)한 후, 균주를 접종하고, 회전식 진탕 배양기 (30℃, 200rpm)에 3일간 배양, 원심분리 (2,500×g, 30min)시킨 후 균체파쇄 후 원심분리하여 얻은 상층액으로 효소활성을 측정하여 배지 중 최적 탄소원농도를 결정하였다.

2-2-3. 인산염

인산염에 의한 균의 증식과 효소생산능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 적정 수준의 질소원과 탄소원을 첨가한 basal medium에 K_2HPO_4 농도가 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 및 0.5%로 각각 조제하여 121℃에서 15분간 멸균한 후, 균주를 접종하고, 회전식 진탕 배양기 (30℃, 200rpm)에 3일간 배양, 원심분리 (2,500xg, 30min) 시킨 후 균체 파쇄 후 원심분리하여 얻은 상층액으로 효소활성을 측정하여 배지 중 최적 K_2HPO_4 농도를 결정하였다.

2-2-4. NaCl 농도

효소의 최대생산을 위해 위에서 결정된 질소원, 탄소원 및 인산염의 최적 조건을 적용한 basal medium에 NaCl 농도를 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 및 5.0%로 각각 조제하여 121℃에서 15분간 멸균한 후, 균주를 접종하고, 회전식 진탕 배양기 (30℃, 200rpm)에 3일간 배양, 원심분리 (2,500xg, 30min) 시킨 후 균체 파쇄 후 원심분리하여 얻은 상층액으로 효소활성을 측정하여 배지 중 최적 NaCl 농도를 결정하였다.

2-2-5. $MgSO_4$ 농도

효소의 최대생산을 위해 적정 수준의 질소원, 탄소원, 인산염과 NaCl을 첨가한 basal medium에 $MgSO_4$ 농도를 0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.025 및 0.5%로 각각 조제하여 121℃에서 15분간 멸균한 후, 균주를 접종하고, 회전식 진탕 배양기 (30℃, 200rpm)에 3일간 배양, 원심분리 (2,500xg, 30min) 시킨 후 균체 파쇄 후 원심분리 하여 얻은 상층액으로 효소활성을 측정하여 배지 중 최적 $MgSO_4$ 농도를 결정하였다.

2-3. Arylsulfatase 생산 최적배양 조건

2-3-1. pH, 배양온도, 배양시간

효소의 최대생산을 위해 최적조건의 배지로서 pH를 각각 pH 6, 6.5, 7, 7.5로 조제하고, 배양온도를 25, 30, 35 및 40℃로 온도범위를 달리하여 회전식 진탕 배양기 (30℃, 200rpm)에서 배양하였다. 배양액은 원심분리 (2,500×g, 30min)하여 균체를 모았다. 여기서 얻은 균체는 파쇄 후 원심분리하여 얻은 상층액으로 효소활성을 측정하여 최적 pH와 온도를 결정하였다. 결정된 조건에서 배양시간을 각각 24시간에서 192시간 (8일간)까지 배양한 후, 같은 방법으로 최적배양시간을 결정하였다.

2-4. Arylsulfatase 부분 정제

2-4-1. 대량배양

배지의 pH를 7.0으로 고정하고, 질소원으로 trypton 1.4%, 탄소원으로 glucose 0.25%, 그 외 potassium phosphate, sodium chloride 및 magnesium sulfate를 각각 0.15%, 2.5% 및 0.012%로 하여 *Sphingomonas* sp. nov.를 30℃에서 50 l laboratory bioreactor (KoBioTek, Korea)를 사용하여 48시간 대량 배양하였다.

2-4-2. Ion-chromatography를 이용한 조효소 분리

대량 배양된 균체로부터 효소를 분리하기 위하여, 이 배양액 (50 l)을 원심분리 (8000×g, 20min)하여 상층액을 제거하고 균체만을 회수하였다. 회수된 균체를 100mM phenylmethanolsulfonyl fluoride (PMSF)와 10% Triton-X 100이 포함된 0.02M Tris-HCl (pH 7.0)로 현탁 시킨 다음 초음파 파쇄기 (47 kHz, 5min)로 파쇄한 후, 0.2M Tris-HCl 용액으로 배양액의 pH를

7.0으로 조정한 후 원심분리 (10,000xg, 20min)하여 상층액을 20 mM Tris-HCl, (pH 7.0)완충액으로 평형화된 Q-sepharose (음이온 교환수지)column (2×15cm)에 단백질을 흡착시켰다. 칼럼에 흡착되지 않은 단백질을 완충액으로 씻어 제거한 후, 흡착된 효소를 0.1 - 0.5M NaCl을 함유하는 동일 완충용액 (400ml)으로 직선농도구배법으로 용출시켰다. Arylsulfatase획분을 모아서 2.0M의 ammonium sulfate (A.S.)를 동량 가하여 최종농도가 1.0M이 되게 하였다. 이 효소용액은 20mM Tris-HCl (pH 7.0)에 1M A.S.가 함유된 완충액으로 평형화된 phenyl-sepharose (소수성교환수지)column (2×15cm)에 통과 시켜 효소를 흡착시켰다. 효소는 1.0 - 0.0M 의 A.S.을 함유하는 동일완충용액 300ml로 직선농도구배법을 이용하여 용출시켰다. 분획된 효소 획분을 모아서 효소활성을 측정한 결과 arylsulfatase활성이 확인되었으며, 이 활성이 높은 효소를 실험의 조효소로 사용하였다 (Fig. 3.).

2-4-3. SDS-PAGE

SDS-PAGE는 Laemmli (1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE)로 측정하였다. 15% gel에 표준단백질과 SDS화 시킨 시료를 같이 주입하여 150V에서 2시간 동안 통전시킨 후 coomassie brilliant blue R-250을 사용해 염색하고 M-OH : isoprophyl alcohol : 증류수 (1:1:8)혼합액으로 탈색시켜 효소 정제시 순도의 판정자료로 삼았다.

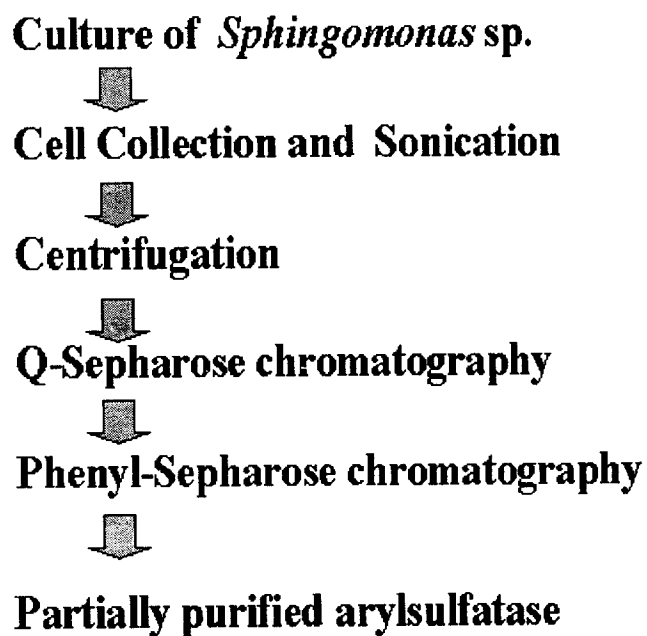


Fig. 3. Experimental procedure for the partial purification of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. nov.

2-5. Arylsulfatase를 이용한 한천중의 황산기 분해

1 kg의 한천를 취해 5%가 되게 D.W를 첨가하여 55℃에서 200rpm 의 속도로 1시간동안 교반하면서 균질액을 만든 다음, 10 Unit의 arylsulfatase 10ml를 가하여 한천중의 황산기 분해 반응을 유도하였다.

2-6. Arylsulfatase로 제조된 agarose의 물리·화학적 특성

2-6-1. 황산기의 함량

황산염 함량은 Dodgson과 Price (1962)법으로 분석하였다. 황산기의 측정은 시료를 가열하여 녹인 후, 유리판에 부어 건조시킨다. 건조후 생성된 박막을 infrared spectrophotometer (IR)로 흡수파장을 측정하였다. 이때 표준품으로는 함량이 알려진 상용의 agarose를 구입하여 사용하였다.

2-6-2. 황산이온측정

황산이온의 측정은 Hunt (Hunt, 1980)의 방법에 따라 측정하였다. 황산의 함량이 적은 경우에 적용되는 방법으로, 한천 및 agarose 일정량 ($10\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}/5\text{ml}$)에 황산염의 농도가 $2\mu\text{g}\sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 3N HCl을 가하여 121℃에서 3시간 가수분해시킨 후 여과하여 시료용액으로 하였다. 시료용액 4.5ml에 농염산 0.5ml을 가하여 5ml (황산으로써 $10\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}$ 함유)을 채취하여 여기에 13.3% 염화바륨 - 2.67% Tween80 용액을 3ml 가하여 교반시켜 30~45분간 방치한 후 다시 vortex하여, UV/Vis spectrophotometer (Ultrospec 3000, England)로써 파장 420nm에서 물을 대조군으로 하여 흡광도를 측정하였다. 0.01 N 황산표준용액 ($980\mu\text{g}/\text{ml}$)을 10% 염산에 희석하여 황산으로써 2, 4, 8, 12, $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 검량선용 표준용액을 조제한 다음, 이때 표준용액 ($2\mu\text{g}\sim 20\mu\text{g H}_2\text{SO}_4/\text{ml}$)

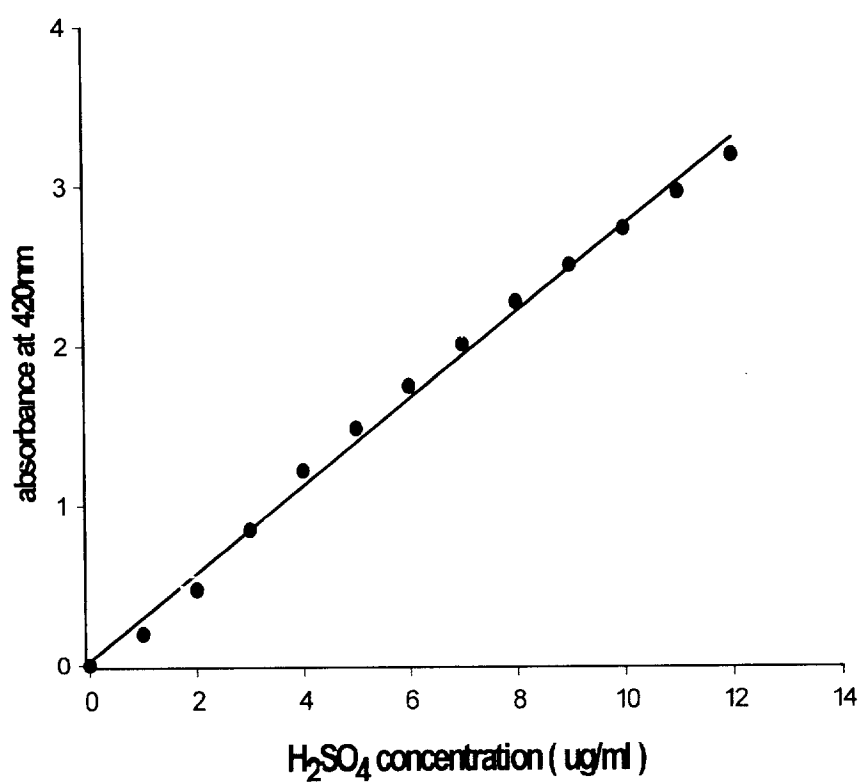


Fig 4. Standard curve for determination of sulfate concentration.

5ml을 취하여 위와 같은 방법으로 측정하여 구한 회귀직선식으로 부터 시료중의 황산의 함량을 결정하였다 (Fig 4).

2-6-3. Gel strength의 측정

Gel strength (겔 파괴강도)는 1% 용액으로 조제한 한천용액을 ϕ 60×30mm의 용기에 부어 뚜껑을 닫아서 25℃에서 하룻밤 방치하고 4℃에서 2시간 방냉하여 직경 5mm의 실린더형의 plunger (Cylinder Probe, Part No. P/5)를 부착한 Texturemeter (Model TAXT2J/25, Stable Micro Syatems Co., LTD. England)로써 0.5 Speed mm/sec에서 측정하였다.

2-6-4. Viscosity의 측정

한천의 점도는 한천을 각각 0.5%와 1% 농도로 조제하여 65℃와 80℃에서 B type viscometer (Model BM, POKIMEC, Japan)로써 60rpm의 spindle 속도로서 측정하였다.

2-6-5. Melting point 및 Gelling temperature 의 측정

Melting point는 1.5% 한천현탁액 10ml를 온도중심점에 온도계를 부착한 시험관 (2×20cm)에 취한 후에, 항온조에 넣고 항온조의 온도를 5℃/min 로 승온하면서 한천 입자가 완전히 없어질 때, 즉, 온도계와 시험관이 분리되는 시점의 온도와 1.5% 한천현탁액 10ml를 온도중심점에 온도계를 부착한 시험관 (2×20cm)에 취한 후에, 수시로 온도계를 들어 올려 온도계와 시험관이 같이 올라오는 때의 온도를 측정하여 각각 melting point와 gelling temperature로 하였다.

2-6-6. Syneresis ratio의 측정

Syneresis ratio (이수율)의 측정은 1.0% 한천 5ml을 15ml의 cap tube에 취하여 밀봉하여 상온에서 지면과 10° 정도 경사지게 눕혀 굳힌 후 거꾸로 세워 4℃에서 하룻밤 방치시킨 다음, 발생한 수분을 무게를 알고 있는 여과지에 흡착시켜 칭량하여 백분율로써 나타내었다.

2-6-7. Turbidity의 측정

Turbidity (탁도)의 측정은 1.0%의 한천 용액을 조제하여 각각 65℃와 20℃로 온도를 고정한 후 파장 600nm에서 UV/Vis spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

2-6-8. Electrodosmosis (EEO)의 측정

EEO의 측정은 dextran과 bovine serum albumin (BSA)을 동시에 1.5% agarose gel을 이용하여 전기영동으로 측정하였다. 이때 EEO는 다음 식에 의해 계산되었다 (FMC 규격).

$$- Mr = OD / (OD + OA)$$

OD는 dextran의 이동거리이고, OA는 BSA의 이동거리.

2-6-9. DNA 분리능

agarose의 전기영동은 agarose의 농도가 0.8% gel에서 5 volt/(gel세로길이cm)의 전압으로 전기영동하였다. 이때 표준물질로서 1Kb DNA marker lader (Difco, U.S.A.)를 1μg loading하였다. 전기영동 후 DNA band의 형태를 관찰하여 agarose의 품질을 평가하였다. 대조군으로 FMC (FMC Co. LTD., U.S.A.)와 Ammesco (Ammesco Co. LTD. U.S.A.)agarose를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Arylsulfatase 생산 균주의 분리

1-1. 분리 균주의 16S rDNA 서열에 의한 계통학적 분석

Arylsulfatase를 생산하는 균주를 검색하기 위하여 *p*-nitrophenylsulfate를 5 mM의 농도로 첨가한 sea water agar medium에 시료를 도말하고 30°C에서 2일간 배양한 후 콜로니 주변에 황색의 환을 형성하는 균주를 분리하였다. 분리된 Arylsulfatase활성이 강한 균주를 생명공학연구소에 동정 의뢰하였다. 균의 동정은 최근에 분자 생물학적 방법의 도입으로 객관적이고 정확한 동정이 가능해 졌다. 여러 유전자를 이용할 수 있으나, 현재 전세계적으로 축적되어 있는 데이터베이스가 Ribosomal RNA유전자의 Internal transcribed spacer (ITS) 및 Large ribosomal RNA의 D1 - D2 부분에 대하여 이루어져 왔기 때문에, 이 두 부분을 기본 단위로 염기서열을 분석하는 16S rRNA 유전자 분석에 크게 의존하고 있다. 현재까지 알려진 세균의 종은 약 4200 개로, 이들 중 상당수 종의 표준균주에 대하여 16S rRNA 유전자의 염기서열이 분석되어 있으므로 동정하고자 하는 균주의 16S rRNA 유전자를 분석하면 (Fig. 5.), 이 균주가 전체 세균중에서 어느 종에 가까운지를 알 수 있게 된다. 현재 국제적인 합의 (학문적)에 의해 2차 구조를 이용한 정확한 염기서열 정렬후에 유사도가 97% 이내이면 다른 종으로 볼 수 있다 (Table. 2). 본 균주는 16S rDNA의 50 - 70과 1374 - 1394 지역의 염기서열을 primer로 사용하여 PCR로 증폭시킨 후 16S rDNA의 1차 구조를 분석하여 행하였으며, 동정 결과는 Table. 2 및 Fig. 5, 6에 정리하였다. 해수로부터 분리된 본 균주는 16S rRNA 분석결과, *Sphingomonas* sp. nov.로 판명되었으며, 신종으로 밝혀졌다 (Fig. 6.).

CGAACGCTGGCGGCATGCCTAACATGCAAGTCGAACGATCCCTTCGGG
 GATAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGGAATCTGCCCTTGGGTTCGG
 AATAACGTCGGGAAACTGACGCTAATACCGGATGATGACGTAAGTCCAAA
 GATTTATCGCCAGGGATGAGCCCGCTAGGATTAGCTAGTTGGTGGGGT
 AAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
 CAACTGGGACTGAGACACGGCCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
 GAATATTGGCAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGA
 TGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCAGAGATGATAATGACAGT
 ATCTGGGGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GGAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGC
 GCGGATTTAAGTCAGAGGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGAAGTGCCT
 TTGAGACTGGATTGCTTGAATCCGGGAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGT
 AGAGGTGAAATTCGTAGATATTGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
 CACTGGACCGGCATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
 ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACYAGCTGCCGG
 GGCACATGGTGTTCGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGG
 GGAGTACGGTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCTGCAC
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCA
 ACGTTTGACATCCTCATCGCGATTTCCAGAGATGGATTTCTTCAGTTCGG
 CTGGATGAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTCTGAGA
 TGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGTTGCCAGC
 ATTTGGTTGGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGT
 GGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGTTGGGCTACACACGTG
 CTACAATGGCGACTACAGTGGGCAGCGACCTCGCGAGGGGGAGCTAATCT
 CAAAAGTCGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAG
 GCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
 AGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGATTCACTCGAA
 GGCCTTGAGCTAACCGBAAGGAGGCAGGCGACCACAGTGGGTTTAGCGAC
 TGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA

Fig. 5. Full sequence of 16S rDNA of *Sphingomonas* sp. nov.

Table 2. Result of Similarity Analysis

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

해수에서 분리된 *bacillus gelatius*가 분비하는 extracellular enzyme이 오랫동안 세균들이 탄소원으로 이용할 수 없었던 해조다당류인 한천을 액화시킨다는 것이 처음 발견 (Gran, 1902)된 이래, 해수로부터 한천을 분해하는 균은 20여종 분리되었다 (Goresline, 1933; Humm, 1946). 이들은 α -linkage를 분해하는 α -agarase나, β -linkage를 분해하는 β -agarase를 생산하는 2종류로 나누어지며, 주로 다당류를 보다 저당류로 분리하는 균의 연구에 편중되어 있는 편이다. agaropectin의 sulfate를 분해하는 균은 아직까지 알려진 보고는 없으며, 새롭게 발견된 균주인 *Sphingomonas* sp. nov.로 판명된 것은 당연하다 할 수 있겠다.

1-2. 분리 균주의 Arylsulfatase 활성

검색, 선발된 균주의 arylsulfatase 활성을 확인하기 위하여 TSB에서 진탕배양하고, 이 배양액을 원심분리 ($8,000 \times g$, 15min)하여 균체를 수거한 다음, 파쇄 후 원심분리하여 상층액 중의 단백질의 농도를 측정하였다. 이 때의 단백질의 농도는 0.0266 mg/ml였으며, arylsulfatase 활성은 4.25 U/ml로 비교적 높은 활성을 보였다.

1-3. 분리 균주의 최적성장조건

1-1에 설명한 바와 같이 분리한 균주의 최적 성장 조건을 검색한 결과 질소원은 trypton 1.4%일 때, 탄소원은 glucose 0.25%를 첨가하였을 때, potassium phosphate, sodium chloride 및 magnesium sulfate가 각각 0.15%, 2.5% 및 0.012% 때 균주 성장이 최고에 달하였다. 시험의 배양 조건은 예비 시험을 통하여 가장 바람직하다고 판단되는 교반 속도 350rpm, pH 7.0, 통기량 1v.v.m으로 고정하였다.

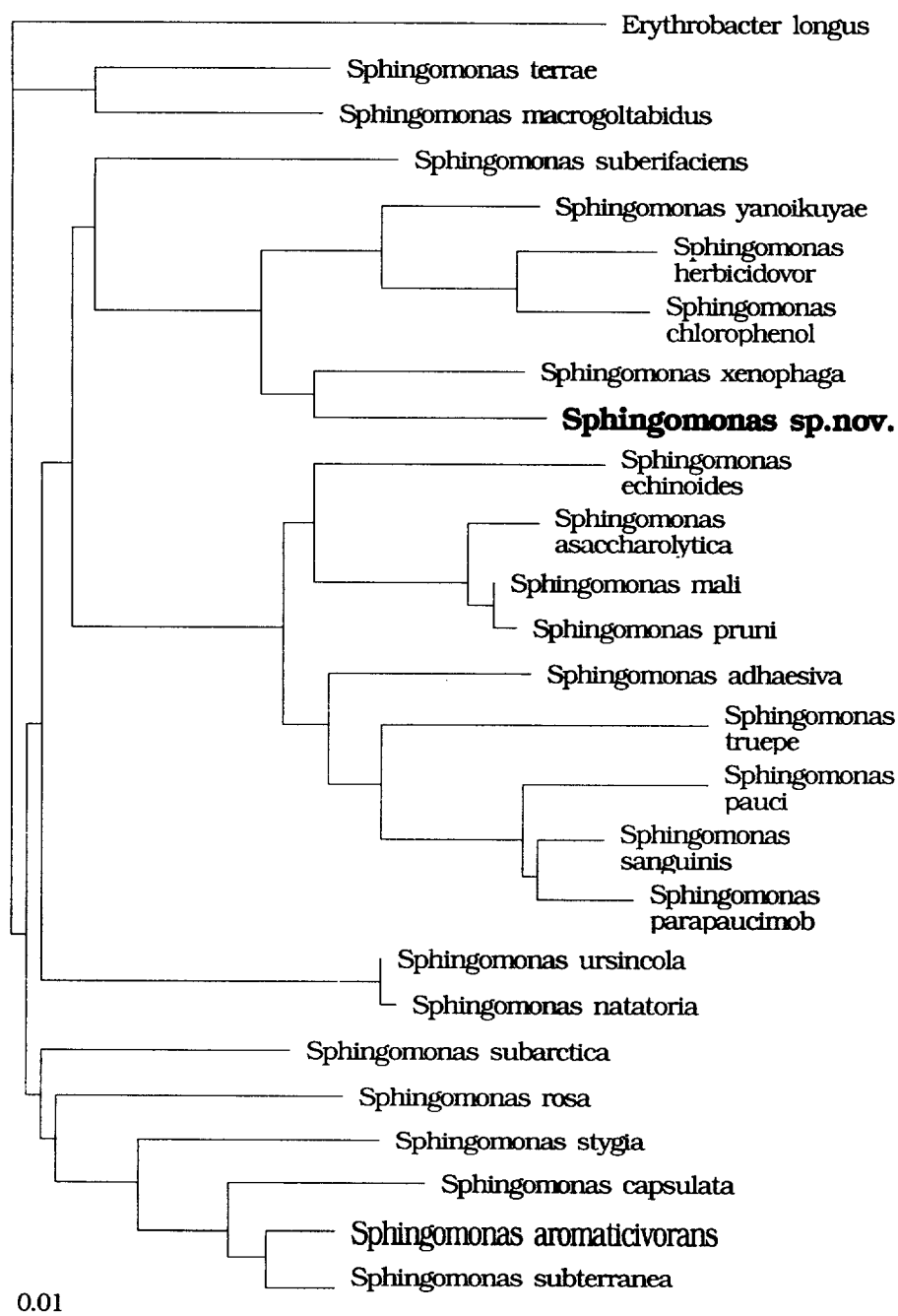


Fig. 6. Phylogenetic neighbor-joining tree obtained from the 16S rDNA sequence analysis

2. Arylsulfatase 생산 최적배지조성

2-1. 질소원

질소원에 의한 균의 증식과 효소생산능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소생산용 basal medium (0.25% glucose, 0.25% K_2HPO_4 , 0.5% NaCl)에 trypton농도가 0, 0.40, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 및 1.8%로 각각 다르게 만든 배지로 배양한 균주로부터 얻어진 효소의 활성을 측정한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 trypton의 농도가 높아지면 균의 성장은 2.0%의 농도까지 직선상으로 비례하여 농도에 비례하여 증가하였으나, 효소 활성은 trypton농도가 1.4%일 때 최대 값을 나타냈었고 그 이상에서는 오히려 감소하였다. 이러한 결과는 배지에 별도로 첨가되어진 포도당의 유무에 관계없이 균체의 증식에 질소원의 이용효율이 높은 것으로 나타나 일반적인 세균류와는 차이를 보였다. 일반적으로 해양 세균의 경우 균체성장에 질소원의 이용효율이 높은 것으로 보고되어져 있는 것과는 일치하는 결과이다. 이상의 결과를 바탕으로 arylsulfatase 생산을 위한 배지조성을 결정하기 위한 이후의 실험은 효소생산 배지에 trypton농도를 1.4%로 고정하였다.

2-2. 탄소원

효소의 최대생산을 위한 탄소원의 최적 농도를 결정하기 위하여 이미 확립된 배지의 질소원으로 trypton의 농도를 1.4%로 고정시킨 basal medium (1.4% trypton, 0.25% K_2HPO_4 , 0.5% NaCl)에 탄소원으로 glucose 농도가 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 및 0.5%로 달리하여 배양한 균주의 효소 활성은 Fig. 8에 나타내었다. 그 결과 포도당의 농도에 따라 균체의 증식에는 약간의 차이는 있었으나 유의성은 나타나지 않았다.

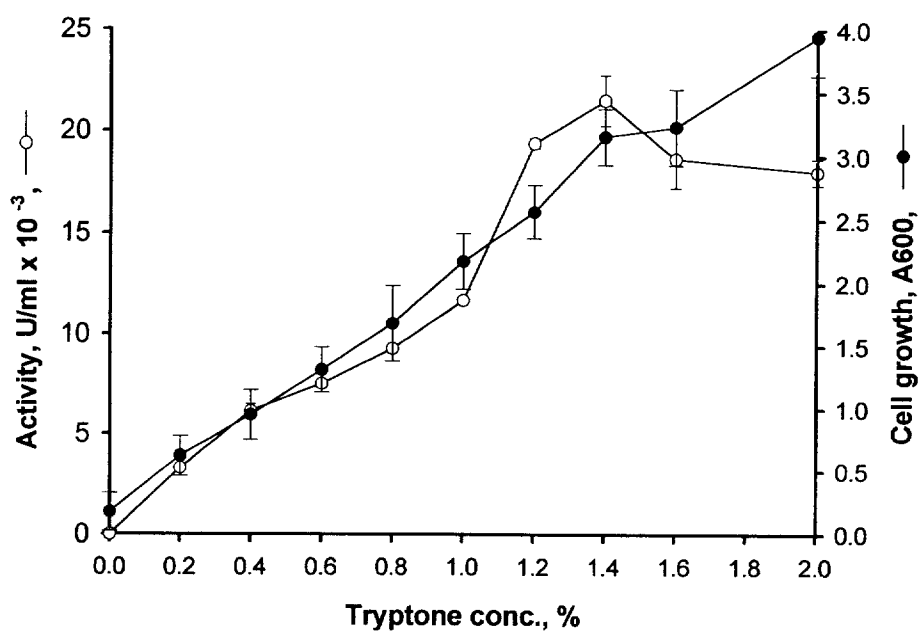


Fig. 7. Effect of tryptone cocentration on cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp.nov.

Medium composition : Glucose, 25g/L; K_2HPO_4 , 25g/L; NaCl, 5g/L

$MgSO_4$, 0.1mM; $MnSO_4$, 0.01mM; $FeSO_4$, 0.01mM.

Culture condition : Culture Temp., 30°C; Agitation, 350rpm;

Aeration, 1v.v.m.; Medium pH, 7.0; Culture volume, 8L

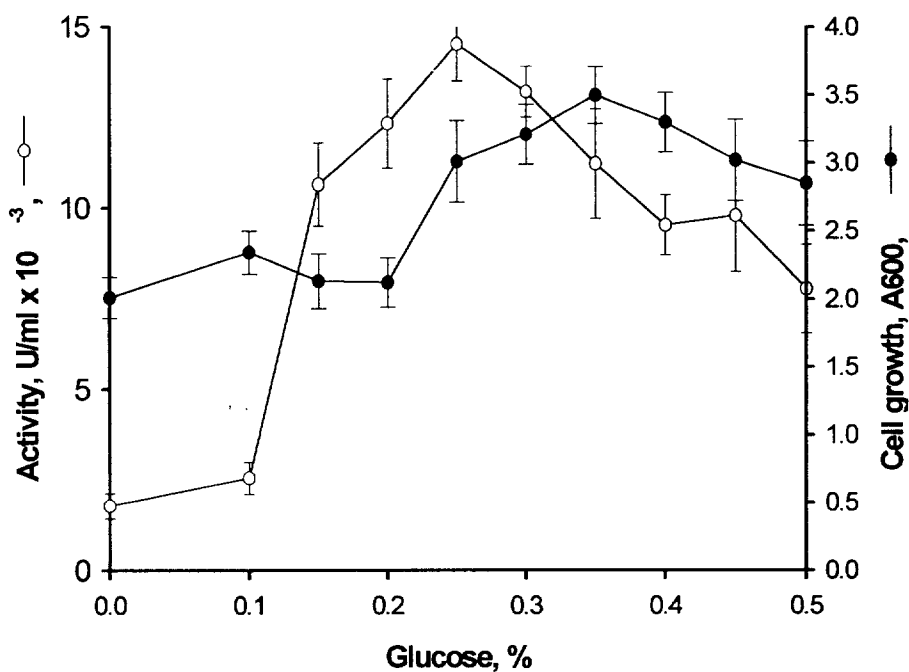


Fig. 8. Effect of glucose concentration on cell growth and arylsulfatase activity of *Shpingomonas* sp. nov.

Medium composition : tryptone, 14 g/L; K₂HPO₄, 25g/L; NaCl, 5g/L

MgSO₄, 0.1mM; MnSO₄, 0.01mM; FeSO₄, 0.01mM.

Culture condition : Culture Temp., 30°C; Agitation, 350rpm;

균주의 성장은 0.25%이상에서 증가하여 0.35% 일 때 최대를 나타내었으며, 효소 활성은 0.25%에서 최대 값을 나타내고 그 이상과 이하에서 떨어졌다. 앞의 질소원 농도에 대한 결과와 대조해보면 tryptone이 일정농도 존재 하면 탄소원의 농도에 관계없이 일정한 균체성장을 보여 질소원에 의하여 균체의 성장속도가 좌우되는 것과 일치함을 알 수 있다. 이상의 결과로 이후의 실험에서는 배지 중 최적 glucose농도를 0.25%로 결정하였다.

2-3. 인산염

K_2HPO_4 는 일반적으로 균체의 성장에 따라 달라질 수 있는 배지의 pH를 유지시키는 완충제로서 배지에 많이 첨가되어 사용되고 있다. 앞의 결과에서도 알 수 있듯이 효소의 생산성과 pH는 밀접한 관계가 있으므로, 효소의 최대생산을 위한 인산염의 최적 농도를 결정하기 위하여 이미 확립된 배지의 질소원으로 trypton의 농도를 1.4%, 탄소원으로 0.25% glucose로 고정시킨 basal medium 중의 K_2HPO_4 농도를 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 및 0.5%로 각각 조제하여 배양한 균주로부터 얻어진 효소의 활성을 측정한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 9에서 보는 바와 같이 균의 성장은 K_2HPO_4 의 농도에 따라 큰 차이는 나타나지 않았으나 효소의 생산성은 0.15%까지 직선적으로 증가하다 이후 완만하게 감소하였다. 따라서 효소생산을 위한 K_2HPO_4 의 농도를 0.15%로 고정하였다.

2-4. NaCl농도

해양 미생물은 육상 미생물과는 달리 삼투압에 대한 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 위에서 결정된 질소원, 탄소원 및 인산염의 최적 조건을 적용한 basal medium (1.4% trypton, 0.25% glucose, 0.15% K_2HPO_4)에 NaCl농도가 각각 0, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 및 0.5%

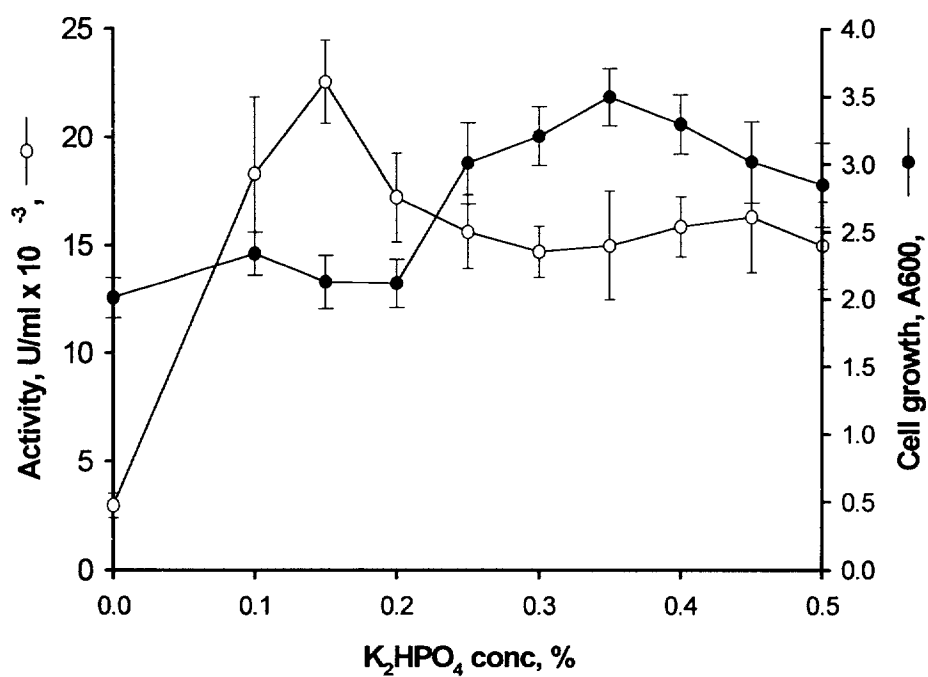


Fig. 9. Effect of phosphate concentration on cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Medium composition : tryptone, 14g/L; Glucose, 2.5g/L; NaCl, 5g/L

$MgSO_4$, 0.1mM; $MnSO_4$, 0.01mM; $FeSO_4$, 0.01mM.

Culture condition : Culture Temp., 30°C; Agitation, 350rpm;

Aeration, 1v.v.m.; Medium pH, 7.0; Culture volume, 8L

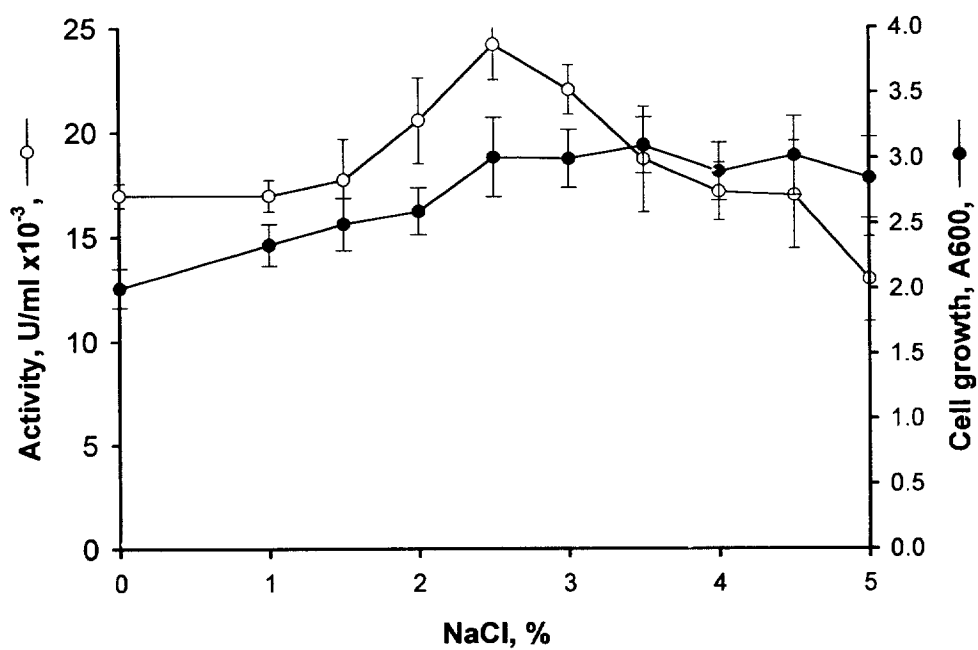


Fig. 10. Effect of NaCl in cell mass and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Medium composition : tryptone, 14g/L; Glucose, 2.5g/L; K_2HPO_4 , 1.5g/L

$MgSO_4$, 0.1mM; $MnSO_4$, 0.01mM; $FeSO_4$, 0.01mM.

Culture condition : Culture Temp., 30°C; Agitation, 350rpm;

Aeration, 1v.v.m.; Medium pH, 7.0; Culture volume, 8L

로 조제된 배양액에서 배양된 균주로 부터 NaCl의 농도에 따른 균체의 증식과 효소 생산성을 측정하기 위하여 NaCl농도별 효소생산성을 검토하였다 (Fig. 10). 예상과는 달리 효소의 생산성 및 균체의 성장에 삼투압은 그다지 영향을 받지 않은 것으로 나타나는 일반적인 보고와는 약간의 차이를 보였다. 효소생산을 위한 최적 NaCl농도는 2.5%로 결정하였다

2-5. MgSO₄농도

MgSO₄는 동식물 및 미생물 균체내에서 미량이지만 효소의 생산에 필요한 필수인자로 알려져 있다. 따라서 위에서 결정된 최적 조건을 적용한 basal medium에 MgSO₄의 농도 (0 ~ 0.025%)를 조정하여 효소의 생산성과의 관계를 알아보았다. 그 결과 균체의 성장에는 별다른 영향을 주지 못하였으나 효소의 생산성에는 0.012%까지 직선적인 관계를 보인 후 효소의 생산성이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 10).

2-5. Arylsulfatase생산 최적배양조건

효소의 최대생산을 위한 최적 pH를 결정하기 위하여 각각 pH를 4.0 ~ 9.0의 범위로 조정하여 배양하였으며, 성장 속도 및 효소 활성을 측정하였다. trypton농도, 무기인산 농도, Glucose농도, NaCl농도는 위에서 결정된 최적 조건을 적용하였다. Fig. 12에 나타난 바와 같이 pH 7에서 성장 및 효소활성이 가장 높은 것을 알 수 있었다. 그러나 pH 4.0 ~ 6.0에서는 활성이 90%이상 감소하여 산성조건 하에서 활성이 상당히 불안정한 것으로 나타났으며, pH 9.0에서도 활성이 30% 감소하였다. 이는 *Shpingomonas*속의 균주들의 최적 성장 조건이 pH에서는 6.5 - 8.5 부근으로 중성영역에서 성장속도가 빠른 특성에 기인하는 것으로 판단되며, 이후의 최적 배지조성을 결정하기 위한 실험에서는 배지의 pH를 7.0으

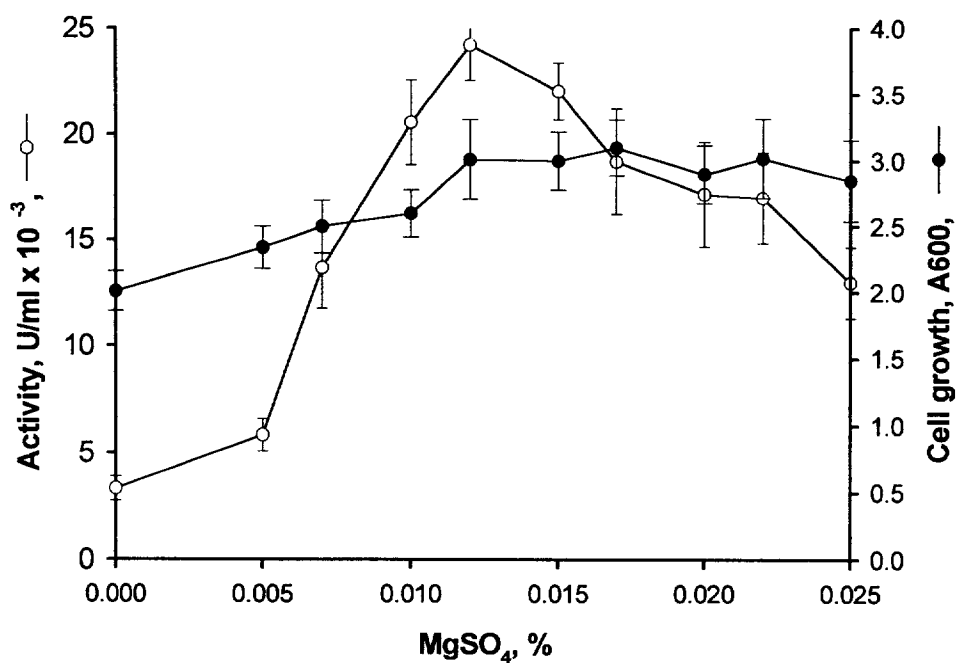


Fig. 11. Effect of MgSO₄ in cell mass and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Medium composition : tryptone, 14g/L; Glucose, 2.5g/L; K₂HPO₄, 1.5g/L; NaCl, 25 g/L
MnSO₄, 0.01mM; FeSO₄, 0.01mM.

Culture condition : Culture Temp., 30°C; Agitation, 350rpm;

Aeration, 1v.v.m.; Medium pH, 7.0; Culture volume, 8L

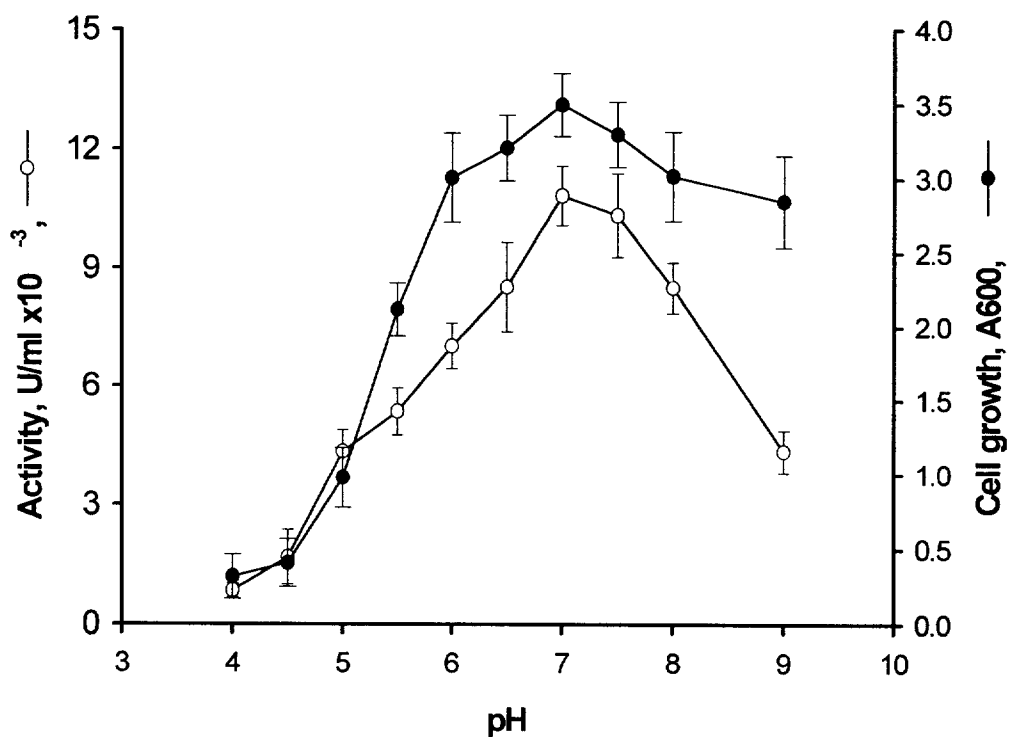


Fig. 12. Effect of initial medium pH on cell growth and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Medium composition : tryptone, 14g/L; Glucose, 2.5g/L; K₂HPO₄, 1.5g/L; NaCl, 25 g/L

MgSO₄, 0.12g/L; MnSO₄, 0.01mM; FeSO₄, 0.01mM.

Culture condition : Culture Temp., 30°C; Agitation, 350rpm;

Aeration, 1v.v.m.; Medium pH, 7.0; Culture volume, 8L

로 고정하였다. 또한, 배양온도를 25℃에서 40℃까지의 온도범위 (25, 30, 35 및 40)에서 배양한 다음, 3일 동안 배양 후 효소활성을 측정하여 효소 생산의 최적 온도를 결정하였다. 그 결과, arylsulfatase 생산균주는 30℃에서 최적 배양 온도로 확인되었으며, 이미 확립된 배양조건에서 각각 배양시간을 24시간에서 192시간 (8일간)까지 배양한 후 원심분리 (2,500xg, 30 min) 하여 수집된 균체를 파쇄하여 얻은 상층액으로 효소활성을 측정한 결과 배양 36시간까지 균체증식속도가 증가한 후 이후 거의 일정 하였다. 효소의 생산은 38시간 이후 급격히 상승하여 48시간에 정점을 보인 후 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig. 13).

3. Arylsulfatase의 부분 정제

3-1. 대량배양

이상의 결과를 바탕으로 효소생산성을 향상시킬 수 있는 배지조성은 trypton, 14.0g/ℓ; Glucose 2.5g/ℓ; K₂HPO₄ 1.5g/ℓ; NaCl 25g/ℓ; MgSO₄, 0.12g/ℓ 으로 확립하였다. 이러한 결과를 바탕으로 대량 배양 (배지 부피; 50 ℓ)을 시도하였다. 이때의 배지 조성은 위 실험 결과를 따랐으며, 배양조건으로는 교반속도를 350rpm으로 고정하고, 배지의 pH는 7.0로 자동으로 조정되게 하였고, 통기량은 1v.v.m.으로 공급하였다. 그 결과, 배양 36시간까지 균체 증식속도가 증가한 후 이후 거의 일정하였으며, 효소의 생산은 38시간 이후 급격히 상승하여 48시간에 정점을 보인 후 감소하는 경향을 나타내는 것으로 일치하였다.

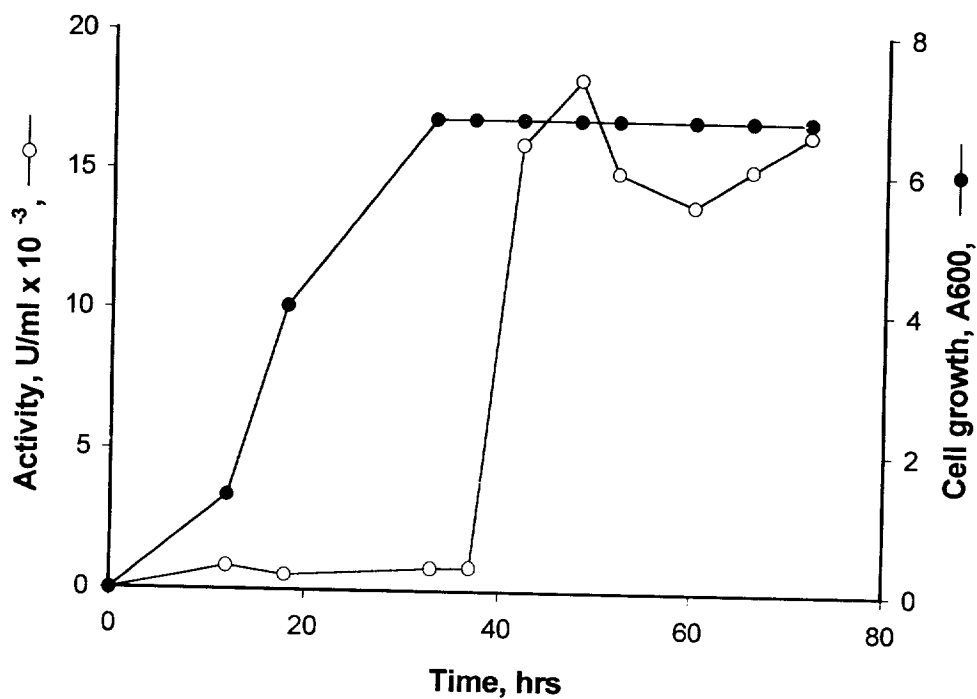


Fig. 13. Changes in cell mass and arylsulfatase activity of *Sphingomonas* sp. nov.

Medium composition : tryptone, 14g/L; Glucose, 2.5g/L; K₂HPO₄, 1.5g/L; NaCl, 25 g/L
MgSO₄, 0.12g/L; MnSO₄, 0.01mM; FeSO₄, 0.01mM.

Culture condition : Culture Temp., 30°C; Agitation, 350rpm;

Aeration, 1v.v.m.; Medium pH, 7.0; Culture volume, 8L

3-2. Ion-chromatography를 이용한 조효소 분리

Ion-chromatography 방법은 protein mixture가 solid matrix를 통과하며 matrix와의 interaction 정도에 따라 분리하는 방법으로 이온교환수지가 충전된 column을 통과시키면, 고정상과 반대되는 이온들은 고정상의 functional group주위에 머무르게 되며 이온 교환을 하게 된다. 아미노산 또는 단백질같이 잠재적으로 음이온과 양이온기를 가지는 분자에서는 pH의 변화가 극성 변화의 정도에 따라 순전하를 어느 정도 변화시킬 수 있으며, 이온들간의 이온교환평형 속도는 서로 다르므로 교환체에 대한 서로 다른 친화력과 염 농도의 적절한 선택으로 원하는 효소를 분리할 수 있다.

arylsulfatase를 분리하기 위하여 먼저, 최적배양조건을 확립하였다. 확립된 효소생산 조건하에서 50 l 발효조를 이용하여 48시간 배양한 결과 균체 400g을 얻었다. 균주에서 arylsulfatase활성이 높은 부분은 예비실험에서 균체내 추출액에서 높았으므로, 회수된 균체 10ml당 100 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) 100 μ l 와 10% Triton-X 100 용액을 100 μ l이 포함된 균체의 2배량의 0.02M Tris-HCl (pH 7.0)로 현탁 시킨 다음 37°C에서 2시간 반응 시켰다. 이 반응액을 초음파 파쇄기로 균체를 파쇄한 후, 원심분리 (10,000 $\times$ g, 20min)한 결과 120ml의 1차 조효소액을 얻었다. 1차 조효소액을 20mM Tris-HCl, (pH 7.0)완충액으로 평형화된 Q-sepharose (음이온 교환수지)column (2 $\times$ 15cm)에 단백질을 흡착시켰다. 칼럼에 흡착되지 않은 단백질을 완충액으로 씻어 제거한 후, 흡착된 효소를 0.1-0.5M NaCl을 함유하는 동일 완충용액 (400ml)으로 직선농도구배법으로 용출시켜 단백질을 분리한 결과, 0.3 - 0.4M NaCl 농도대에서 arylsulfatase활성이 있는 획분이 분리되었다 (Fig. 14). 분리된 획분을 모

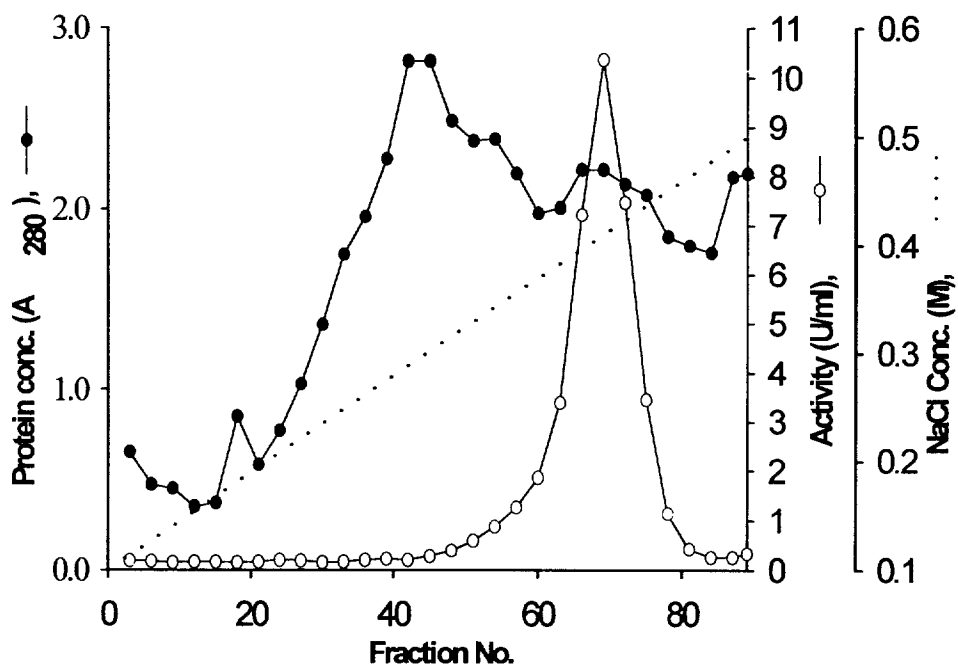


Fig. 14. Q-sepharose chromatogram of the crude extract from *Sphingomonas* sp. nov.

Flow rate was 120 ml/hr and the fraction volume was 5 ml/tube. The arylsulfatase was eluted with a linear gradient of 0.1 – 0.5M NaCl in 0.02M Tris-HCl buffer (pH 7.0). The protein concentration was measured at 280nm after 150 μ l of each fraction was diluted by 10 times with the same buffer.

아 2.0M ammonium sulfate 용액을 동량 가하여 최종농도를 1.0M로 조정하였다. 이 효소용액은 20mM Tris-HCl (pH 7.0)에 1M A.S.가 함유된 완충액으로 평형화된 phenyl-sepharose (소수성교환수지)column (2×15cm)에 적용되었다. 효소는 1.0M - 0.0M A.S.을 함유하는 동일완충용액 (300ml)으로 직선농도구배법을 이용하여 용출시켰다. 그 결과 arylsulfatase는 황산암모늄의 농도가 거의 0.0M에 가까운 획분에서 분리되었다 (Fig. 15.). 분리된 획분을 모아서 arylsulfatase 효소 활성을 측정한 결과 활성이 확인되었으며, 이 활성이 높은 효소를 실험의 조효소로 사용하였다.

3-3. SDS-PAGE

Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)의 SDS는 음극전하를 띤 세제로서 단백질과 결합하여 강한 음전하(-)를 지닌 SDS-protein 복합체를 형성한다. 복합체의 모양은 일정하여 전기영동시 단백질 본래의 전하를 제거시켜 주기 때문에 protein의 분리가 가능하다. SDS-PAGE 완충용액 system은 gel과 완충액의 pH가 동일하거나 (continuous system), 완충액과 gel의 pH가 다른 (discontinuous system)인 완충액을 사용하는 방법이 있다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 system은 두 방법을 혼합하여 개량한 Laemmli (1970)방법으로, 이 방법은 stacking gel, separating gel 완충용액과 reservoir 완충용액이 모두 다르며, 2.7%C의 bis를 사용한다. 이 방법에 의해 protein이 stacking 겔에서 농축되고 resolving gel에서 분리된다. 효소의 부분정제의 정도를 알기 위해 각 단계마다 Laemmli (1970)의 방법에 따라 SDS-PAGE로 측정하였다. 15% gel에 표준단백질

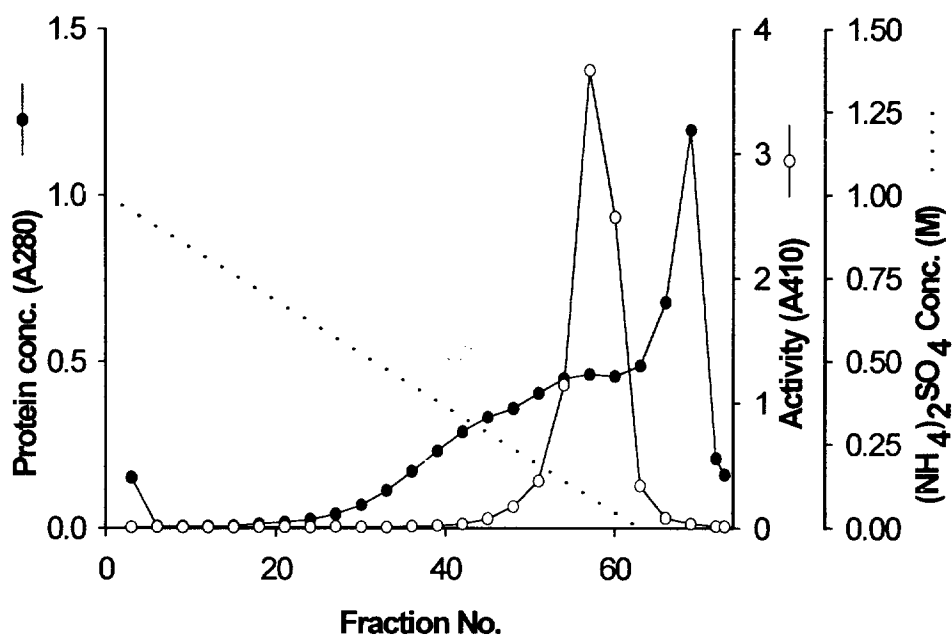


Fig. 15. Phenyl-sepharose chromatogram of active Q-sepharose fractions

The flow rate was 60 ml/hr and the volume of each fraction was 5 ml/tube. The arylsulfatase was eluted with a linear gradient of 1.0 – 0 M (NH₄)₂SO₄ in 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.0. The protein concentration was measured at 280nm after 150 μ l of each fraction was diluted by 10 times with the same buffer.

과 SDS화 시킨 시료를 같이 주입하여 150V에서 2시간 통전시킨 후 coomassie brilliant blue R-250을 사용해 염색하고 M-OH : isoprophyl alcohol : 증류수 (1:1:8)혼합액으로 탈색시켜 표준단백질과 효소의 이동도를 비교하여 효소 부분 정제시 순도의 판정자료로 삼은 결과, 효소의 정제단계가 진행됨에 따라 염색되어 나타나는 band의 범위가 좁아졌다. 이것은 대부분의 혼재되어 있던 단백질이 제거되었음을 나타내며, 즉, 정제의 순도가 정제단계가 진행됨에 따라 높아졌음을 나타낸다 (Fig. 16., Table 3).

5. Arylsulfatase로 제조된 agarose의 물리화학적 특성

5-1. 황산기와 황산이온

Arylsulfatase로 처리된 한천의 항화합물의 함량과 처리전 한천의 항화합물의 함량을 측정한 결과, 처리후에 황산기가 Fig. 17.에서 나타난 바와 같이 반응시간이 경과함에 따라 반응액중의 황산화합물이 지속적으로 증가한 반면, 한천에 존재하는 황산기 함량은 시간 경과에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 한천중의 황산기는 반응 8시간만에 급격히 감소하였으며 이후 24시간 동안의 반응에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 가수분해 반응으로 반응액중으로 유리된 황산화합물의 양과 일치하는 것을 보여주고 있다. 이것은 효소처리로 인해 한천의 구성성분인 agarpectin의 분자 중에 있는 황산기가 유리된 상태로 존재하지 않고 무기질 등과 결합한 상태로 존재하는 것들이 분해됨으로 처리된 한천 효소처리에 의하여 겔강도는 1.6배 증가하였으며, 한천중의 황산기 함량은 93% ($p<0.01$) 가량이 감소되는 우수한 결과를 나타내었다.

황산기는 친수성이 강하기 때문에 한천 분자중에 황산기 함량이 많

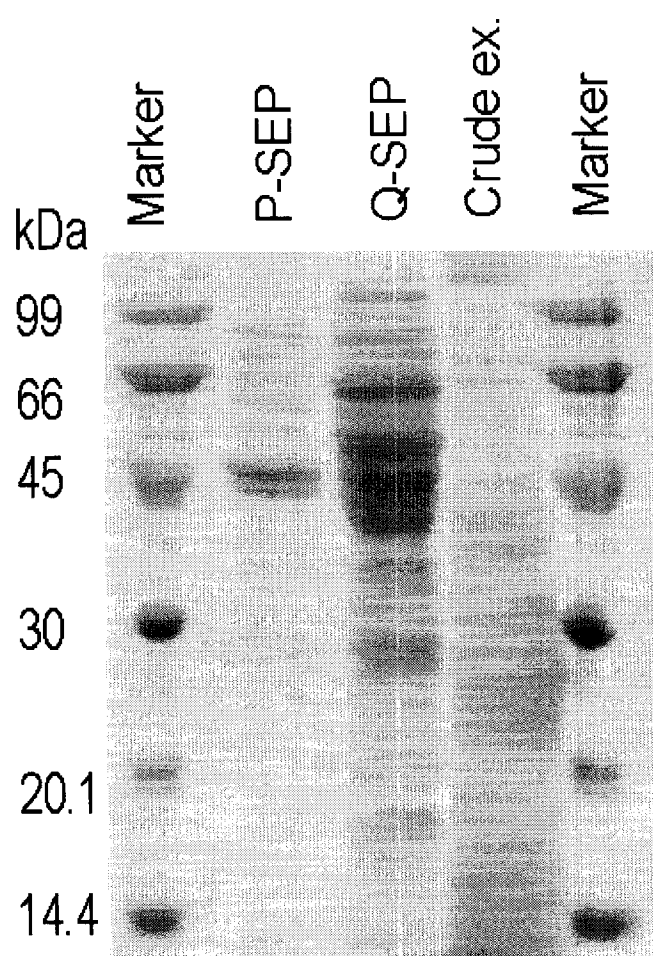


Fig. 16. SDS-PAGE of the proteins during partial purification steps.

Table 3. Purification of arylsulfatase from *Sphingomonas* sp. nov.

Fraction	Volume (ml)	Protein conc. (mg/ml)	Activity (U/ml)	Specific activity (U/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Cell homogenate	2600	3.860	0.0158	0.0041	1	100
Q-Sep	102	1.03	0.041	0.072	18	45.9
Phenyl-Sep	19	0.234	0.13	0.576	140	32.2

Arylsulfatase activities were determined at 45°C and at pH 7.0.

으면, 용해성이 증가하여 gel화능을 떨어뜨린다. 勝浦 등은 황산기 함량이 낮을수록 한천중의 agarose함량이 높아진다는 보고와 일치한다 (勝浦 *et al.*, 1956; Tagawa, 1969). 또한, Tagawa (1969)는 model실험을 통하여 agarose와 agaropetin의 조성비의 차이가 한천의 물성에 크게 영향을 미친다고 보고하였다.

5-2. Gel strength

Arylsulfatase로 처리된 한천을 1.0% 농도 일 때의 겔 강도를 측정한 결과, 효소처리전의 한천보다 처리 후에 약 1.6배의 높은 강도를 나타내었으며, 이것은 시판되는 상업용 agarose의 강도와 비교했을 때, 다소 낮았다.

표 4에서 살펴볼 수 있듯이 소량의 효소처리로써 상당히 높은 강도를 나타내었다 (Table 4.). 일반적으로, 황산기가 많으면, 겔의 형성능이 떨어지고 겔 강도와 3,6-anhydrogalactose비율이 낮다 (Duckworth and Yaphe, 1971). 이는 황산기가 L-galactose-6-sulfate형태로 존재하다가 환경적 요인에 의해 3,6-anhydrogalactose로 전환되기 때문인 것으로 보고되고 있다 (Duckworth *et al.*, 1971; Nelson *et al.*, 1983; Craigie and Leigh, 1978).

5-3. Viscosity

효소 처리된 한천과 처리전 한천의 점도는 시료를 각각 0.5%와 1% 농도로 조제하여 65℃와 80℃에서 B type viscometer (Model BM, POKIMEC. Japan)로써 60rpm의 spindle 속도로서 측정하였다. 1.0% 농도 일 때, 80℃에서 겔 형성시 용액 상태의 점도가 처리 전에 비해 효소처리후의 시료에서 상당히 감소됨을 알 수 있었다 (Table 4.)

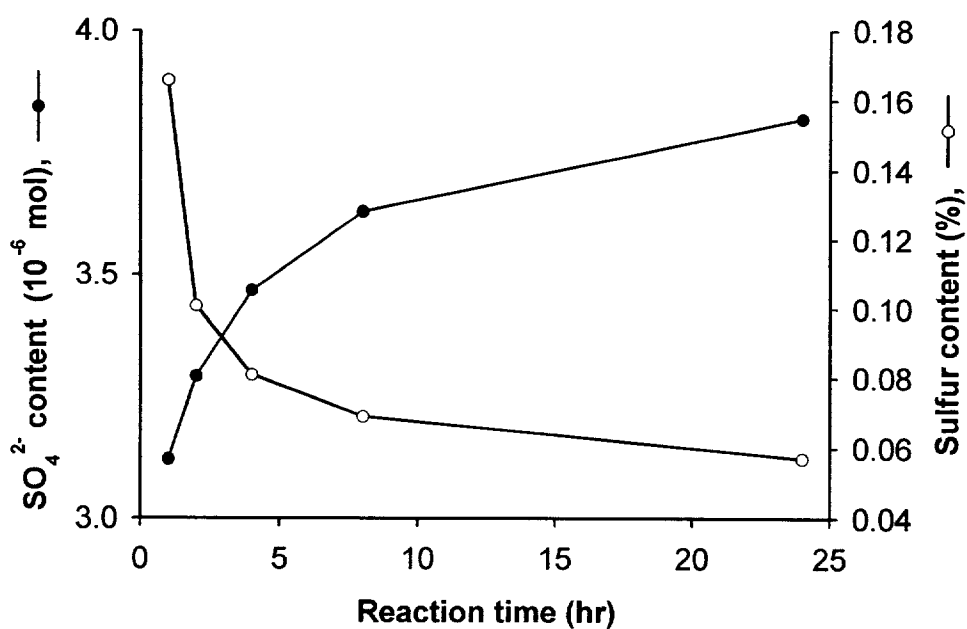


Fig. 17. Change in sulfate and sulfur contents of samples from the enzyme reaction mixture during agarose preparation.

10 U of the arylsulfatase used for 1 kg of agar. The reaction samples were taken from the mixture according to the time course and centrifuged. Sulfate content in the supernatant was measured through Barium precipitation method and sulfur content in the produced agarose was elucidated by CHNS analyzer.

5-4. Melting point 및 Gelling temperature

gel을 형성하는 특성을 가진 한천의 물성에 따른 품질 평가시 주로 gel상태일 때 와 sol상태일 때로 나누어 평가하고 있다. 본 실험방법에 따라 처리된 한천을 1.0%농도일 때의 gel형성시 용액 상태의 Melting point 와 Gelling temperature를 측정한 결과, 처리전의 경우 40℃였고, 효소처리 후에는 34℃였는데, 시판되고 있는 agarose의 경우와 유사하였다 (Table 4).

5-5. Syneresis ratio, Turbidity, EEO (Electrodosmosis)

한천을 효소처리전과 처리후, 한천의 이수율 (Syneresis ratio)은 각각 2.24 %, 2.11 %로 감소하여 바람직한 결과를 나타내었다.

탁도 (Turbidity)를 측정한 결과는 sol상태 일 때는 각각 0.163과 0.304였으며, gel상태 일 때는 각각 0.506, 0.419였다. 한천 용액을 380 ~ 780nm 사이에서 흡수 스펙트럼을 조사하면 파장이 길수록 빛의 투과도는 높아지며, 한천의 농도가 높아질수록 투과도는 감소하고 이러한 현상은 대부분의 한천에 적용되고 한천의 투명도는 sol상태일 때는 일정하지만 완전한 gel이 될 때 그 투명도가 급격히 떨어진다. 이러한 차이는 한천 중에 혼입되어 있는 불순물의 함량이 많을수록 그 범위가 커지고, 또한 불순물 입자의 크기, 수 또는 형태에 따라 달라진다고 보고되고 있다 (Lim and Okazaki, 1970). 한천 조성에 있어서 황산기는 한천의 생합성의 전구체로 알려져 있는 L-galactose-6-sulfate로 결합되어져 있다. 이러한 전구체들은 효소 (Rees, 1961a) 또는 알칼리 (Rees, 1961b)처리에 의하여 황산기가 제거되어 3,6-anhydro-D-galactose 형태로 전환된다. 이러한 결과 상대적으로 agarose 함량이 높아 겔 강도가 상승하고, agarpectin이 감소하여 황산기함량이 줄어들고, 이수율 및 점도도 떨어

Table 4. Physical and chemical properties of agarose prepared with arylsulfatase from *Sphingomonas* sp.

		Control	Enzyme-treated agarose (10 Unit/kg)	Commercial
Gel strength (g/cm ²)		148 ±2	236 ±2	358 ±3
Sulfate (%)		3.80 ±0.012	0.28 ±0.002	0.19 ±0.001
EEO (-mr)		0.79 ±0.006	0.13 ±0.005	0.12 ±0.006
Viscosity (cp)*	65°C	45.0	38.0	33.0
	80°C	45.0	18.0	
Gelling Temp. (°C)		40 ±2	34 ±1	35 ±1
Synergists ratio (%)		2.24	2.11	—
Turbidity* (OD at 600 nm)	Sol	0.163	0.304	0.061
	Gel	0.506	0.419	0.238
Yield (%)		100	76.2 ±3	—

Enzyme reaction was performed at 45°C for 4 hr. The reaction mixture was composed of 1 kg of agar powder, 5 volume of Tris-HCl buffer (pH 7.0) and indicated Unit of enzyme solution. *Data were mean of triplicate.

진다 (Table 4.).

EEO는 agarose내에 황산기 또는 pyruvate 잔기의 수를 측정하는 방법으로 음전하를 띄는 물질이 agarose 겔에 존재함으로써 DNA와 같은 물질의 전기이동을 방해한다. 즉, 음이온과 결합된 agarose로 전기영동할 때, 전자장내에서는 agaroses와 결합된 음이온과 결합할 수 있는 양이온이 양(+)극으로 이동한다. 물분자는 음이온을 당기므로 DNA와 같은 음이온을 가진 분자는 이동하지 못하게 된다. 따라서 EEO의 측정은 agarose의 순도를 나타내는 지표가 되며, 이러한 EEO의 측정은 중성인 dextran과 albumin을 동시에 전기영동하여 측정한다. 실험 결과 EEO는 0.79에서 효소 처리후 0.13으로 agaropectin의 sulfate가 효과적으로 제거되었음을 나타내었다 (Table 4.).

이상의 결과에서, 100 U의 arylsulfatase로 처리된 한천의 겔강도, 황산기 함량, 겔화 온도 및 물리·화학적인 특성은 시판되는 DNA 전기영동용 agarose와 유사한 품질특성을 나타내었으며, 특히 황산기함량은 상용제품보다 훨씬 낮은 것으로 나타났다. 특이할 만한 결과는 기존의 유기용매에 의한 agarose의 분리시 수율이 25 - 30% 정도이나, 본 효소반응에 의해서 agarose생산시 수율은 약 75%로 나타났으며, 이는 산업적인 agarose제도시 제조원가를 현격하게 절감할 수 있을 것으로 평가된다.

5-6. DNA 분리능

전기영동은 하전을 띤 단백질 분자가 전기장에서 양극 또는 음극으로 이동하는 현상을 말한다. 이때 단백질의 이동속도는 분자의 전하량, 크기와 모양, 용액의 pH, 지지체의 종류 등 많은 요인에 의해 영향을 받는데, 실험적인 전기영동에 있어서 단백질의 분리는 단백질의 하전과

전기영동 겔의 농도에 의해 좌우된다. 본 실험방법에 따라 arylsulfatase로 처리된 한천 gel을 만들어 1kb DNA ladder를 agarose의 농도가 0.8% gel에서 5 volt/(gel세로길이cm)의 전압으로 전기영동 후 DNA band의 형태를 관찰하여 agarose의 품질을 평가하였다. 이때 사용된 agarose의 대조군으로 FMC (FMC Co. LTD., USA)와 Ammesco (Atmesco Co. LTD. USA) agarose를 사용하였다. 그 결과, 시판되는 DNA 전기영동용 agarose (COM.A and COM.B)와 DNA 분리능에 있어서 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 19). 오히려 본 효소로 제조된 agarose (ENZYME)는 시판되는 DNA 전기영동용 agarose보다 tailing 현상 및 DNA band의 퍼지는 현상이 줄어드는 것을 확인할 수 있으며, DNA 분리능에 있어서 뛰어난 것으로 평가되었다.

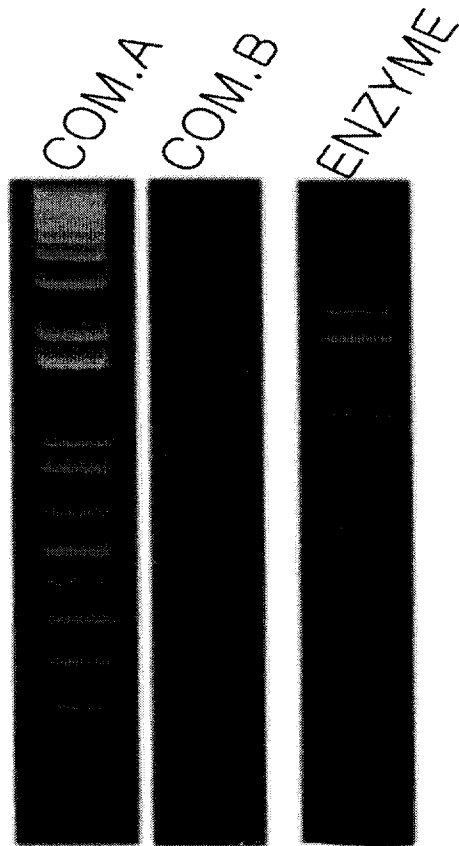


Fig. 19. DNA electrophoresis on gels from commercial agaroses and the agarose produced by the enzymatic method.

The gel from enzymatically produced agarose (ENZYME) shows a better resolution for DNA than those from commercial ones (COM.A and COM.B).

IV. 요약

홍조류의 세포벽을 이루는 구성 다당류로서, 중성인 agarose와 산성인 agarpectin의 복합다당류인 한천은 $\alpha(1-4)$ -3,6-anhydro-D-galactose 와 $\beta(1-3)$ -D-galactose가 교차 결합한 골격을 가지며 약 6%의 황산기가 ester결합을 이루고 있다. 이 복합다당류에 미생물이 생산하는 효소를 작용시켜 agarose를 생산하기 위해 해수로부터 한천 agarpectin의 sulfate분해능이 강한 미생물을 분리하였고, 분리된 미생물의 성장특성을 밝혔다. 최적성장조건에서 균주를 배양하고 배양된 균체로부터 균체내 효소를 이용하여 한천 agarpectin의 sulfate에 적용시켜 그 분해를 시도하였으며, 이 분해산물의 변화된 물리적인 특성을 실험하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 해수에서 Arylsulfatase활성이 있는 균주를 검색, 선별하여 Arylsulfatase 활성이 강한 균주를 분리하여 생명공학연구소에 의뢰하여 동정하였다. 이 균주는 16S rRNA 분석결과 *Sphingomonas xenophaga*와 96.35%의 상동성을 나타내었으나, 이결과는 97%의 상동성을 요구하는 균분류학상의 합의에 미치지 못하였으므로 *Sphingomonas* sp. nov.로 판명되었으며, 신종으로 밝혀졌다.

2. 분리한 균주로부터 arylsulfatase를 생산하는 조건을 검색한 결과 배지의 pH를 7.0으로 고정하고, 질소원으로 trypton 1.4 %, 탄소원으로 glucose 0.25 %를 첨가하였을 때 효소생산량이 최고에 달했다. 이외의 배지조성은 potassium phosphate, sodium chloride 및 magnesium sulfate가 각각 0.15%, 2.5% 및 0.012%였다. 배양조건으로는 pH 7.0, 배양온도 30℃, 배양시간 48hr, 교반 속도 350rpm, 통기량 1v.v.m이었을 때 최적으로 나타났다.

3. *Sphingomonas* sp. nov. 균주에서 생산되는 arylsulfatase를 조효소로써 한천 agaropectin의 sulfate분해에 이용하였으며, 그 물리적 특성은 $1:10^5$ 의 질량비로 한천과 이 효소를 45°C 에서 2시간동안 반응시킨 결과, 생성된 agarose의 겔 강도는 1.6배 증가했으며, 존재하는 황산기는 93% ($p<0.01$)가 제거되었다. 또한 이 효소를 이용하여 만들어진 agarose겔은 DNA 전기영동시의 분리능에서 시판되는 agarose로 만든 겔과 비교할 만큼 우수하였다.

이상의 결과에서 해수로부터 arylsulfatase를 다량 생산하는 균주 (*Sphingomonas* sp. nov.)의 발견과 한천 agaropectin의 sulfate에 arylsulfatase를 적용시켜 agarose형태의 분해 산물을 생산하고, 그것의 변화된 물리적인 특성을 실험한 것은 상당히 의의가 있는 연구였다고 생각된다.

V.참 고 문 헌

- Amott, S. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.*, 90, 269-284.
- Araki T., M. Hayakawa, Z Lu., S. Karita, and T. Morishita. 1998. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium *Vibrio* sp. PO-303. *J. Marine Biotechnol.* 6:260-265.
- Asare, S.O. 1980. Seasonal changes in sulfate and 3,6-anhydrogalactose content of phycocolloids from two red algae. *Bot. Mar.*, 23, 595-598.
- Barbeyron T, Potin P, Richard C, Collin O, Kloareg B. 1995. Arylsulfatase from *Alteromonas carrageenovora*. *Microbiology.* 141:2897-2904.
- Beil S, Kehrli H, Peter J, Staudenmann W, Cook AM, Leisinger T, Kertesz
- Bond C.S., P.R. Clements, S.J. Ashby, C.A. Collyer, S.J. Harrop, J.J. Hopwood, and J.M. Guss. 1997. Structure of human lysosomal sulfatase, *Structure* (Lond) 5:277-289.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Chandrasekaran, M. 1997. Industrial enzymes from marine microorganisms: The Indian scenario. *J. Mar. Biotechnol.* 5, 86-89.
- Colwell, R.R. 1993. "World Bank Discussion Papers," ed. R.A. Zilinskas and C.G. Lundin, Vol 210, pp. ix-x, World Bank Press, Washington D.C.
- Craigie, J.S. 1990. In *Biology of the red algae* (Cole, K.M., and Sheath, R.G., ed.) Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 221-257.
- Craigie, J.S. and C. Leigh 1978 Carrageenans and agars. In *Handbook of phycological methods and biochemical methods* (Hellebust, J.A. and Craigie, J.S. ed.) Cambridge Univ. Press, Cambridge. pp. 109-132
- DeHostos EL, Togasaki RK, Grossman A. 1988. Purification and biosynthesis

- of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* 106:29-38.
- Delisle G, Milazzo FH. 1970. The isolation of arylsulphatase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta.* 212:505-508.
- deVries, D.J. and Beart, P.M. 1995. Fishing for drugs from the sea: Status and strategies. *Trends Pharmacol. Sci.* 16, 275-279.
- Dhevendaran, K. 1984. Arylsulfatase in marine polychaetes. *Fish Technol.* 21, 57-61.
- Dhevendaran, K. and K. Maya. 1998. Arylsulfatase in fish and shellfish of veli lake, South India. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 71-75.
- Dhevendaran K, T. Kannupandi, and R. Natarajan. 1980. Arylsulfatase activity in marine gastropods. *Mahasagar* 13, 173-178
- Do, J.R. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish. Soc.*, 30(3), 423-427 (in Korean).
- Do, J.R., Y.J. Nam, J.H. Park and J.H. Jo. 1997. Studies on chemical composition of red algae. *J. Korean Fish. Soc.*, 30(3), 428-431 (in Korean).
- Dodgson, K.S. and R.G. Price. 1962. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *Biochem. J.*, 84, 106-110.
- Duckworth, M. and W. Yaphe. 1971. The structure of agar. Part I. Fractionation of complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.*, 16, 189-197.
- Duckworth, M., K.C. Hong, and W. Yaphe. 1971. The agar polysaccharides of *Gracilaria* species. *Carbohydr. Res.*, 18, 1-9.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP(Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fitzgerald JW, Cline ME. 1977. The occurrence of an inducible arylsulphatase in *Comamonas terrigena*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2:221-224.

- Gran, H. H. 1902. Studien über Meeresbakterien. II. Über die Hydrolyse des Agar-Agar durch ein neues Enzym, die Gelase Bergebs Museum Aarbog No. 2; 1-16
- Goresline, H. 1933. Studies on agar-digesting bacteria. *J. bacteriol.* 26; 435-457.
- Hayashi K. and A. Okazaki. 1970. Agar handbook. Korin publishing, Japan. pp. 227-286, 495 (in Japanese)
- Henderson MJ, Milazzo FH. 1979. Arylsulfatase in *Salmonella typhimurium*: detection and influence of carbon source and tyramine on its synthesis. *J. Bacteriol.* 139:80-87.
- Hoshi M, Moriya T. 1980. Arylsulfatase of sea-urchin sperm. 2. Arylsulfatase as a lysin of sea-urchins. *Dev. Biol.* 74:343-350.
- Humm, H. J. 1946. Marine agar-digesting bacteria of the South Atlantic Coast. *Bull. Duke Univ. Mar. Sta.* 3; 45-75.
- Hunt J. 1980. Determination of total sulphur in small amounts of plant material. *Analyst.* Jan;105(1246):83-5.
- Jol, C.A., T.G. Neiss, B. Penninkhof, B. Rudolph, and G.A.D. Ruiter. 1999. Novel high-performance anion-exchange chromatographic method for the analysis of carrageenans and agars containing 3,6-anhydrogalactose. *Anal. Biochem.*, 268, 213-222.
- Joo, D.S., H.M. Song, J.S. Lee, S.Y. Cho, E.H. Lee, 1998. Characterization and Purification of Agatase from *Cytophaga* sp. ACLJ-18. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13(3), 320-324. (in Korean).
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In *Mammalian protein metabolism*, pp. 21-132. Edited by H. N. Munro. New York: Academic Press.
- Kertesz MA. 1999. Riding the sulfur cycle-metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 24:135-175.
- Kim, D.S., D.S. Lee, D.M. Cho, H.R. Kim and J.H. Pyeun. 1995. Trace components and functional saccharides in marine algae 2. Dietary fiber

- contents and distribution of the algal polysaccharides. *J. Korean Fish. Soc.*, 28 (3), 270-278 (in Korean).
- Korean Fisheries Society. 1998. Annual Statistics of Fisheries, Ministry of Maritime Affairs and Fisheries, Korea (in Korean)
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. 1970, *Nature*, 227, 680-686.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp. 115-175. E.Stackebrandt & M. Goodfellow, eds. Jhon Wiley and Sons: New York.
- Lee, S.R., Cho, H.O., and Park, S.K. 1975. Extraction yield and quality attributes of agar from domestic seaweeds according to various pretreatments. *Korean J. Food Sci. Technol.* 7, 109-114 (in Korean).
- Leon Y.A., R.D. Bulbrook, and E.D.S. Corner. 1960. Steroid sulfatase, arylsulfatase and β -glucuronidase in the Mollusca. *Biochem. J.* 75, 612-617
- Levy, I., S. Beer, and L. Friedlander. 1990. Growth, photosynthesis and agar in wild type strains of *Gracilaria verrucosa* and *G. conferta* (*Gracilariales*, *Rhodophyta*), as a strain selection experiment, *Hydrobiologia*, 204/205, 381-387.
- Lim, K. and A. Okazaki. 1970. In *Agar handbook*. Korin publishing. Japan. pp. 227-286, 495.(in Japanese)
- Luhan, M.R.J. 1992. Agar yield and gel strength of *Gracilaria heteroclada* collected from Iloilo, central Philippines. *Bot. Mar.*, 35, 169-172.
- Mackie W. and R.D. Preston. 1974. Chap. 2 Cell wall and intracellular region polysaccharides. *Algal physiology and biochemistry* (edited by W.D.P. Stewart). Blackwell Scientific Publications Ltd. pp 64-65.
- Matsushashi, T. 1977. Acid pretreatment of agrophytes provides improvement in agar extraction. *J. Food Sci.*, 42, 1396-1400.
- Marzluf GA. 1997. Molecular genetics of sulfur assimilation in filamentous

- fungi and yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 51:73-96.
- Maya, K., K. Dhevendaran, and P. Natarajan. 1990. Arylsulfatase producing bacteria in the gut of *Therapon jarbua*. In *Microbiology in poecilotheims* (ed. R. Lesel). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 203-210.
- Milanesi, A.A. and Bind, J.W.C. 1972. Lysosomal enzymes in aquatic species II. Distribution and particle properties of thermally acclimated muscle lysosomes of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 41, 473-491.
- Murooka Y, Yim MH, Harada T. 1980. Formation and purification of *Serratia marcescens* arylsulfatase. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:812-817.
- Nelson, S.C., S.S. Yang, Y. Wang, and Y.M. Chiang. 1983. Yield and quality of agar from species of *Gracilaria*. *Bot. Mar.*, 26, 331-336.
- Nilson S. and L. Piculell. 1989. Helix-coil transitions of ioni polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 2. Effects salt concentration on the thermal transition. *Macromolecules*, 22, 3011-3023.
- Park, Y.Y., Rhee, C., and Yang, H.C. 1985. Effect of acid treatment on extractability and properties of agar. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17, 319-325 (in Korean).
- Patil, N. B. and N. R. Kale. 1973. A simple procedure for the preparation of agarose for gel electrophoresis. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 10, 160-163.
- Peters, H. 1964. Aurameas, P. Grater: Proceedings of the 11th Coloquium. Bruges, Elservier Publ. Co.
- Piculell, L., S. Nilson and P. Muhrbeck. 1992. Effects of small amounts of kappa-carrageenen on the rheology of aqueous iota-carrageenan. *Carbohydr. Polym.*, 18, 199-205.
- Piculell, L., S. Nilson, C. Viebke and W. Zhang. 1994. Gelation of (some)

- seaweed polysaccharides(In food hydrocolloids: structure, properties, and functions, edited by K. Nishinari and E. Doi). *Plenum press*, New York, 35-44.
- Pickering, T.D., M.E. Cordon, and L.J. Tong. 1990. Seasonal growth, density, reproductive phenology and agar quality of *Garacilaria sordia* (*Garacilariales*, *Rhodophyta*) at Mokomoko inlet, New Zealand, *Hydrobiologia*, 204/205, 253-262.
- Rees, D.A. 1961a. Estimation of the relative amounts of isomeric sulfate esters in some sulphated polysaccharides. *J. Chem. Soc.*, 81, 5168-5171.
- Rees, D.A. 1961b. Enzymatic synthesis of 3,6-anhydrogalactose within porphyran from L-galactose 6-sulfate units. *J. Chem. Soc.*, 81, 347-352.
- Rohas, C., M. Rinaudo and S. Landry. 1990. Role of the molecular weight on the mechanical properties of kappa- carrageenan gels. *Carbohydr. Polym.*, 12, 225-231.
- Rohas, C., M. Rinaudo and S. Landry. 1989. Relation between the molecular structure and mechanical properties of carrageenan gels. *Carbohydr. Polym.*, 10, 115-118.
- Rochelle P. A, Olson BH. 1991 A simple technique for electroelution of DNA from environmental samples. *Biotechniques*. Dec;11(6):724, 726-8.
- Rochelle, P. A., J. C. Fry, R. J. Parkes, and A. J. Weightman. 1992. DNA extraction for 16S rRNA gene analysis to determine genetic diversity in deep sediment communities. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 59-66
- Rudolph, B. 1999. In *The marine and fresh water natural products* (Flick, G.G., and Martine, R.E. ed.) Chapman & Hall, pp. 15-19.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sawabe T., I. Sugimura, M. Ohtsuka, K. Nakano, K. Tajima, Y. Ezura, and R. Christen. 1998. *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginateolytic

- marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:573-580.
- Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K. 1995. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell*. 271-278.
- Speir, T.W. and D.J. Ross. 1978. Soil phosphatase and arylsulfatase. In *Soil enzymes* (ed. R.G. Burns). Academic Press, pp. 198-235.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846-849.
- Tagawa, S. 1969. Chemical studies on manufacture of agar-agar. *Cont. Shiminoseki Univ. Fish.* 17(2), 1-52.
- Ureil, J. 1961. *Ann. Inst. Pasteur* 101, 104.
- Yaphe, W. 1960. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides. *Anal. Chem.*, 32 (10), 1327-1330
- Yoon, H.S. and Park, Y.H. 1984. Studies on the composition of agarose and agaropectin in agar-agar. *Bull. Korean Fish. Soc.* 24, 27-33 (in Korean).
- Waldow A, Schmidt B, Dierks T, von Bulow R, von Figura K. 1999. Amino acid residues forming the active site of arylsulfatase A. *J. Biol. Chem.* 274:12284-12288.
- Zhang, W., L. Piculell and S. Nilsson. 1992. Effects of specific anion binding on the helix-coil transition of lower charged carrageenans. *Macromolecules*, 25, 6165-6173.
- 수산년감. 한국수산업, 1998.
- 林金雄, 1970. 寒天 handbook. 光琳書院, 227-292.
1. 荒木長次, 1962. 日化., 58;1338.

勝浦嘉久次, 1956. 紅藻類粘質物の電解基組成とgel形成能の関係. 工化. 59, 1067-1069

2. 勝浦嘉久次, 布施恒明, 狩野和夫, 1965. 工化., 68;205.

5. 布施恒明, 勝浦嘉久次, 1968. 工化., 71;112.

6. 布施恒明, 勝浦嘉久次, 1967. 工化., 70;724.

7. 布施恒明, 後藤富士興, 1969 農化., 43. 621.