

김 (*Porphyra dentata*) 병반 조직에서 분리한 해양미생물의 특성과 생산된 체외 한천분해효소 특성

박상렬¹ · 조수정 · 김민근 · 임우진 · 류성기 · 안창룡 · 홍수영 · 이영한² · 김범규¹ · 윤한대*

경상대학교 농화학과
¹경상대학교 유전공학연구소, ²경남 농업기술원

Characteristics of a Marine Agarolytic *Pseudomonas* sp. from *Porphyra dentata* (*Bangiales, Rhodophyta*) and Some Properties of its Extracellular Agarase

Sang-Ryeol Park¹, Soo-Jeong Cho, Min-Keun Kim, Woo-Jin Lim, Sung-Kee Ryu, Chang-Long An,
Su-Young Hong, Young-Han Lee², Beom-Kyu Kim¹ and Han-Dae Yun*

Genetic Engineering Institute¹, Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University,
Chinju 660-701, Gyeongnam Agricultural Research and Extension Services, Chinju 660-370², Korea

Abstract

The marine bacterium isolated from *Porphyra dentata* showing green spot rot disease was identified as *Pseudomonas* sp. The strain have CMCase activity, xylanase activity and protease activity as well as agarase activity. But the strain has no pectate lyase activity. *Porphyra dentata* tissue inoculated this isolate was macerated after 1 week incubation. The characteristics of extracellular crude agarase of this isolate were examined, the optimal pH and temperature were pH 7 and 30°C, respectively.

Key words – *Porphyra dentata*, Pathogenicity, *Pseudomonas* sp., Agarase

서 론

한천은 해조다당류로 우리나라에서는 매년 생산량이 3,600톤 정도로 약 50억 원에 해당되는 수산자원이다. 현재 총 생산량의 6.5% 정도가 단순 가공 처리되고 있는 실정이며 앞으로 이들 부존 유용자원을 효과적으로 이용할 수 있는 세균성 한천분해효소 연구가 진행되고 있다[11]. 한편 해양 세균의 응용 연구로 현재 해양 오염을 심각하게 야기하고

있는 녹조 혹은 적조현상의 해결 대책으로 선택성이 있는 유용한 해양 세균을 분리하여 생물학적 방법으로 해조류 피해를 방지하려는 연구가 진행되고 있다[5,7]. 이들의 연구 전략은 해조류의 세포벽 성분을 공격하여 이들의 증식을 억제하는 것이다.

해조류의 세포벽에 존재하는 다당류인 한천은 해양환경에서 세균에 의해 분해될 수 있다. 분리 보고된 세균 속으로 *Alteromonas*[10,15], *Cytophaga*[19], *Streptomyces*[16], *Vibrio*[17] 및 *Pseudomonas*속[8]이 있다. 한천의 분해는 절단효소의 특이성에 따라 2가지 기작에 의해 이루어진다. 첫 번째는 *Pseudoalteromonas atlantica*가 생성하는 체외효소인 β -

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : (055) 751-5469, Fax : (055) 757-0178
E-mail : hdyun@nongae.gsnu.ac.kr

agarase I은 분자량이 큰 agar polymer의 β -(1,4) glycoside linkage에 작용하여 최종 생성물로 neoagarotetraose의 oligosaccharides 혼합물을 생성한다. 이 oligosaccharides는 cell-bound exo β -agarase II에 의해 가수분해되어 neoagarobiose로 분해된 후 cytoplasm에서 neoagarobiose hydrolase [2]에 의해 3,6-anhydro-L-galactose와 galactose로 가수분해된다. 두 번째 분해 기작으로 체외 효소인 α -agarase가 α -(1,3) linkage를 절단하여 비환원 말단에 D-galactose를 함유한 agarobiose series oligosaccharide를 생성한다 [21]. 몇몇 세균 속으로부터 분리된 체외분비 β -agarase에 대한 생화학적 연구결과 분자량, 기질 특이성, 활성부위 등의 관점에서 다양한 특성을 가지는 것으로 보고되었다 [18].

현재 시판되고 있는 김은 대부분 양식 산으로 한국, 일본, 중국 등 아시아에서 식용으로 널리 이용되고 있으며 한국에서는 해조류의 양식 품종 중에서 가장 많은 소득을 올리고 있다. 김 양식은 수온 등의 환경변화와 병원성 미생물로 인해 그 피해가 아주 크며, 특히, 병원성 미생물에 의한 피해는 제품의 가치 하락과 더불어 이를 억제시키기 위하여 사용하는 붉은 염산 등으로 인하여 해양환경 오염을 야기하고 있다. 미생물에 의한 김의 질병은 *Phytium* 균에 의해 발생하는 붉은 갯병, 조균류인 *Olpidiposis*에 의한 아상균병 및 세균에 의해 발생하는 녹반병 등이 있다 [1]. 그 중 녹반병은 김의 엽에 녹색의 원형 또는 반원형을 형성하고 점차 엽이 유실되어 상품성을 떨어뜨리는 요인이 된다.

본 연구에서는 해조류에 부착하여 이들의 세포조직을 분해하는 해양 세균에 대한 생화학적 접근을 위해 김의 병반 조직에서 세포벽분해 세균을 분리, 동정하고 이 균주의 배양조건, 생육 상의 특성, 세포벽 분해 효소의 활성을 조사하고 김 조직의 분해과정을 광학 현미경을 이용하여 관찰하였으며 이 균이 분비하는 체외 한천분해효소의 생화학적 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배지

해양 세균은 배지 A (peptone 10 g, yeast extract 1 g, K_2HPO_4 0.1 g, $FeCl_3$ 0.6 mg, sea water 750 ml/l)에 생육시켰으며 한천분해효소 유도배지는 배지 A에 한천을

0.2% 첨가하여 사용하였다.

균의 분리 및 동정

분리균은 병반 조직이 보이는 김에서 분리하였으며 배지 A에 1.5% 한천을 함유한 한천평판배지를 사용하여 20℃에서 배양하였다. 한천평판배지 상에서 한천을 분해하는 정도를 육안으로 관찰하여 순수 분리하였다. 선정균의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성은 Dye방법 [4], 및 Bergey's Manual [9]에 준하였으며 생화학적 특성을 조사하기 위해 API ID 32 GN Kit (bioMerieux, France)를 사용하였다.

병원성 검정 및 광학현미경 조사

공시 균주의 김에 대한 병원성 조사를 위해 고체배지에서 7일간 배양한 세균을 약 10^8 cells/ml 농도가 되도록 현탁하여 표면 살균된 김 조직에 균을 접종하고 20℃에서 배양 후 관찰하였다. 김에서의 침투현상을 관찰하기 위해 분리균을 김에 접종하여 시간 별로 시료를 채취하여 methylene blue 염색으로 관찰하였다.

세포벽분해효소 분리 및 활성 측정

분리균의 세포벽분해효소의 활성 측정은 효소생성 유무가 육안으로 관찰될 수 있는 한천 확산법 (agar diffusion method)을 이용하였다. CMCase 활성은 배지 A에 carboxymethylcellulose를 0.5% 첨가하여 측정하였으며, xylanase 활성은 배지에 0.5% xylan을 기질로, protease 활성은 20% 탈지분유 용액을 최종 농도가 1%가 되게 만들어 사용하였다 [12]. 한천분해효소 분리를 위하여 0.2%의 한천을 첨가한 1 l 배지 A에 분리균 JY38을 접종하여 10^8 cells/ml까지 생육시키면서 한천분해효소 생성을 유도하였다. 이 배양액을 원심 분리한 후 상등액에 황산암모늄을 85% 포화시켜 생성된 침전물을 10 mM citric acid buffer (pH 7)에 녹여 투석막을 사용하여 멸균증류수를 3-4회 교환하면서 투석한 액을 조효소로 사용하였으며, 고체한천 배지 상에서 효소 활성을 확인하고 냉동 건조시켜 냉장고에 보관하면서 필요에 따라 사용하였다. 한천분해효소 활성은 0.1% 한천을 1M-phosphate-citric acid buffer (pH 7)에 녹인 후 이를 기질로 하여 조효소액을 첨가하여 30℃에서 60 분간 반응시킨 후 유리되는 당을 Miller 등의 방법 [14]에 의해 측정하

였다. 최적 pH 및 최적 온도는 각 구간 별 효소활성을 측정하고 최고치를 100으로 하여 상대적인 활성도를 비교하여 구하였다.

결과 및 고찰

균 분리

병반 증상이 있는 김 시료에서 세균을 분리하여 한천고체배지 상에서 한천을 강하게 분해하는 균주를 선별하였다. 분리균주의 병원성 검정을 한 결과 7일 이후부터 김 조직을 와해시키기 시작하였다. 분리균 JY38은 Bergey's Manual에 준하여 동정한 결과 황색 코로니로 그람 염색 결과 음성균이었고, 간균으로 운동성 편모가 관찰되었다. 호기성 균으로 catalase, oxidase 양성으로 나타났으며, urease, indole 반응은 음성이었다. D-arabinose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, α -methyl-D-mannoside, esculine, trehalose, melezitose, β -gentiobiose, D-turanose, L-arabinose, ribose, β -methyl-xyloside, L-sorbose, rhamnose, dulcitol, α -methyl-D-glucoside, arbutine, D-lyxose, D-tagatose, L-arabitol, gluconate와 같은 상당히 광범위한 당을 이용하였으며 alanine, arginine과 같은 아미노산을 이용하였다. 이상의 결과로 분리균 JY38은 *Pseudomonas* sp.의 성질을 가지고 있었으며 정확한 종은 구별되지 않았다.

병원성 검정 및 현미경 관찰

분리균 JY38에 의한 김의 병원성 검정을 위해 표면 살균된 김 조직에 JY38을 접종하여 20°C에서 배양한 후 400 배율의 광학현미경으로 관찰한 결과 Fig. 1A는 접종 1주일 후 관찰한 것으로 JY38 균주에 의해 김조직이 서서히 분해되는 현상을 관찰하였으며 2주일 후에는 김 세포가 완전히 단리되는 현상을 관찰하였다 (Fig. 1B). 이상의 현미경적 관찰을 통하여 분리균 JY38이 분비하는 세포벽분해효소 작용에 의해 김의 와해 현상이 진행되는 것으로 판단되며 분리균 JY38이 분비하는 세포벽분해효소의 조효소액을 이용하여 protoplast 세포를 만들 때 이용함으로써 기존의 세포벽 분해효소를 대체할 수 있을 것으로 생각된다.

세포벽분해효소

한천 확산법에 의하여 JY38에 대한 세포벽분해효소 생성

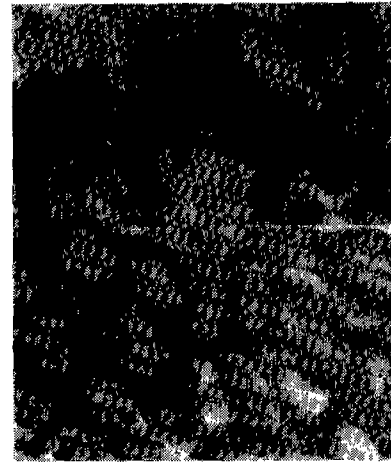


Fig. 1. Pathogenicity test on *Porphyra dentata* by *Pseudomonas* sp. JY38. *Porphyra dentata* tissue was examined under the photomicroscopy. A, an inoculated *Porphyra dentata* tissue by *Pseudomonas* JY38 after 1 week incubation (400X); B, an inoculated *Porphyra dentata* tissue by *Pseudomonas* JY38 after 2 weeks incubation (400X).

을 조사한 결과 Fig. 2의 A는 CMCase 활성, B는 xylanase 활성, C는 agarase 활성, D는 protease 활성을 나타내고 있

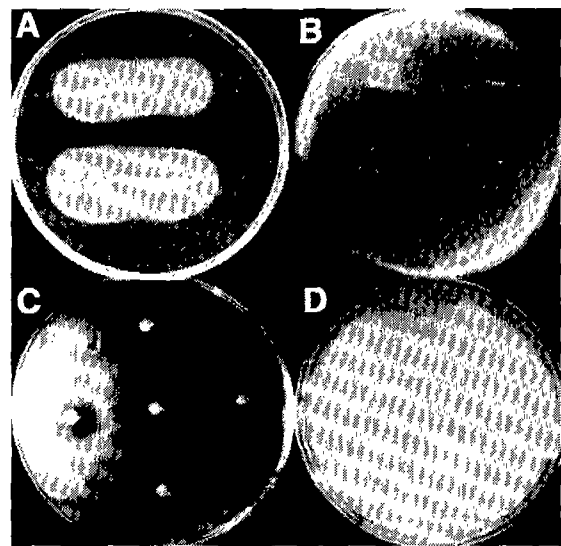


Fig. 2. Detection of cell-wall degrading enzyme from the isolate by agar diffusion method. A, CMCase activity test; B, xylanase activity test; C, agarase activity test; D, protease activity test.

으며 pectate lyase 활성은 관찰되지 않았다. Fig. 3은 1.5% 한천을 완충액에 첨가하고 살균하여 제조한 고체배지에 분리한 조효소액 (5 $\mu\text{g/ml}$)을 처리하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 6시간 반응시킨 결과이다. Fig. 3B의 효소액 처리구는 효소액을 전혀 처리하지 않은 대조구 (Fig. 3A)에 비해 한천이 분해된 현상이 64 배율의 해부 현미경 하에서 뚜렷하게 관찰되었다.

한천분해효소의 효소학적 특성

Fig. 4는 한천을 탄소원으로 한 유도배지에서 분리균의 생육곡선과 한천분해효소 생성을 경시적으로 관찰한 결과이다. 한천분해효소 생성은 분리균의 대수 증식기에 최고로 생성되었다. 이후의 시기에서는 한천분해효소의 증가가

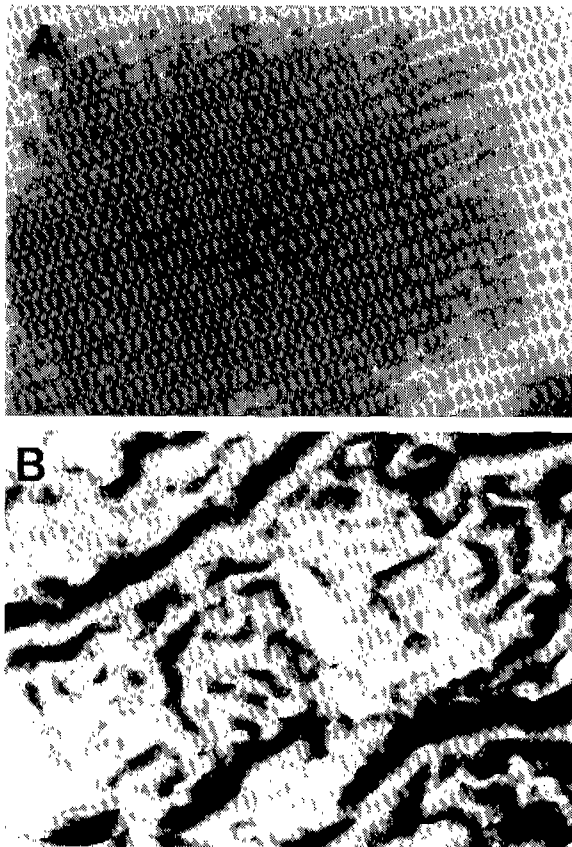


Fig. 3. Examination of agarase activity on the agarose plate under the photomicroscopy (64X). A, untreated agarase on the agarose plate; B, treated agarase of *Pseudomonas* sp. JY38 on the agarose plate. Both plates were incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 6 hours.

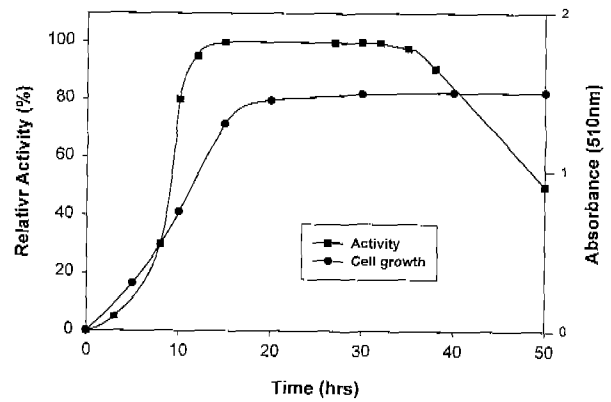


Fig. 4. Change of agarase activity during incubation of *Pseudomonas* sp. JY38. Enzyme activity was assayed at pH 7 and 30 $^{\circ}\text{C}$ for 60 min.

관찰되지 않았는데 이는 배양 중의 단백질 분해효소의 작용으로 한천분해효소가 서서히 분해된 것으로 추측된다. 그리고 한천의 존재 하에서는 glucose와 galactose 같은 단당류를 첨가하여도 효소 생성에는 별로 영향을 미치지 못하였으며 이들 단당류만을 유일한 탄소원으로 첨가하여 배양하였을 때는 한천분해효소가 생성되지 않았다 (자료 미제시). 이들의 결과는 Vera 등[20]이 *Pseudoalteromonas* 속에서 보고한 결과와 유사하였다. 한천분해효소 활성의 특성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. pH에 따른 효소활성은 pH 7 부근에서 최대치를 나타내고 있으며 산성 및 알칼리성 쪽으로 갈수록 효소활성은 낮았다 (Fig. 5A). 이 결과는 *Pseudomonas atlantica* ATCC 19292의 β -agarase 활성과 일치하였다[20]. 온도에 따른 효소 활성은 30 $^{\circ}\text{C}$ 부근에서 최대치를 나타내었다 (Fig. 5B). 반응 시간에 따른 효소 활성을 조사한 결과 반응 초기 30 분 이내에 대부분의 반응이 이루어지며 60분 후에는 반응이 진전되지 못하는 것으로 나타났다 (Fig. 5C). 열 처리별 효소 활성을 조사한 결과 Fig. 5D와 같이 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 효소 활성이 급격하게 실활되는 것을 알 수 있었으며 *Pseudomonas atlantica* ATCC 19292와 *Pseudomonas* sp. PT-5에서 분리된 한천분해효소와 유사한 경향을 나타내었다[20]. 그리고 Fig. 6은 금속성 양이온과 EDTA의 한천분해효소에 대한 활성효과를 나타낸 것으로 Ca^{++} 이온을 첨가하였을 때 활성이 가장 좋았으며 EDTA를 첨가하였을 때 효소활성이 급격하게 실활되었다.

이상의 결과 김의 병반 조직에서 한천가수분해효소의

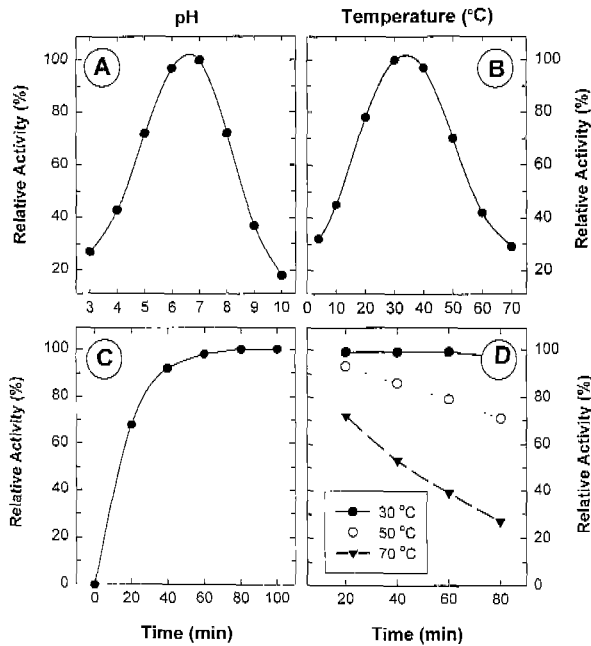


Fig. 5. Effect of pH, temperature, incubation time, and thermostability on agarase activity from *Pseudomonas* sp. JY38. A, the effect of pH on agarase activity. Enzyme activity was assayed at 30°C for 60 min in citric-sodium phosphate buffers with the indicated pH values; B, the effect of temperature on agarase activity. Enzyme activity was assayed at pH 7 for 60 min at the indicated temperatures; C, the effect of incubation time on agarase activity. Enzyme activity was assayed at pH 7 and 30°C for 60 min; D, the effect of thermal stability on agarase activity. Enzyme activity was assayed at pH 7 and 30°C for 60 min.

분비능을 가진 세균을 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas* 속으로 동정되었으며 분리 균은 한천분해효소 뿐만 아니라 세포벽분해효소로 CMCase, xylanase, protease를 분비하였다. 이 중에서 한천분해효소의 생화학적 특성을 조사하였으며 앞으로 이 균을 이용하여 김의 세포융합 과정에서 필요한 protoplast 형성시 분리균이 분비하는 세포벽분해효소의 이용 가능성이 확인되었다.

우리나라는 해조 다당류가 풍부한 수산자원 부국임을 고려할 때 앞으로 이들 부존 유용자원을 효과적으로 이용할 수 있는 연구가 요구되고 있다. 예를 들면 육상동물의 장내 미생물에서는 한천분해효소 능력이 없으므로 해양세균

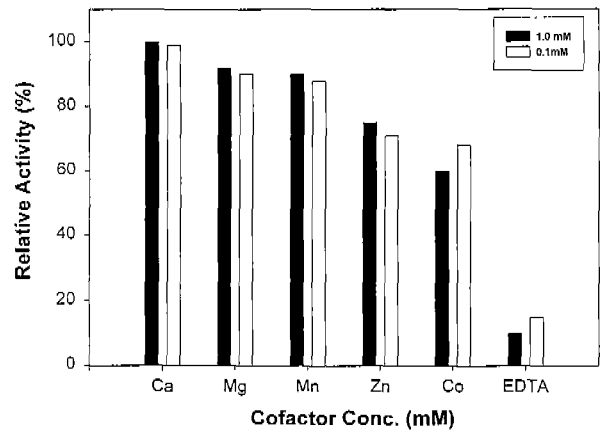


Fig. 6. Effect of cations and EDTA on agarase activity from *Pseudomonas* sp. JY38. Agarase activity was tested by using 0.1 mM and 1.0 mM concentration of their corresponding chloride forms. Enzyme activity was assayed at pH 7 and 30°C for 60 min.

에서 한천분해능이 우수한 균을 선발하여 해조류에 1차로 처리하여 해조류 식사로 원료로서 이용 가능성이 기대된다. 그리고 해양세균과 해조류의 균형 있는 분포비율은 해양 생태계의 정상적 유지를 위한 근원적인 요인이다. 특히 상이한 해조류의 분포 비율을 조절하는 데 해양세균의 역할이 중요한 것으로 인식되어 최근에는 이에 대한 연구를 시작하고 있다[3,6]. 즉, 해양 세균은 해조류에 대한 공격의 선택성이 있다는 것이다. 어떤 세균은 해조류의 포자발아를 촉진하나 어떤 종은 해조류의 포자발아를 억제할 뿐만 아니라 해조류를 분해하여 사멸시킨다[13]. 후자의 경우는 우리나라의 양식산업에 막대한 피해를 주며 심각한 해양오염 문제로 대두되고 있는 녹조나 적조에 대한 생물적 방지 대책의 일환이 될 것으로 기대되며 이에 대한 연구가 촉구된다. 앞으로 분리균이 분비하는 CMCase, xylanase 등의 세포벽분해효소에 대한 특성을 구명하고자 하며 이들의 생화학적 연구 결과 산업적 유용성이 확인되면 이들에 관련된 유전자를 클로닝하고자 한다.

요 약

병 증상이 있는 김 조직에서 해양 세균을 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas* sp.과 유사하였으며 분리균은 CMCase, xylanase, agarase, protease의 체외분비 효소를 가지고 있

었으나 pectate lyase의 활성은 없었다. 김 조직에 접종한 결과 7일 이후부터 김 조직의 분해현상이 관찰되었다. 분리균이 분비하는 체외분비 한천분해효소의 생화학적 특성을 조사한 결과 최적 pH는 7 부근이었으며 최적 활성온도는 30℃이었다.

감사의 글

본 연구는 경상남도 생명공학 기술개발비 일부에 의해 수행되었으며, 김범규 박사의 1998년도 한국학술진흥재단 박사후 연수과정 지원사업 결과의 일부임.

참고 문헌

1. Akiyama, T., S. Migita and Y. Saito. 1973. Pathology of *Porphyra* sp. *Nippon Suisan Gakkai series* **2**, 7-28.
2. Day, D. and W. Yaphe. 1975. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of neoagarobiose hydrolase and ρ -nitrophenyl- α -galactosidase hydrolase. *Can. J. Microbiol.* **21**, 1512-1518.
3. Doucette, G., J. M. Kodama and S. Gallacher. 1998. Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxigenesis and cytology. In D. A. Anderson, A. Cembella. and G. Hallegraeff (ed.). *The physiological ecology of harmful algal blooms*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
4. Dye, D. W. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia* ll. the '*carotovora*' group. *N. J. J. Sci.* **12**, 81-95.
5. Fukami, K., A. Yuzawa, T. Nishijima and Y. Hata. 1991. Isolation and properties of a bacterium inhibiting the growth of *Gymnodinium nagasakiense*. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**, 1073-1077.
6. Fukami, K., K. Sakaguchi. M. Kanou and T. Nishijima. 1996. Effect of bacterial assemblages on the succession of blooming phytoplankton from *Skeletonema costatum* to *Heterosigma akashiwo*. pp. 335-338, In T. Yasumota, Y. Oshima, and Y. Fukuyo (ed.). *Harmful and toxic algal bloom*. *Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO*. Paris, France.
7. Furuki, M. and M. Kobayashi. 1991. Interaction between *Chattonella* and bacteria and prevention of this red tide-EMACS 90. *Mar. Pollut. Bull.* **23**, 189-193.
8. Groleau, D. and W. Yaphe. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **23**, 672-679.
9. Holt, J. G. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. pp. 93-94, 9th ed., Williams & Wilkins Press.
10. Leon, O. L., Q. G. Peruzzo and J. C. Stebe. 1992. Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain D4. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4060-4063.
11. Lim, D. J., B. J. Kim, S. K. Bae, J. D. Kim and J. Y. Kong. 1999. Immobilization of agarase for the agaroligosaccharide production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27(3)**, 208-214.
12. Lim, S. T. 1997. Molecular cloning and characterization of cellulose-degradation-enzyme in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34. Ph D. Dissertation. The Graduate School of Gyeongsang National Univ.
13. Lovejoy, C., J. P. Brown and G. M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effects of a noble marine *Pseudoalteromonas* isolate (Class *Proteobacteria*, Gamma Subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(8)**, 2806-2813.
14. Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**, 127-132.
15. Potin, P. C., R. C. Rochas and B. Kloareg. 1993. Purification and characterization of the α -agarase from *Alteromonas agarolyticus* (Cataldi). *Eur. J. Biochem.* **214**, 599-607.
16. Stanier, R. Y. 1942. Agar-decomposing strains of the *Actinomyces coelicolor* species group. *J. Bacteriol.* **44**, 555-570.
17. Sugano, Y., I. Terada, M. Noma and T. Matsumoto. 1993. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1549-1554.
18. Sugano, Y. and M. Noma. 1994. Sequence analysis of the *agaB* gene encoding a new agarase from *vibrio* sp. strain JT 0107. *Biochim. Biophys. Acta.* **121**, 105-108.
19. Van der Meulen, H. and H. Vedkamp. 1974. Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. nov., a new agarolytic flexibacterium. *Antonie Leeuwenboek* **40**, 329-346.
20. Vera, J., R. Alvarez, E. Murano, J. C. Slebe and O. Leon. 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its

extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(11)**,
4378-4383.
21. Young, K., S. Bhattacharjee and W. Yaphe. 1978.

Enzymatic cleavage of the alpha linkages in agarose
to yield agarooligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **66**,
207-212.

(Received May 25, 2001; Accepted July 19, 2001)