

Pseudoalteromonas sp. 배양액으로부터 아가레이즈 분리를 위한 음이온교환 크로마토그래피 최적화

김유나 · 이재란 · 김무찬* · 김성배 · 장용근** · 홍순광*** · 김창준†

경상대학교 생명화학공학과 및 공학연구원
660-701 경남 진주시 진주대로 501
*경상대학교 해양환경공학과
650-160 경남 통영시 인평동 445번지
**한국과학기술원 생명화학공학과
305-701 대전광역시 유성구 대학로 291번지
***명지대학교 생명과학정보학부
449-728 경기도 용인시 처인구 남동 산 38-2번지
(2011년 3월 2일 접수, 2011년 3월 29일 채택)

Optimization of Anion-exchange Chromatography for the Separation of Agarase from Culture Broth of *Pseudoalteromonas* sp.

Yu-Na Kim, Jae Ran Lee, Mu-Chan Kim*, Sung Bae Kim, Yong Keun Chang**, Soon-Kwang Hong*** and Chang-Joon Kim†

Department of Chemical & Biological Engineering and ERI, Gyeongsang National University,
501, Jinju-daero, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea

*Department of Marine Environmental Engineering, Gyeongsang National University,
445, Inpyung-dong, Tongyeong-si, Gyeongnam 650-160, Korea

**Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
291, Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

***Division of Bioscience and Bioinformatics, Myong Ji University, San 38-2, Nam-dong, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi 449-728, Korea
(Received 2 March 2011; accepted 29 March 2011)

요 약

아가로오스 분해산물은 생리활성이 우수하여 의약품 및 기능성 화장품 원료로 사용될 뿐만 아니라 바이오에탄올 생산을 위한 효모 발효용 기질로 검토되고 있어 상당한 주목을 받고 있다. 이에 따라 고성능 아가레이즈 탐색에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 본 연구팀에서는 남해안에서 신규 아가레이즈를 생산하는 미생물인 *Pseudoalteromonas* sp.를 분리하였다. 본 연구에서는 음이온교환수지를 이용하여 미생물 배양액으로부터 아가레이즈를 분리·정제하기 위한 크로마토그래피 조건을 최적화 하였다. 황산암모늄을 첨가하여 배양 상등액으로부터 침전된 단백질을 회수하고 이를 투석하여 조효소액을 얻었다. 음이온 교환수지인 DEAE-Sepharose 레진이 충전된 칼럼에 조효소액을 로딩하여 아가레이즈를 분리하였다. 410 µg의 단백질 로딩 시 흡착에 적합한 평형 pH는 7.5~8.0 이었고, 적절한 resin의 부피는 3 mL였다. 등용매 용출에서 용출액 중의 NaCl 농도가 증가함에 따라 용출되는 단백질 양이 증가하여 400 mM의 NaCl에서 최대에 달하였다. 최종적으로, NaCl 농도를 1,000 mM까지 선형적으로 증가시키며 아가레이즈를 분리하였다. Lugol 용액을 이용한 염색법으로 용리액 중의 아가레이즈의 존재를 확인하였다.

Abstract – Degradation products of agarose are biologically active and thus used as an ingredient in pharmaceuticals or functional cosmetics. Furthermore, it has been strongly considered as a substrate for bio-ethanol fermentation. Recently, we isolated new agarase-producing microorganism, *Pseudoalteromonas* sp. from south sea of Korea. In this study, we aimed to separate and purify the agarase from culture broth of this strain. Separation of agarase was performed by ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose resin. Equilibrium pH and volume ratio of resin to the amount of protein were optimized for the efficient adsorption of protein. 410 µg of protein was completely adsorbed to 3 mL of resin at pH 7.5. The total amount of eluted protein increased as NaCl concentration increased to 400 mM at iso-

† To whom correspondence should be addressed.
E-mail: cj_kim@gnu.ac.kr

*이 논문은 KAIST 입선기 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

cratic elution. Agarase was separated by linear gradient elution of NaCl (0~1,000 mM). Three major protein peaks were observed and the presence or absence of agarase in these eluted proteins was measured by Lugol's staining technique. Only six eluted protein fractions showed strong agarase activity.

Key words: *Pseudoalteromonas* sp., Agarase, Separation, Anion-Exchange Chromatography, Optimization

1. 서 론

2. 실 험

아가로오스는 홍조류 세포벽의 주성분이고 β -D-galactose와 3,6-anhydro- α -L-galactose가 α -(1,3) 결합과 β -(1,4) 결합에 의해 교대로 연결된 중합체이다. 아가레이즈는 아가로오스를 가수분해하는 효소로 그 분해 특성에 따라 두 그룹으로 나뉜다[1-3]. β -아가레이즈는 α -1,3 결합을 끊어 agarooligosaccharide를 생성하는 반면[4-6], β -아가레이즈는 β -1,4 결합을 끊어 neooligosaccharide를 생성한다[7-10]. 아가레이즈 분해생성물은 생리활성이 높아 화장품, 의약품, 기능성 건강식품에 널리 사용되고 있다[11,12]. 최근에는 해조류가 바이오에탄올 생산을 위한 발효용 기질로 각광을 받으면서 아가레이즈에 대한 관심도 증가하고 있다[13,14]. 이에 따라 고성능의 신규 아가레이즈를 발굴하여 이의 효소적 특성을 규명하고 이를 토대로 재조합 균주개발을 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그런데 신규 아가레이즈의 서열분석 및 효소적 특성을 규명하기 위해서는 순수한 아가레이즈를 얻는 것이 선행되어야 한다. 일반적으로 아가레이즈는 해양 미생물에 의해 생산되어 대부분이 세포외로 분비되기 때문에[2,3,7] 배양액으로부터 순수한 아가레이즈를 얻기 위해서는 이를 분리·정제하는 과정이 필요하다. 또는 정제된 아가레이즈 자체를 이용한 효소공정도 개발될 수 있다[15]. 한편, 아가레이즈 분리·정제를 위한 여러 가지 방법들이 보고되었다. 이온교환 크로마토 그래피에 의한 1단계 분리 후 겔크로마토 그래피에 의해 순수한 아가레이즈를 얻을 수 있다[6,8,16,17]. 순도를 향상시키기 위하여 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)를 병행하여 사용하기도 한다[6]. Microfiltration[18] 또는 membrane crossfiltration[19]에 의해 아가레이즈를 분리·정제한 경우도 보고되고 있다.

최근 본 연구팀에서는 남해안 진동만에서 고활성의 아가레이즈를 생산하는 미생물을 분리하였다. 본 연구의 목적은 음이온교환 크로마토그래피를 이용하여 신규 분리된 미생물 배양액으로부터 순수 아가레이즈를 분리·정제하는 데 있다. 이온교환 수지에 아가레이즈 흡착을 극대화시키기 위하여 흡착 평형 pH, resin 부피 대 로딩 아가레이즈 양의 최적 비율을 결정하였다. 흡착된 아가레이즈를 효과적으로 분리·용출하기 위하여 용출 용매중의 NaCl 농도를 변화시키며 용출 분액 중의 단백질 함량과 아가레이즈 활성을 조사하였다. 이를 바탕으로 NaCl 농도를 선형적으로 증가시키며 아가레이즈를 분리하였다. 용출액 중의 아가레이즈 존재 여부를 확인하기 위하여 염색에 의해 아가레이즈 활성 유무를 측정하는 간단한 에세이 방법을 사용하였다. 음이온교환 크로마토그래피를 이용한 아가레이즈 분리·정제에 대한 연구 결과가 많이 보고되고 있지만 본 연구에서처럼 흡착 및 용출 조건을 최적화함으로써 순수한 아가레이즈를 효율적으로 회수한 경우가 많지 않다. 또한 용출액 중의 아가레이즈 존재 여부를 확인하기 위하여 용출분액에 아가로오스를 첨가하여 반응시킨 후 생성되는 당을 정량하는 기존의 방법은 번거롭고 시간이 많이 걸리는 문제점이 있는 반면, 본 연구에서 사용한 에세이 방법은 대량으로 간단히 확인할 수 있다. 따라서 본 연구에서 사용한 방법은 기존의 방법에 비하여 효율적이다.

2-1. 미생물 배양 조건

남해안 진동만에서 분리한 해양 미생물인 *Pseudoalteromonas* sp.를 배양하여 아가레이즈를 생산하였다. 균주의 전 배양과 본 배양에 동일한 배지를 사용하였으며 배지의 조성(g/L)은 tris-base 6.1, MgSO₄ 12.3, KCl 0.74, (NH₄)₂HPO₄ 0.13, NaCl 17.5, CaCl₂ 0.14, agar 3, peptone 3, yeast extract 0.2이다[20]. 4 N 염산 용액을 첨가하여 배지의 pH를 7.0-7.2로 맞추었다. 25 mL 배지가 첨가된 250 mL 플라스크에 냉동 보관된 glycerol stock 100 μ L를 접종한 후 진탕배양기(Jeotech, Seoul, Korea)에서 25 °C, 180 rpm으로 12시간 배양하였다. 60 mL 배지가 함유된 250 mL 플라스크에 전 배양액 3 mL씩을 접종하여 25 °C, 180 rpm에서 본 배양을 수행하였다. 4 일 후 배양을 종료하고 다음의 방법으로 배양액 중의 아가레이즈를 분리하였다.

2-2. 조효소액(crude enzyme) 제조

회수된 배양액을 4 °C에서 8,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 세포를 제거하고 상등액을 채취하였다. 18개의 플라스크 배양액으로부터 회수된 배양 상등액 1 L에 가루형태의 황산암모늄을 첨가(3.8 M, 4 °C에서 포화농도의 80%)하고 잘 혼합하여 4 °C에 보관하였다. 12 시간 후 황산암모늄으로 침전된 단백질을 용액을 4 °C에서 8,000 rpm으로 30분간 원심분리하고 상등액을 제거하여 침전된 단백질을 얻었다. 여기에 25 mM tris-buffer(pH, 7.2)를 첨가하여 침전액을 용해시킨 후, 멸균된 투석막(MWCO=12,000~14,000)에 넣고 밀봉하였다. 이를 100 mM tris-buffer(pH 7.2) 2 L가 들어있는 비이커에 넣고 투석을 실시하였는데, 매 4시간마다 신선한 용액으로 교체하면서 총 12시간 동안 수행하여 단백질 침전 용액에 존재하는 염 성분들을 제거하였다. 투석이 완료된 단백질 용액 40 mL를 0.2 μ m 필터(Millex-GP, Millipore Co, Billerica, USA)에 통과시켜 존재할 수 있는 미세한 고형성분들을 제거하였다. 이렇게 얻어진 조효소 액을 4 °C 냉장고에 보관하며 이온교환 크로마토그래피 로딩용 단백질 용액으로 사용하였다.

2-3. 이온교환 크로마토그래피를 이용한 아가레이즈 분리

15 mL의 소형 칼럼에 약 음이온교환수지인 DEAE-Sephrose™ Fast Flow(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 1 mL를 충전한 후 등용매 용출(isocratic) 모드로 이온교환 크로마토그래피를 실시하여 단백질 흡착 및 용출(elution)을 위한 최적 조건을 탐색하였다. 단백질 흡착에 적합한 pH를 결정하기 위하여 pH가 각각 7.2, 7.5, 8.0 및 8.5인 25 mM의 tris-buffer 용액을 제조하고 이들 완충용액을 각 칼럼에 흘리면서 통과되어 나오는 용액의 pH가 완충용액의 pH와 동일한지 확인하였다. 각 조건에서 조효소 용액(단백질 191 μ g)을 칼럼에 로딩한 후 동일한 완충용액으로 칼럼을 충분히 세척하였다. 로딩 조효소 용액 중의 단백질 양 대 resin 부피의 적정비율을 결정하기 위하여 1, 2, 3 mL의 resin을 각각 충전한 컬럼에 25 mM tris-

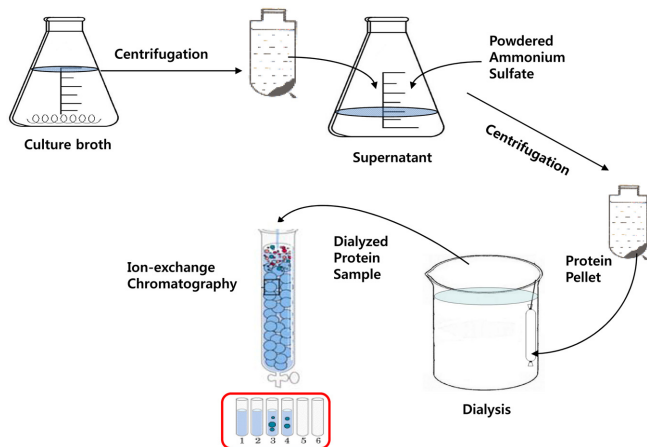


Fig. 1. Schematic diagram showing the separation of agarase from culture broth of *Pseudoalteromonas* sp. using anion-exchange chromatography.

buffer(pH 7.5)로 평형화 시키고 각 칼럼에 조효소 용액(단백질 410 μg)을 로딩한 후 동일 완충용액으로 세척하였다. 단백질 흡착량은 로딩 단백질 양에서 통과액과 세척액 중에 존재하는 단백질 양의 합을 뺀 값이다. 단백질 흡착수율(adsorption yield)은 흡착량을 로딩 단백질 양으로 나눈 값의 백분율로 하였다. 흡착된 단백질을 효율적으로 용출하기 위하여 용출액 중의 NaCl 농도를 변화시키며 용출되는 단백질 양을 측정하였다. 각 칼럼에 3 mL의 resin을 충전하고 25 mM tris-buffer(pH 7.5)로 평형화한 후, 조효소 용액(단백질 함량: 423 μg)을 로딩하고 동일한 완충용액으로 칼럼을 충분히 세척하였다. 단백질을 용출하기 위하여 25 mM tris-buffer(pH 7.2)에 NaCl을 농도별로 첨가(0~1 M NaCl)한 용출용매를 제조하여 이를 단백질이 흡착된 칼럼에 흘려주었다. 칼럼을 통해 나오는 용출액을 1.5 mL씩 분취하여 용출액 중의 단백질 함량을 측정하였고, 이로부터 용출 회수율(recovery)을 계산하였다. 용출 회수율은 용출분액들의 단백질 함량을 합한 값을 로딩 단백질 함량으로 나눈 값의 백분율이다.

위의 기초 실험을 바탕으로 스케일을 증가시키고 기울기 용리법(gradient elution)에 의해 아가레이즈를 분리하였다. 칼럼에 20 mL resin을 충전하고 25 mM tris-buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 후 단백질 용액(단백질 함량 2,733 μg)을 로딩하였다. 25 mM tris-buffer(pH 7.5)로 칼럼을 세척하여 미 흡착된 단백질을 제거한 후, 동일한 완충용액에 NaCl의 농도를 선형적으로 증가(0~1 M)시키며 용출액 중의 단백질 함량 및 아가레이즈 활성을 측정하였다. 조효소 제조, 투석, 이온교환 크로마토그래피를 포함한 아가레이즈 분리를 위한 전체공정을 Fig. 1에 나타내었다.

2-4. 분석방법

Coomassie® Plus Protein Assay Reagent Kit(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 즉, 1 mL 시료에 시약 1 mL를 첨가하여 상온에서 10분간 방치하면 푸른색으로 변하게 되는데, 시료 안에 단백질의 함량이 높을수록 색깔이 더 진해진다. 이를 UV/VIS spectrophotometer(Agilent 8453, Hewlett Packard, California, USA)를 이용하여 가시광선 영역의 파장인 595 nm에서 측정하였다. BSA를 이용하여 단백질 정량 표준곡선을 작성하였다.

간단히 아가레이즈 활성을 측정할 수 있는 방법을 개발하였다. 25 mM tris-buffer(pH 7.2) 150 mL에 아가로오스 2.3 g을 첨가한 용액(1.5% 아가로오스)을 제조하고 멸균한 후 이를 멸균된 유리접시에 부어 굳혔다. 준비된 아가로오스 플레이트 상에 일정크기(외경 15 mm)로 자른 살균된 여과지(No. 51, Hyundai Micro Co., Ltd, Korea)를 올려놓았다. 각 여과지 위에 30 μL 의 시료를 로딩하고 43 °C에서 4시간 동안 반응시킨 후 여과지를 제거하였다. 아가로오스 플레이트에 10 mL의 Lugol 용액(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)을 발라주면, 아가레이즈 활성이 있는 시료가 주입된 영역에서는 투명환이 나타나고, 아가레이즈 활성이 없는 시료를 주입한 영역은 갈색으로 변색된다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 아가레이즈 활성 측정

Lugol 용액은 요오드(I_2)와 요오드화 칼륨(KI)이 혼합된 갈색 요오드 용액으로 전분, 아가로스와 같은 다당류를 갈색으로 염색하지만, 분자량이 작은 올리고당이나 단당류는 염색하지 못하는 특징이 있다 [3]. 본 연구에서는 정성적 아가레이즈 활성 측정에 이러한 원리를 적용하였다. 즉, 아가로오스는 Lugol 용액으로 염색되지만, 아가로오스가 아가레이즈에 의해 분해되어 분자량이 작은 올리고당이나 단당류인 갈락토오스로 전환될 경우 Lugol 용액으로 염색되지 않는다는 점을 이용한 것이다. Fig. 2는 아가로오스 플레이트 상에 시판되는 아가레이즈, 분리 균주(*Pseudoalteromonas* sp.)의 배양 상등액으로 부터 얻은 조효소액 및 증류수를 주입하여 43 °C에서 4시간 반응시킨 후 Lugol 용액으로 염색한 결과를 나타낸다. 증류수를 주입한 면(D)와 시료를 주입하지 않은 면 모두가 갈색으로 염색된 반면, 시판중인 아가레이즈를 주입한 면(A, B)는 염색되지 않았다. 주목할 만한 점은 분리 미생물 배양 상등액으로 부터 회수된 조효소액을 주입한 면(C)도 시판중인 아가레이즈와 동일하게 염색되지 않았다는 것이다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 개발된 방법이 아가레이즈 활성 측정에 사용될 수 있고 분리균주의 배양 상등액에 아가레이즈가 존재하는 것을 나타낸다. 본 방법은 정성적이기 때문에 활성의 강약 유무만을 구분할 수 있지만 아가레이즈 분리-정제 과정을 모니터링 하

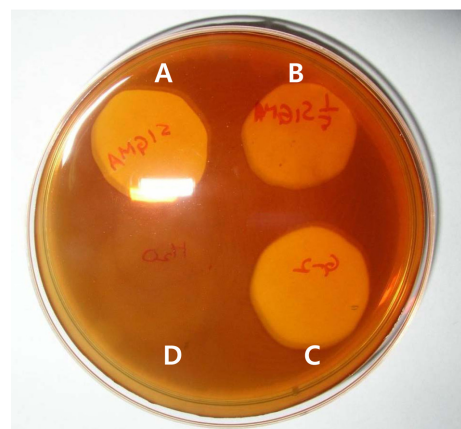


Fig. 2. Qualitative agarase assay using Lugol's iodine solution: (A), authentic β -agarase from sigma; (B), authentic β -agarase from sigma (5-times dilution); (C), crude enzyme from culture broth of cells; (D), sterile distilled water. 130 μL of each sample was loaded.

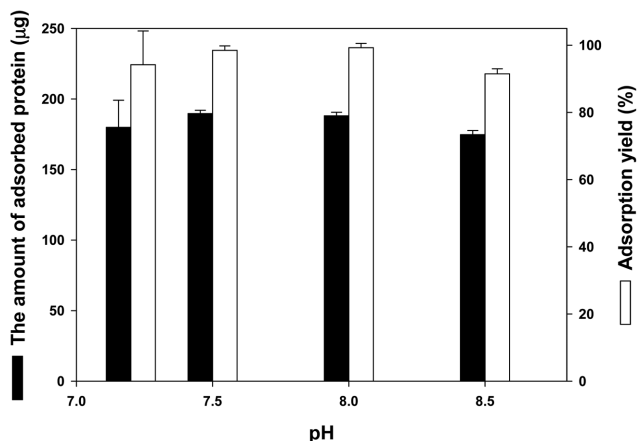


Fig. 3. The effect of equilibrium pH on the adsorption of protein on resin in ion-exchange chromatography.

는 데 사용될 수 있다. Lugol 용액을 이용한 아가레이즈 활성 측정 방법은 아가레이즈 생산균주 선별 [21] 혹은 SDS-PAGE에 의해 분리된 단백질에서 아가레이즈 활성을 나타내는 밴드를 확인[22]하는데 사용되었지만, 본 연구에서처럼 분리·정제 과정의 모니터링에 사용된 적은 없었다.

3-2. pH에 따른 단백질 흡착량

음이온교환 수지는 표면에 양이온을 띄고 있어 수용액 속에서 특정 음이온과 자신의 음이온을 교환함으로써 이온성 물질을 분리하는데, 특히 단백질과 같은 생체물질의 분리·정제에 널리 사용된다[23]. 음이온교환 수지가 충전된 칼럼에 단백질 용액을 로딩하면 음이온성의 단백질은 resin에 흡착되고 중성 혹은 양이온성의 단백질은 칼럼을 통과한다. 용출용매 중의 염농도를 증가시키면 흡착된 단백질이 용출된다. 따라서 흡착과 용출 조건을 최적화 함으로써 원하는 단백질을 분리하여 얻을 수 있다.

단백질은 카르복실기와 아미노기를 갖고 있는 양쪽성 물질로 pH에 따라 총 전하가 변하게 된다. 일반적으로 등전위점(pI)보다 높은 pH에서는 단백질이 음전하를 띄고 낮은 pH에서는 양전하를 띤다[24]. 본 연구에서 정제하고자 하는 단백질인 아가레이즈는 새롭게 스크리닝되어 얻어진 것으로 등전위점에 대한 정보가 없다. 따라서 본 실험을 통하여 목적 단백질인 아가레이즈가 음전하를 띄는 pH 환

경을 조성함으로써 음이온교환 수지에 아가레이즈 흡착량을 최대화시켰다. Fig. 3은 이온교환 칼럼에 조효소 용액을 로딩 시 평형화된 pH에 따른 단백질의 흡착수율(adsorption yield)을 나타낸다. 흡착수율은 pH에 따라 큰 차이를 나타내지 않지만 pH 7.5와 8.0에서 최대값(90% 이상)을 나타낸다.

한편, 단백질 로딩 후 약하게 결합되거나 부착되지 않고 남아있는 성분들을 제거하기 위하여 완충용액을 흘려줌으로써 칼럼을 세척하게 되는데, 세척액에서 아가레이즈 활성이 검출된다면 아가레이즈가 세척액에 존재하는 것을 나타낸다. 이는 로딩된 아가레이즈가 resin에 완전히 흡착되지 않고 일부가 칼럼을 통과하고 있음을 나타낸다. 이를 확인하기 위하여 가장 높은 흡착량을 나타낸 pH 7.5에서 조효소액 로딩 후 세척액 중의 아가레이즈 활성을 측정하였다. Fig. 4에 보듯이 통과액과 모든 세척 분액에서 아가레이즈 활성이 검출되지 않았다. 이러한 결과는 pH 7.5에서 로딩된 아가레이즈가 resin에 모두 흡착되었음을 나타낸다. 일반적으로 아가레이즈의 pI 값이 7.0보다 낮고[3], 음이온교환 크로마토그래피에서 아가레이즈 흡착에 적합한 평형 pH가 7.0~7.5로 알려져 있다[8,10,16]. 본 실험을 통하여 분리하고자 하는 신규 아가레이즈의 흡착에 적합한 평형 pH 범위가 기존에 알려진 아가레이즈의 값들과 유사한 것으로 확인되었다. 이로부터 신규 아가레이즈의 pI값이 기존 아가레이즈의 pI값과 비슷할 것으로 예측된다.

3-3. 로딩 단백질 양 대 resin 부피의 최적 비율 결정

이온성 물질을 부착할 수 있는 resin의 용량이 정해져 있으므로 로딩 단백질을 최대한 흡착하기 위해서는 적정량의 이온교환 resin을 충전하여야 한다. 이온교환 resin에 부착될 수 있는 단백질의 양은 단백질에 존재하는 전하량에 좌우되고, 전하를 띤 기들의 수는 단백질 들마다 다르기 때문에 단백질 양 대 resin 부피의 적정비율의 결정은 실험적으로 이루어져야 한다.

1 mL, 2 mL, 3 mL의 resin을 칼럼에 충전하고, 상기에서 결정된 최적 pH(7.5)의 완충용액으로 평형을 맞춘 후 410 μg의 단백질을 함유하는 조효소 용액을 로딩하였다. 충전된 resin 부피가 증가함에 따라 흡착되는 단백질 양이 증가하여 3 mL resin이 충전된 경우에 410 μg의 단백질이 모두 흡착되었다(Fig. 5). 이는 100% 흡착률에 해당한다. 본 결과는 410 μg의 단백질 로딩 시 필요한 최소한의 resin의 양이 3 mL임을 나타낸다.

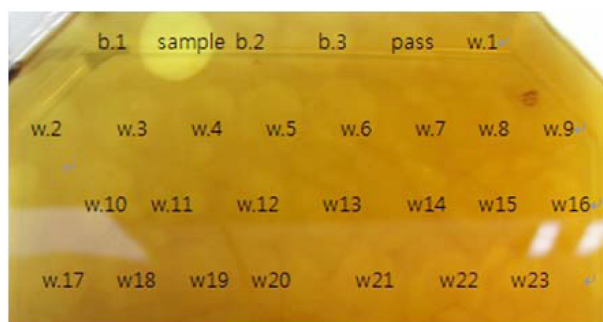


Fig. 4. Agarase activity of pass-through and wash when crude enzyme was loaded into ion-exchange chromatographic column at pH 7.5: b1, sterile deionized water; sample, crude enzyme; b2, 20 mM tris buffer (pH 7.5); b3, 800 mM NaCl in 20 mM tris buffer (pH 7.5); w1-w23: wash).

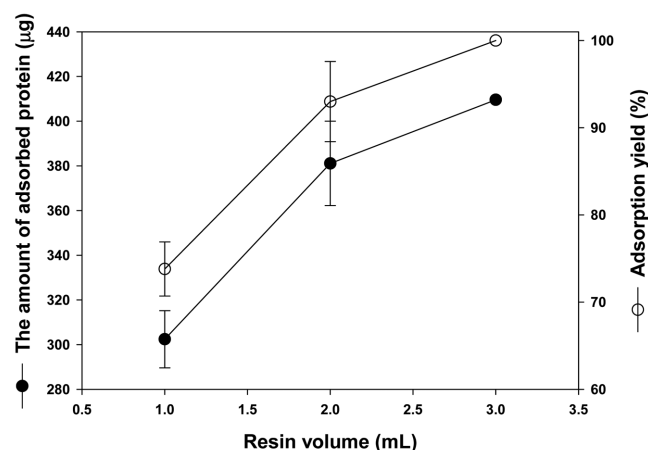


Fig. 5. The protein adsorption on different volume of resin.

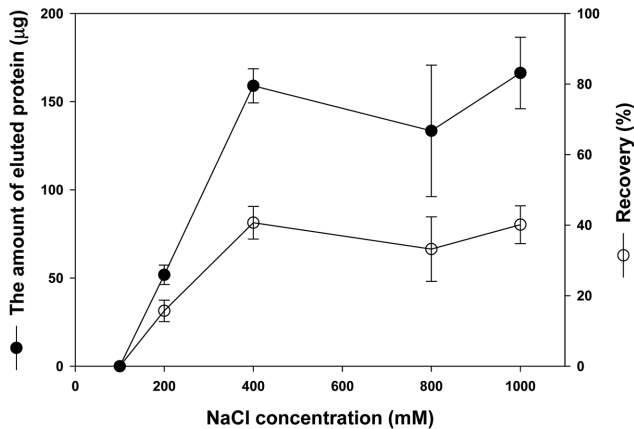


Fig. 6. The effect of NaCl concentration on protein elution.

3-4. 등용매 용출(isocratic elution)에서 NaCl 농도에 따른 단백질 용출

이온교환 resin에 결합된 단백질을 서로 다른 시간에 용출시킴으로써 단백질을 분리하여 회수할 수 있다. 결합의 강도는 단백질의 충전 크기에 따라 다르므로 칼럼으로 흘러주는 용출용매의 이온강도(염 농도)를 서서히 높이면 결합이 약한 단백질이 먼저 용출된다[21, 22]. 이를 위해 용출용매의 적절한 염 농도 범위를 결정하는 실험이 필요하다. 먼저 상기에서 결정된 최적조건에서 단백질을 흡착시켰다. 즉, 3 mL resin을 충전하고 25 mL tris-buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 후, 423 μg의 단백질을 포함하는 조효소 용액을 로딩하였다. NaCl을 농도별로 첨가(100, 200, 400, 800, 1000 mM)한 용출용매를 제조하여 각각 단백질이 흡착된 칼럼에 흘러주면서 용출되는 단백질을 관찰하였다. Fig. 6이 보여주듯이, 단백질의 용출량은 칼럼에 흘러주는 용출용매 중의 NaCl 농도가 높을수록 증가하여 400 mM의 NaCl에서 최대값을 나타내었다. 800 mM에서 다소 감소한 후 1,000 mM에서 다시 증가한 것처럼 보이지만, 실험적 오차를 고려한다면 400 mM 이상의 NaCl을 포함한 용출용매에 의해 비슷한 양의 단백질이 용출된다고 할 수 있다. 400 mM의 NaCl이 첨가된 용출용매에 의해 용출된 단백질의 양은 159 μg이었고 이는 41% 회수율(recovery)에

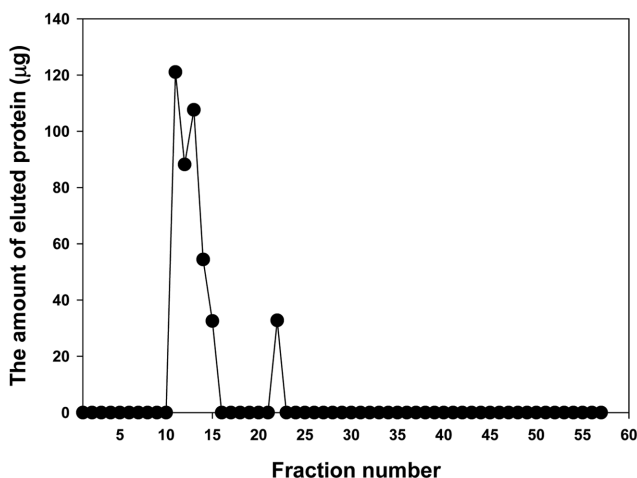


Fig. 7. Ion-exchange chromatography of agarase on DEAE-Sepharose. The tris buffer containing gradient NaCl rising from 0 to 1.0 M at a flow rate of 1 mL/min was used to wash the sample.

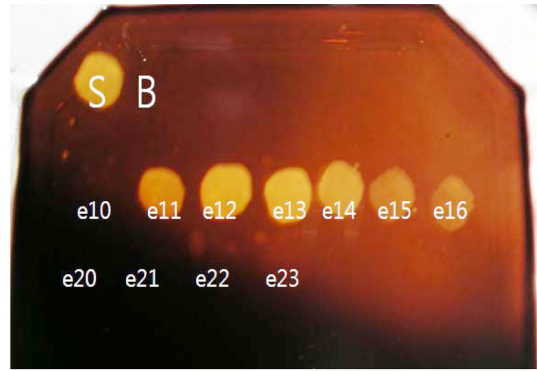


Fig. 8. The agarase activity of elution fraction at gradient elution by increasing NaCl concentration: S, crude enzyme; B, 25 mM Tris buffer (pH 8.0); e, elution fraction).

해당한다. 이 경우 용출되는 단백질 분액들 중에서 아가레이즈 활성이 검출되었다(Data not shown). 요약하면, 용출용매 중의 NaCl이 200 mM에서 단백질 용출이 시작되었고 400 mM 이상에서 최대의 회수율을 보였으며, 아가레이즈 활성이 나타났다. 이는 아가레이즈가 이온교환크로마토그래피에 의해 다른 단백질들로부터 분리되고 있음을 나타낸다. 일반적으로 DEAE-Sepharose™ Fast Flow에 흡착된 단백질은 용출액 중의 NaCl이 500 mM 이상에서 대부분 용출된다고 알려져 있다[25,26].

3-5. 기울기 용리(gradient elution)에 의한 단백질 용출

상기 기초 실험을 바탕으로 큰 스케일에서 아가레이즈 분리를 위한 크로마토그래피를 실시하였다. 칼럼에 20 mL의 resin을 충전하여 조효소액(단백질 함량, 2,700 μg)을 로딩하고 세척한 후 단백질 용출을 위하여 기울기 용리를 실시하였다. 상기 실험결과를 바탕으로 단백질 용출에 적합한 염 농도 범위를 결정하였다. 등용매 용출 실험에서 비록 NaCl의 농도가 400 mM 이상에서도 더 이상 용출되는 단백질이 관찰되지 않았지만 resin에 미세하게 흡착되어 잔류할 수 있는 단백질들을 완전히 제거하기 위해서 농도 범위를 0~1,000 mM까지 선형적으로 증가시켰다. 용출액에서 3개의 주요 단백질 피크가 관찰되었다(Fig. 7). 이들 피크들에 해당하는 용출액들의 아가레이즈 활성을 측정한 결과, 용출액 E11-E16에서 강한 아가레이즈 활성이 검출되었다(Fig. 8). 이는 두 번째 단백질 용출 피크에 해당하는 용출액이다. 이와 같은 결과는 음이온 교환 수지에 흡착된 아가레이즈가 분리되어 용출되고 있음을 나타낸다.

4. 결 론

본 연구에서는 해양 미생물인 *Pseudoalteromonas* sp. 균주 배양액으로부터 신규 아가로스 분해효소(아가레이즈)를 효율적으로 분리하기 위한 음이온교환 크로마토그래피의 최적조건을 조사하였다. 3 mL의 resin이 충전된 칼럼에 평형 pH를 7.5로 맞추고 배양 상등액에서 얻은 조효소액을 로딩 시, 대부분의 단백질이 흡착되어 통과액 및 세척액에서 아가레이즈 활성이 검출되지 않았다. 등용매 용출에서 용출용매의 NaCl 농도가 200 mM에서부터 단백질 용출이 시작되었고 NaCl 농도를 증가시킴에 따라 용출되는 단백질 양이 증가하여 400 mM에서 최대에 도달하였다. 기울기 용리에서 NaCl의 농도를 선형적으로 증가(0~1,000 mM)시킴에 따라 분리되어 용출되는 세

개의 주요 단백질 피크가 관찰되었다. 이들 피크들에 해당하는 용출 분액들의 아가레이즈 활성을 측정한 결과, 용출분액 E11-E16에서 강한 아가레이즈 활성이 검출되었다. 본 연구결과는 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 단백질 혼합액으로부터 아가레이즈를 분리·정제할 수 있음을 나타낸다. 향후 겔크로마토그래피 방법을 추가적으로 이용한다면 더욱 순수한 아가레이즈를 분리하여 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

본 연구는 21C 프린티어 연구개발 사업(미생물 유전체 활용기술 개발 사업)의 지원과 2010년도 경상대학교 연구년제 연구교수 연구비 지원 및 BK21 프로그램의 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Lahaye, M. and Rochas, C., "Chemical Structure and Physico-chemical Properties of Agar," *Hydrobiol.*, **221**, 137-148(1991).
- Michel, G., Nyval-Collen, P., Barbeyron, T., Czjzek, M. and Helbert, W., "Bioconversion of Red Seaweed Galactans: A Focus on Bacterial Agarases and Carrageenases," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 23-33(2006).
- Ting, X. and Kim, S. M., "Agarase: Review of Major Sources, Categories, Purification Method, Enzyme Characteristics and Applications," *Mar. Drugs*, **8**, 200-218(2010).
- Flament, D., Barbeyron, T., Jam, M., Potin, P., Czjzek, M., Kloareg, B. and Michel, G., "Alpha-agarase Define a New Family of Glycoside Hydrolases, Distinct from Beta-agarase Families," *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**(14), 4691-4694(2007).
- Ohta, Y., Hatada, Y., Miyazaki, M., Nogi, Y., Ito, S. and Horikoshi, K., "Purification and Characterization of a Novel α -agarase from a *Thalassomonas* sp.," *Curr. Microbiol.*, **50**, 212-216 (2005).
- Potin, P., Richard, C., Rochas, C. and Kloareg, B., "Purification and Characterization of the α -agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov. Strain GJ1B," *Eur. J. biochem.*, **214**, 599-607 (1993).
- Lakshmikanth, M., Manohar, S., Souche, Y. and Lalitha, J., "Extracellular β -agarase LSL-1 Producing Neoagarobiose from a Newly Isolated Agar-liquefying Soil Bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1," *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 1087-1094 (2006).
- Wang, J., Mou, H., Jiang, X. and Guan, H., "Characterization of a Novel β -agarase from Marine *Alteromonas* sp. SY37-12 and Its Degrading Products," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 833-839 (2006).
- Jam, M., Flament, D., Allouch, J., Potin, P., Thion, L., Kloareg, B., Czjzek, M., Helbert, W., Michel, G. and Barbeyron, T., "The Endo- β -agarases AgaA and AgaB from the Marine Bacterium *Zobellia galactanivorans*: Two Paralogous Enzymes with Different Molecular Organizations and Catalytic Behaviours," *Biochem. J.*, **385**, 703-713(2005).
- Schroeder, D. C., Jaffer, M. A. and Coyne, V. E., "Investigation of the Role of a β (1-4) Agarase Produced by *Pseudoalteromonas gracilis* B9 in Eliciting Disease Symptoms in the Red Alga *Gracilaria gracilis*," *Microbiol.*, **149**, 2919-2929(2003).
- Hatada, Y., Ohta, Y. and Horikoshi, K., "Hyperproduction and Application of α -agarase to Enzymatic Enhancement of Antioxidant Activity of Porphyrin," *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 9895-9900(2006).
- Chen, H.-M., Zheng, L. and Yan, X.-J., "The Preparation and Bioactivity Research of Agar-Oligosaccharides," *Food Technol. Biotechnol.*, **43**(1), 29-36(2005).
- Shin, M. H., Lee, D. Y., Wohlgemuth, G., Choi, I.-G., Fiehn, O. and Kim, K. H., "Global Metabolite Profiling of Agarose Degradation by *Saccharophagus degradans* 2-40," *New Biotechnol.*, **27**(2), 156-168(2010).
- Lee, S.-M., Yu, B. J., Kim, Y. M., Choi, S.-J., Ha, J.-M., Lee, J.-H., "Production of Bio-ethanol from Agar using *Saccharomyces cerevisiae*," *J. Kor. Ind. Eng. Chem.*, **20**(3), 290-295(2009).
- Lim, D.-J., Kim, B.-J., Bae, S.-K., Kim, J.-D. and Kong, J.-Y., "Immobilization of Agarase for the Agarooligosaccharide Production," *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(3), 208-214 (1999).
- Lakshmikanth, M., Manohar, S. and Lalitha, J., "Purification and Characterization of β -agarase from Agar-liquefying Soil Bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1," *Proc. Biochem.*, **44**, 999-1003 (2009).
- Sugano, Y., Terada, I., Arita, M., Noma, M. and Matsumoto, T., "Purification and Characterization of a New Agarase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107," *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(5), 1549-1554(1993).
- Hassairi, I., Amar, R. B., Nonus, M. and Gupta, B. B., "Production and Separation of α -agarase from *Alteromonas agarlyticus* Strain GJ1B," *Biores. Technol.*, **79**, 47-51(2001).
- Toussaint, G., Ding, L. H., Jaffrins, M. Y., Hassairi, I. and Nonus, M., "Recovery of α -agarase Enzyme from Fermentation Broths by Membrane Crossflow Filtration," *Sep. Sci. Technol.*, **35**(6), 759-809(2000).
- Ghadi, S. C., Muraleedharan, U. D. and Jawaide, S., "Screening for Agarolytic Bacteria and Development of a Novel Method for *in Situ* Detection of Agarase," *J. Mar. Biotechnol.*, **5**, 194-200 (1997).
- Fu, W., Han, B., Duan, D., Liu, W. and Wang, C., "Purification and Characterization of Agarase from a Marine Bacterium *Vibrio* sp. F-6," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 915-922(2008).
- Fu, X. T., Lin, H. and Kim, S. M., "Purification and Characterization of a Novel β -agarase, AgaA34, from *Agarivorans albus* YKW-34," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 265-273(2008).
- Levison, P. R., "Large-scale Ion-exchange Column Chromatography of Proteins Comparison of Different Formats," *J. Chromatogr. B*, **790**, 17-33(2003).
- Yamamoto, S. and Ishihara, T., "Ion-exchange Chromatography of Proteins Near the Isoelectric Points," *Chromatogr. A*, **852**, 31-36(1999).
- Johansson, H. J., Jagersten, C. and Shiloach, J., "Large Scale Recovery and Purification of Periplasmic Recombinant Protein from *E. coli* Using Expanded Bed Adsorption Chromatography Followed by New Ion Exchange Media," *J. Biotechnol.*, **48**, 9-14 (1996).
- Kupke, T., Stevanovic, S., Sahl, H.-G. and Gotz, F., "Purification and Characterization of EpiD, a Flavoprotein Involved in the Biosynthesis of the Lantibiotic Epidermin," *J. Bacteriol.*, **174**, 5354-5361(1992).