

Isolation and Characterization of an Agar-degrading Bacterium, Isolated from The Sea Water

문현식, 홍승현, 허문수

제주대학교 해양과학대학 해양생산과학전공

Abstract

An agar degrading bacterium, This strain was isolated from sea water in Jeju. The strain is Gram-negative, rod and strictly aerobe for growth. The identification bases on the 16S rRNA gene sequencing showed that the strain was closely related to the genus *Agariovarans* sp. and named *Agariovorans* sp. JA1. The strain grew on agar as a sole carbon and energy source and produced an extra cellular agarase. For the increase of agarase productivity, 0.5% agar, yeast extract and NaNO₃ were used as carbon, organic and inorganic nitrogen source, respectively. For effective production of agarase and growth, the pH, temperature and NaCl concentration were was pH 7, 25°C ~ 30°C and 2%, respectively.

서론

한천은 알긴산 및 카라기난과 더불어 식품 가공, 연구 및 공업용으로 가장 널리 이용되고 있는 해조 유래 다당이다. 국내에서 생산되는 한천의 경우 해마다 그 생산량이 3,600톤(약 50억원)에 이르고 있으나, 생산량의 6.5% 정도만이 단순 가공되어 값싼 원료로 사용되어 질뿐이다. 한천올리고당은 기존의 다른 올리고당에 비하여 전분노화의 억제작용이 강할 뿐만 아니라 기존의 상업적으로 생산되고 각종 올리고당 제품에 비해 체내흡수가 가능한 단당류의 함량이 가장 낮은 올리고당임이 확인된 바 있다. 지금까지 보고되어진 바로는 미생물을 중심으로 한 한천분해 효소의 생산에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다. 예를 들어 β -agarase를 이용하여 얻어진 Neoagarooligosacchrides는 저칼로리 첨가물, 미백효과 및 제습효과, 면역강화와 비타민 결핍에 효과가 있어서 기능적 음식, 화장품, 의학 공학의 좋은 원료로 쓰이고 있다. 따라서 본 연구는 한천분해능이 뛰어난 신규 미생물을 분리하여 동정하고 본 균주를 이용하여 최적 분해 활성에 영향을 미치는 영양 요구성과 배양조건을 연구하여 보고하였다.

재료 및 방법

균주의 분리는 제주도 연안에서 채집된 해수로부터 한천분해능을 지닌 균주를 Marine Agar 배지 상에서 분리하였다. 분리된 균주는 2% Marine Broth에 접종한 후 200 rpm 25°C 24 시간 배양하였다. 최적화에 영향을 미치는 영양 요구성과 배양조건을 알아보기 위해 탄소원과 질소원이 들어간 기본배지를 사용하여 36 시간 배양하였다. 효소생산량에 미치는 초기 pH, NaCl 농도, agar 농도를 조사하기 위해 각각 pH 5 ~ pH 10, 0% ~ 5%, 0.1% ~ 1.0%하였고, 유기태와 무기태 농도의 영향을 조사하기 위해서 선택적으로 NH_4NO_3 , KNO_3 , NaNO_3 , beef extract, yeast extract, bacto peptone, tryptone을 넣어 배양한 후 최적효소활성을 측정하였다. 효소활성 측정은 DNS법을 이용해서 측정하였고, 효소활성 당 1unit 계산은 D-galactose per min 당 얻어지는 물질로서 1 μm 의 환원당을 생산하는 단백질의 양으로 계산하였다. 또한 생화학적 성상의 조사와 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 분리균주를 동정하였다.

결과 및 고찰

한천분해 세균 JA1은 제주 연안의 해수로부터 분리되어졌다. 균주는 Gram 음성 간균이며 절대 호기성 세균이다. 균주는 agarase를 생성하여 한천을 분해하는 것으로 관찰되었다. 생화학적 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석한 결과 *Agarivorans*속으로 동정되었다. agarase의 최적 생산을 위한 agar농도는 0.5%이며, pH, 온도 및 NaCl 농도는 각각 pH 7, 25°C ~ 30°C 와 2 ~ 3%였다. 최적 생산을 위한 유기태와 무기태는 NaNO_3 , yeast extract이었다.

요 약

한천분해 세균은 제주 연안의 해수로부터 분리되어졌다. 균주는 Gram 음성 간균이며, 절대 호기성 세균이다. 균주는 agarase를 생성하여 한천을 분해하는 것으로 관찰되었다. 균주의 생화학적 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석한 결과 *Agarivorans*속으로 동정 되었다. 그래서 *Agarivorans* sp. JA1이라 명명하였다. agarase의 최적 생산을 위한 agar농도는 0.5%이며, pH, 온도와 NaCl 농도는 각각 pH 7, 25°C ~ 30°C 와 2%였다. 유기태과 무기태는 각각 yeast extract와 NaNO_3 를 첨가 할 경우 agarase 생성이 가장 좋은 것으로 사료되었다. Agarase의 최적 생산 활성 측정은

DNS법(3,5-dinitrosalicylic acid procedure)을 이용하여 환원당 값을 산출하였고, 50000(U/L)이상 나왔다.

References

1. Miller, G. L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
2. Lee, W. K *et al.*, 1999, Isolation and Identification of Marine Bacterium *Cytophaga* sp, AYK301 and Optimal Culture Conditions for the Production of Agarase. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 14 (5), 572-577.
3. Ohta, Y *et al.*, 2004, Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64, 505-514.
4. Ohta, Y *et al.*, 2004, Enzymatic Properties and Nucleotide and Amino Acid Sequences of a Thermostable β -Agarase from the Novel Marine Isolate, JAMB-A94. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68(5), 1073-1081.