

## 내열성 한천분해효소를 생산하는 해양세균의 분리 및 특성

박근태<sup>1</sup> · 이동근 · 김남영 · 이어진 · 정종근 · 이재화 · 허문수<sup>2</sup> · 이정현<sup>3</sup> · 김상진<sup>3</sup> · 이상현\*

신라대학교 공과대학 생명공학과, <sup>1</sup>부산대학교 산학협력단, <sup>2</sup>제주대학교 해양과학부, <sup>3</sup>한국해양연구원 미생물연구실

Received August 31, 2005 / Accepted November 16, 2005

**Isolation and Characterization of a Marine Bacterium Producing Thermotolerant Agarase.** Geun-Tae Park<sup>1</sup>, Dong-Geun Lee, Nam Young Kim, Eo-Jin Lee, Jong-Geun Jung, Jae-Hwa Lee, Moon-Soo Heo<sup>2</sup>, Jung-Hyun Lee<sup>3</sup>, Sang-Jin Kim<sup>3</sup> and Sang-Hyeon Lee. Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea, <sup>1</sup>Research & University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Korea, <sup>2</sup>Faculty of Marine Sciences, Cheju National University, Jeju-do 690-756, Korea, <sup>3</sup>Microbiology Laboratory, Korea Ocean Research and Development Institute, Ansan PO Box 29, 425-600, Korea – An agar-degrading bacterium was isolated from north-eastern sea of Jeju island and cultured in marine agar 2216 media. Biochemical and morphological characteristics and 16S rRNA gene revealed that isolated strain was member of *Agarivorans* genus, and named *Agarivorans* sp. JA-1. Agarase was produced as growth-related and expressed regardless of agar presence. Optimal pH was 8 at 50 mM Glycine-NaOH buffer, and activity was maximum at 40°C. Enzymatic activity was maintained over 80% at 60°C and 70% at 80°C, which is thermotolerant. Hence isolated novel *Agarivorans* sp. JA-1 strain and its beta-agarase could be used for the production of functional oligosaccharide from agar in solution state.

**Key words** – marine, *Agarivorans* sp. agarase, thermotolerant enzyme

한천(agar)은 galactose의 중합체로 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있는 다당류로 홍조류의 세포벽에 존재한다[4]. 오래전부터 한천은 식품공업, 특히 젤리, 아이스크림 등에 사용되어 왔으며 인간의 소화효소로는 분해되지 않아 다이어트 식품 등에 널리 이용되고 있다[3]. 또한 한천을 잘 가공 정제하여 미생물배지로서 유용하게 사용하고 있으며 특히 구성성분의 70%이상을 차지하는 agarose만을 정제하여 생산된 제품은 분자생물학 실험의 중요 재료로서도 널리 활용되고 있어 단순가공품에 비해 부가가치가 매우 높다. 그러나 국내의 한천은 제주도 및 남해안 일대에서 많은 양이 생산되고 있으며 절적인 면에서 세계적으로 인정받고 있으나, 1차 가공품 형태의 저부가가치 제품으로 일본에 거의 수출을 하고 있으며 이들의 고부가가치화는 수산 경제 발전을 위해 필수적이라 할 것이다.

게다가 한천의 분해산물인 neoagarooligosaccharide는 세균성장 억제, 전분노화 방지, 대식세포 활성화, 보습효과 그리고 미백효과 등 많은 유용한 기능을 나타내며 이들을 활용한 제품은 부가가치가 매우 높은 것으로 알려져 왔다[2,17]. 이러한 기능성올리고당 생산을 위한 한천의 분해 방법은 산 가수분해[7] 및 한천분해효소(agarase)를 이용하는 효소학적 방법이 있으며, 산 가수분해법은 올리고당의 기능성 및 안정성에 문제가 있어 한천분해효소가 유용한 것으로 인식되어[14], 한천분해효소 생성균주를 찾기 위한 여러 연구가 진행

되었다[1,15,18].

한천은 40°C 이하의 온도에서는 고형화되어 한천분해효소의 작용이 어려우므로, 기능성올리고당을 생산하기 위해서는 40°C 이상의 고온에서 안정성을 갖는 효소의 개발이 필수적이다. 하지만 대부분의 한천분해세균은 해양기원으로 고온에 적합하지 못하며 이들이 생산하는 한천분해효소들도 열에 불안정한 경우가 많다[8]. 이를 극복하기 위하여 열안정성 효소를 생산하는 돌연변이체를 유도하거나[6], 내열성 한천분해효소를 가지고 있는 해양세균을 분리하여 이용하려는 연구가 시도되었고[11,12] 이들은 산업적인 응용에 적절하게 활용될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 한천의 고부가가치화를 위하여 내열성 한천분해효소를 생산하는 신규 해양성세균을 제주도 연안해역에서 분리하였고 이 해양 세균의 분류학적 위치와 생육 및 한천 분해 효소의 생산 최적조건 등을 검토하여 산업적 응용의 가능성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 분리용 시료 및 한천분해 균주의 분리 배양

제주도 동북해역의 해수를 시료액으로 사용하였다. 시료액을 2% NaCl이 첨가된 멸균희석수를 이용하여 연속적으로 희석하였고 원액과 희석수 100 µl씩을 배지위에 도말하였다. 배지는 한천을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 한 무기염 배지와(Table 1), 일반적인 해양세균 분리 및 증균용 배지로 사용되는 marine agar 2216 (Difco, Detroit, USA) 배지에 도말한 후 25°C에서 배양하면서 생장 및 pit 또는 creator를 형성

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

Table 1. Composition of inorganic salt medium for isolation of agar-degrading bacteria

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	62 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub>	0.1 g
CaCl <sub>2</sub>	0.01 g
FeSO <sub>4</sub>	0.001 g
Yeast extract	0.05 g
Agar	30 g
NaCl	20 g
Distilled Water	1,000 ml
pH	7.4±0.2

하는 균주를 선별하였다.

#### 한천분해 균주의 선정 및 동정

한천분해능을 가진 분리 균주들을 분리용 배지 및 marine agar 2216 배지에서 배양하면서 분해능이 가장 우수한 JA-1 균주를 선별하였다. 분해균주의 동정을 위하여 형태학적, 배양적 및 생화학적 특징을 조사하였으며 16S rDNA 염기서열 분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 Blast를 사용하여 공시균주와 유사도를 검토하였으며, 윈도우 버전의 Clustal 프로그램(ClustalX ver. 1.8) 이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 neighbor-joining method와 bootstrap method (n=1000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

#### 한천분해 균주의 생육 및 조효소액 제조

Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 순수분리한 JA-1 균주를 접종한 후 25°C, 200 rpm에서 24시간 진탕 배양하였다. 생장 양상을 경시적으로 관찰하면서 한천분해 효소의 활성을 측정하였다. 이후 최적 활성을 보이는 12시간까지 배양한 후 배양액을 원심분리하여 (12000×g, 4°C, 10 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

#### 효소활성 측정

한천분해 효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogy-Nelson법으로 실시하였다[13]. 효소반응액 1.5 ml에 2.0 ml의 Somogy 시약(10% CuSO<sub>4</sub>, 80 ml, 1N NaOH 100 ml, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 71 g, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>KNa · 4H<sub>2</sub>O 40 g / D.W. 1 l)을 첨가하여 반응을 중지시키고 10분간 끓였다. 실온으로 냉각된 용액에 arseno-molybdate 시약을 첨가하고 14000×g에서 5분간 원심분리한 상층액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1 μmole의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit로 정의하였고 galactose를 이용하여 표준적정곡선을 작성하였다.

#### 온도에 따른 한천분해 효소의 활성

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해능의 안정성을 실시하였다. 표준 기질용액으로는 0.2%의 agar (w/v)가 포함된 pH 7.8의 50 mM TAPS (N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropane sulfonic acid-NaOH) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 증탕가열한 후 20~80°C의 온도별로 냉각하였다. 조효소액 0.5 ml과 기질용액 1.0 ml을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

#### pH에 따른 한천분해 효소의 활성

최적 pH와 pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 100 mM sodium acetate 완충용액(pH 3.6-5.0), 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 4.9-8.1), 50 mM glycine-NaOH 완충용액(pH 8.04-10.0)을 이용하였다. 한천이 포함된 (0.2% w/v) 완충용액을 증탕가열한 후 40°C까지 냉각 후 반응수조를 이용하여 온도를 유지하면서 완충용액 1.0 ml에 조효소액을 0.5 ml 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 한천분해 균주의 분리 및 배양

제주도 동북해역의 해수 시료에서 무기염 한천평판 배지 (Table 1)를 함몰시키는 한천 분해능이 우수한 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 0.3% (w/v)의 한천을 포함한 무기염 배지에 접종한 후 marine agar 2216 배지에서 진탕 배양한 후 배양액의 환원당값을 측정하여 선별된 균주의 한천분해능을 검토하였으며 가장 분해능이 우수한 균주인 JA-1를 최종적으로 선정하였다. Fig. 1은 분리한 JA-1 균주가 나타내는 한천분해 양상을 나타낸 것이다. 분리한 균주는 NaCl이 첨가되지 않은 배지에서 생육이 거의 이루어지지 않아 생육에 NaCl을 요구하는 해양성 균주인 것으로 확인되었으며(data not shown) 이는 Lee 등의[10] 결과와 유사하였다.

#### 한천분해 균주의 동정

분리된 한천분해균 JA-1 균주의 형태학적, 배양적 및 생화학적 특징은 Table 2와 같다. JA-1 균주는 그람음성의 호기성 단간균으로 운동성이 있으며 생육을 위하여 0.1 M의 NaCl을 요구하였다. 탄소원으로는 이당류인 sucrose와 단당류로는 sucrose 분해산물인 dextrose와 fructose를 이용하였으며 한천의 구성성분인 galactose도 이용하는 것으로 나타났다. 16S rRNA 유전자 염기서열분석 결과 Gamma-Proteobacteria인 *Agarivorans albus*와 98%의 유사도를 보였으며, 여러가지 생화학적 특징 등도 *Agarivorans albus*와 유사하여[9] 분리균주를 *Agarivorans* 속으로 동정하고 *Agarivorans* sp. JA-1으로 명명하였다. 분리균주의 계통도를 통한 분류학적 위치는 Fig. 2와 같다. 본 연구와 같이 *Agarivorans* 속 세균이 내열성 한천

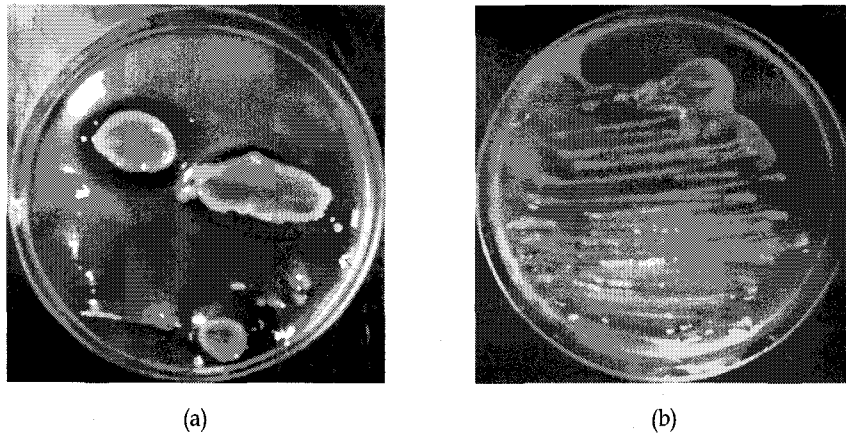


Fig. 1. Isolated strain and its agar-degrading activity in bacteria mixture (a) and pure culture (b) at agar plate.

Table 2. Phenotypic characteristics of isolated strain JA-1

Morphological characteristics	
Cell shape	small rod
Gram stain	-
Spore	-
Mortality	+
Cultural characteristics	
Colony shape	circular
Colony surface	smooth
Colony color	white
Oxidase	+
Catalase	+
Utilization of	
Dextrose	+
Fructose	+
Sucrose	+
Galactose	+
Maltose	-
Lactose	-
Xylose	-
Adnitol	-
Arabinose	-
Sorbitol	-
Inositol	-
Mannitol	-
Starch	-

분해효소를 생산한다는 보고[12]도 있었다.

**분리균주의 생육과 한천분해효소 생산**

Fig. 3은 분리한 JA-1 균주가 50 ml의 marine broth 2216 이 들어있는 250 ml 삼각플라스크에서 배양하였을 때(30℃,

250 rpm) 보이는 생육양상과 한천분해효소 활성을 나타낸 것이다. 한천이 없을 때는 세균의 생장이 저조하였으며 18시간 이후에 세균농도가 감소하였다. 이는 영양원 부족에 의한 현상이라고 생각되었다. 한편 한천이 있을 때는 24시간까지 계속하여 성장하였고 세균농도가 높았다.

한천분해효소의 활성은 두 경우 모두 6시간 이후부터 증가하고 이후 배양시간에 따라 증가하는 양상을 보였지만 한천이 들어있는 배지가 2배 정도 높은 활성을 보였다. 또한 6시간 이후의 세포농도 대비 한천분해활성을 보면 한천의 존재 유무에 상관없이 비슷한 것으로 나타났다. 그리고 한천분해활성/세포농도(unit/ml/OD<sub>600</sub>/5)는 한천이 있을 때 12시간째가 최고 높았으며 세균성장 속도가 감소됨에 따라 비율도 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 한천분해효소는 성장의존성 산물(growth-related product)로 판단하였으며 한천분해효소는 항상 발현되는 것으로 생각되었다. 이후의 실험을 위한 조효소액은 한천분해활성/세포농도 비가 가장 높은 12시간까지 배양한 후 배양액을 원심분리하여(12000×g, 4℃, 10 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액을 사용하였다.

**온도에 따른 한천분해 효소의 활성**

Fig. 4는 한천분해효소가 각 온도별로 보이는 상대활성을 나타내는 그래프이다. 한천분해활성은 40℃에서 55,500 units/L로 최고였으며 30℃도 유사한 것으로 나타났다. 그리고 40℃의 반응온도에서 나타난 효소의 unit를 기준으로 하였을 때 50℃에서 87%, 60℃에서 83%, 70℃에서 77%의 잔존활성을 나타내었으며 80℃까지 70%의 잔존활성을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 양상은 Vera 등[15]의 결과와는 달리 한천분해효소가 내열성 효소인 것으로 생각되었고, 각 온도에서의 상대활성은 같은 buffer와 *Agarivorans* 속 세균에서 유래한 내열성 한천분해효소를 사용한 Ohta 등[11,12] 보다 최대 80% 정도 우수한 것으로 나타나 산업적 유용성이 클 것으로 기대된다. 한천분해효소는[5] 한천과 한천올리고당을 분해하여 기능성을 보이는 neoagarobiose를 생성하는 것으

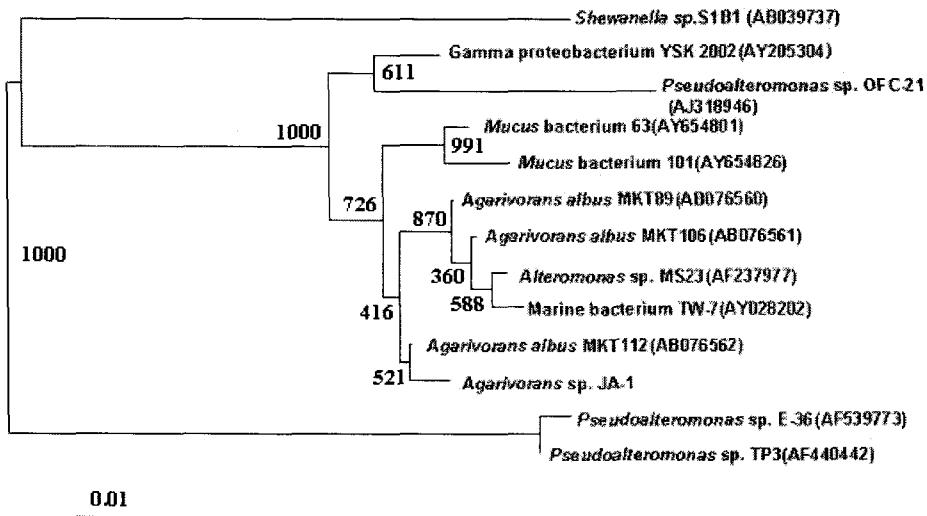


Fig. 2. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence of *Agarivorans sp. JA-1* comparing with members of *Agarivorans* and related genera. The numbers at the branch node are bootstrap values and numbers in parenthesis are access numbers in NCBI.

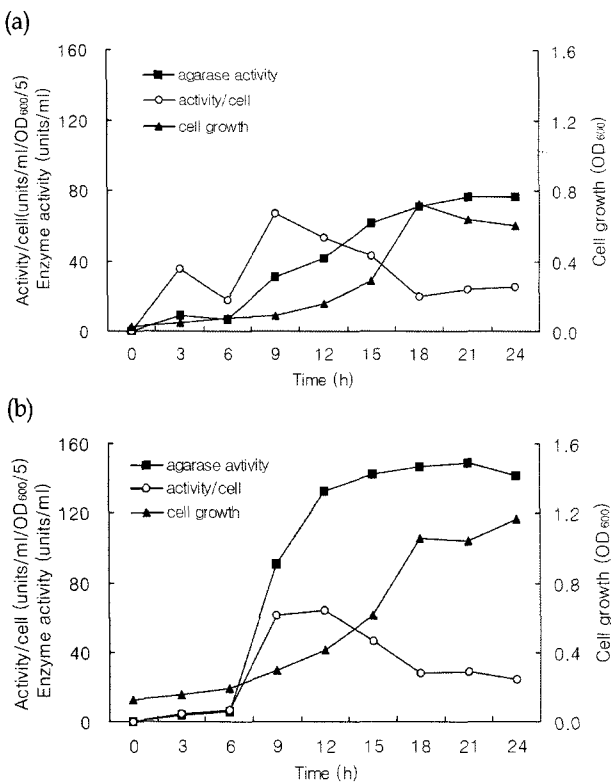


Fig. 3. Cell growth and agarase activity of *Agarivorans sp. JA-1* without (a) and with (b) 0.2% agar. (■ agarase activity [units/ml], ○ activity/cell [units/ml/OD<sub>600</sub>/5], ▲ cell growth [OD<sub>600</sub>])

로 보고되어[14] 40℃ 이하에서 고형화되어 효소처리가 어려운 한천을 이용한 기능성올리고당 생성에 본 연구에서 분리한 균주가 생산하는 agarase가 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

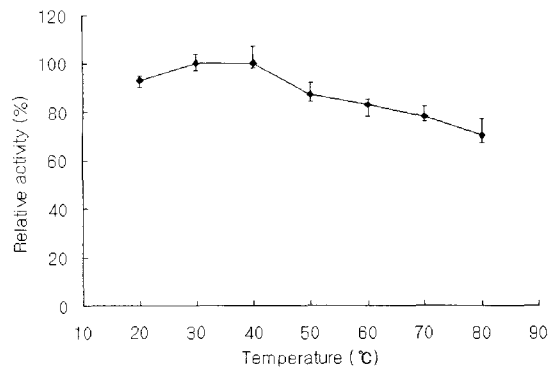


Fig. 4. Effect of temperature on agarase activity (%).

**pH에 따른 한천분해 효소의 활성**

Fig. 5에 각 pH에서 보이는 한천분해효소의 활성을 나타내고 있다. 효소의 활성은 pH 5.9범위에서 90% 이상이 유지

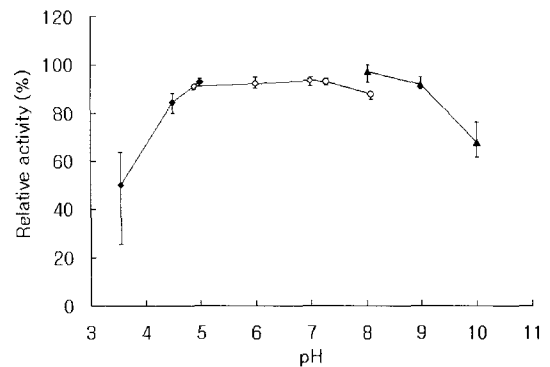


Fig. 5. Effect of pH on agarase activity (%). (● 100mM sodium acetate, pH 3.6-5.0; ○ 20mM sodium phosphate, pH 4.9-8.1; ▲ 50mM Glycine NaOH, pH 8.04-10.0)

되는 것으로 나타났고 이는 완충용액의 종류와 크게 상관없는 것을 알 수 있었다. 사용한 완충용액과 pH 중 최고의 활성을 나타내는 것은 50 mM glycine NaOH 완충용액에서 pH 8.04로 나타났다. 이는 *Vibrio* sp. JT0107의 pH 8.0과[14] 유사하였으며 *Bacillus cereus* ASK 202의 pH 7.8보다는[8] 다소 높았고 *Pseudomonas* sp. PT-5의 pH 8.5보다는[16] 낮은 것이었다. 본 균주가 생산하는 agarase는 높은 효소활성을 보이는 pH의 범위가 비교적 넓어 기능성 한천올리고당 생산에 활용도가 높을 것으로 기대할 수 있다.

요 약

제주도 동북해역의 해수에서 한천분해활성을 보이는 해양성 세균을 분리하였으며 16S rDNA 유전자 염기서열분석과 형태학적, 배양적 및 생화학적 특징을 조사하여 해양기원의 *Agarivorans* 속에 속하는 균주임을 확인하고 *Agarivorans* sp. JA-1으로 명명하였다. *Agarivorans* sp. JA-1이 생성하는 한천분해효소(agarase)는 한천의 존재유무에 상관없이 발현되며 성장의존성인 것으로 확인되었고 효소활성을 위한 최적 pH는 pH 8.04 (50 mM glycine NaOH 완충용액)이고 최적 온도는 40℃로 나타났다. 한천분해효소는 기능성올리고당 생산이 가능한 베타-한천분해효소이며 내열성을 보여 60℃까지 80% 이상 그리고 80℃까지 70%의 잔존활성을 보이는 것으로 나타났다. 분리한 *Agarivorans* sp. JA-1 균주가 나타내는 한천분해효소를 이용하여 40℃ 이상에서 액체상태로 있는 한천을 이용한 기능성올리고당 생산에 유용한 것으로 생각되었다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부 주관 마린바이오21사업 해양·극한생물 분자유전체연구단의 지원을 받아 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Allouch, J., M. Jam, W. Helbert, T. Barbeyron, B. Kloareg, B. Henrissat and M. Czjzek. 2003. The three-dimensional structures of two β-agarases. *The J. Biol. Chem.* **278**, 47171-47180.
2. Araki, T., Z. Lu and T. Morishita. 1998 Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verucosa* (Rhodophyta). *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 193-197.
3. Do, J.-H. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish. Soc.* **30**, 423-427.
4. Duckworth, M. and W. Yaphe. 1971. Structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**, 189-197.

5. <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>
6. Hwang, S.-H., S.-D. Ha, B.-J. Kim, H.-J. Kim and J.-Y. Kong. 1999. Isolation and its optimal culture condition for high agarase-producing mutant. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 351-357.
7. Joo, D.-S., O.-S. Kim, S.-Y. Cho and C.-H. Cho. 2003. Preparation condition of agar oligosaccharide with organic acids. *J. Korean Fish. Soc.* **36**, 6-10.
8. Kim, B.-J., S.-H. Hwang, H.-J. Kim, Y.-S. Kang, S.-D. Ha and J.-Y. Kong. 1999. Characteristics of β-agarase produced by marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 96-102.
9. Kurahashi, M. and A. Yokota. 2004. *Agarivorans albus* gen. nov., sp. nov., a γ-proteobacterium isolated from marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Mic.* **54**, 693-697.
10. Lee, W.-K., B.-J. Kim, S.-D. Ha and J.-Y. Kong. 1999. Isolation and identification of marine bacterium *Cytophaga* sp. AYK301 and optimal culture condition for the production of agarase. *Korean J. Biotechnol. and Bioeng.* **14**, 572-577.
11. Ohta, Y., Y. Hatada, Y. Nogi, Z. Li, S. Ito and K. Horikishi. 2004. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 β-agarase from a deep sea *Microbulbifer*-like isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 266-275.
12. Ohta, Y., Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, Y. Hatada, S. Ito and Koki Horikishi. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β-agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. *Biosci. Biotech. Bioch.* **68**, 1073-1081.
13. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
14. Sugano, Y., I. Terada, M. Arita, 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.
15. 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**, 4378-4383.
16. Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu, H. Shegeiri and T. Shibata. 1991. Purification and some properties of agarase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agr. Biol. Chem.* **55**, 2531-2536.
17. Yoshizawa, Y., A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui and S. Kaminogawa. 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structurefunction relationships and improved solubility. *Biosci. Biotech. Bioch.* **59**, 1933-1939.
18. Zhong, Z., A. Toukdarian, D. Helinski, V. Knauf, S. Sykes, J. E. Wilkinson, C. O'Byrne, T. Shea, C. DeLoughery and R. Caspi. 2001. Sequence analysis of a 101-kilobase plasmid required for agar degradation by a *Microscilla* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5771-5779.