

제주도 연안 해양에서 분리한 한천분해 미생물 *Vibrio* sp. S4의 동정 및 내열성 agarase의 생화학적 특성

이창로^{1†}, 지원재^{2†}, 배창환², 홍순광^{1*}

¹명지대학교 생명과학정보학부

²국립생물자원관 유용자원분석과

Received: October 21, 2015 / Revised: November 13, 2015 / Accepted: November 13, 2015

Identification of a New Agar-hydrolyzing Bacterium *Vibrio* sp. S4 from the Seawater of Jeju Island and the Biochemical Characterization of Thermostable Agarase

Chang-Ro Lee^{1†}, Won-Jae Chi^{2†}, Chang-Hwan Bae², and Soon-Kwang Hong^{1*}

¹Department of Biological Science, Myongji University, Yongin 17058, Republic of Korea

²Biological and Genetic Resource Assessment Division, National Institute of Biological Resource, Incheon 22689, Republic of Korea

Agar-hydrolyzing bacteria were isolated from the coastal sea water of Jeju Island. One isolate, designated as S4, was selected for further study. The S4 cells were Gram-negative and rod-shaped with smooth beige surfaces and single polar flagellum. Cells were grown at 15–42°C, 0.5–5% (w/v) NaCl, between pH 6.0 and 9.0, and in media containing 0.5–5% (w/v) NaCl. The G+C content was 49.93 mol%. The major fatty acids (>15%) were C_{18:1ω7c}, C_{16:0} and Summed feature 3 (comprising C_{16:1ω7c/iso-C_{15:0} 2-OH}). Based on 16S rRNA sequencing and biochemical and chemotaxonomic characteristics, the strain was designated as *Vibrio* sp. S4. In liquid culture supplemented with 0.1% agar the cell density and agarase activity reached a maximum level in 72 h, while agarase activity in the culture without agar was negligible, implying agarase expression is induced by agar. The optimum pH and temperature for the extracellular crude agarase of S4 were 7.0 and 45°C, respectively. However, it also exhibited 98.6% and 87.6% at 40°C and 50°C, respectively, of the maximum activity seen at 45°C. The crude agarase hydrolyzed agarose into (neo)agarotetraose and (neo)agarohexaose.

Keywords: Marine bacterium, *Vibrio*, agarase, phylogenetic analysis

서론

한천(agar)은 홍조류 세포벽의 주요 구성 성분으로서 3-O-linked β-D-galactopyranose(G)와 4-O-linked α-L-1,3-anhydrogalactopyranose(LA), 또는 3-O-linked β-D-galactopyranose(G)와 4-O-linked α-L-galactopyranose-6-sulfate(L6S) 단위체로 구성되어 있다. 한천의 주요 성분인 agarose는 agarobiose(G-LA) 단위체가 반복되는 구조이며, porphyran은 porphyriobiose(G-L6S) 단위체의 반복 구조이다[13]. 결과적으로 한천은 agarobiose와 porphyriobiose의 혼

성 구조물이며 그 비율은 홍조류에 따라 다르게 분포하고, 때로는 단위체가 sulfoxyl, methoxyl, pyruvate 등의 잔기로 수식되기도 한다[11, 26].

한천의 구성당은 α-1,3 결합과 β-1,4 결합으로 교대로 연결되어 있으므로 한천의 완전가수분해에는 α-agarase와 β-agarase가 필요하다. α-agarase는 한천을 분해하여 3,6-anhydro-L-galactose를 환원말단에 갖는 일련의 한천올리고당(agarooligosaccharide)을 만들며, β-agarase는 D-galactose를 환원말단에 갖는 네오아가로올리고당(neoagarooligosaccharide)을 생산한다[3, 9]. (네오)아가로올리고당은 hydrolase에 의해서 최종적으로 3,6-anhydro-L-galactose와 D-galactose로 분해되는데, D-galactose는 chemical feedstock 또는 2차 발효를 통한 바이오 연료 생산 등에 사용될 수 있다. 3,6-anhydro-L-galactose는 미백 및 항염증 효과가 뛰어난 것으로 보고되었고[28], 2차 발효를 통한 바이오 연료 생산 등에

*Corresponding author

Tel: +82-31-330-6198, Fax: +82-31-335-8249

E-mail: skhong@mju.ac.kr

†These authors contributed equally to this work.

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

도 사용될 수 있어 홍조류 바이오메스의 자원으로서 이용가치가 확대되고 있다.

따라서 효율적으로 한천을 분해할 수 있는 한천분해효소 개발이 해양바이오메스 홍조류의 이용에 절대적으로 필요하다. 본 연구그룹은 활성이 뛰어난 고온성 agarase를 생산하는 신규 미생물을 분리하기 위해, 대한민국 제주도 연안의 해수로부터 agarase를 생산하는 신규 미생물을 확보하여 동정하고 그 특성을 규명하였다. 본 연구에서는 agarase 생산 균주 S4의 분리 및 동정, S4 균주가 생산하는 agarase 효소의 생화학적 특성을 서술하였다.

재료 및 방법

Agarase 생산 미생물의 분리

제주도 근해의 해수를 채취하여 멸균수에 10^{-1} – 10^{-5} 으로 희석한 후 ASW-YP 평판고체배지(6.1 g Tris base, 12.3 g $MgSO_4$, 0.74 g KCl, 0.13 g $(NH_4)_2HPO_4$, 17.5 g NaCl, 0.14 g $CaCl_2$, 1% yeast extract, 0.3% bacto peptone; per liter; pH 7.2)에 도말하였다. 도말한 평판고체배지는 40°C에서 1일간 배양한 후, Lugol's Iodine 용액(0.05 M Iodine in 0.12 M KI)으로 염색하여 colony 주변에 아가분해활성을 나타내 투명하게 보이는 colony를 300개 선별하였다. 이 중 최종적으로 활성이 우수한 균주 S4를 선택하여 본 연구에 사용하였다.

균주 S4의 형태적·생리적 특성 분석

균주 S4는 Gram stain kit(BD, USA)를 사용하여 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 균주 S4의 균체 크기 및 모양 그리고 flagella의 유무는 2일간 고체배지에서 배양된 균체를 1% phosphotungstic acid(PTA)로 염색한 후 투과전자현미경(JEM1010, JEOL, Japan)으로 관찰하였다. 탄소원 사용 및 발효, 효소생산 등의 생리적 특성은 API 20NE와 API ZYM kit(Biomérieux, France)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 단, 제공되는 배지에 NaCl을 최종농도 1%가 되도록 첨가하여 40°C에서 3일간 배양한 후 관찰하였다. 균주 S4의 성장 특성은, NaCl을 최종농도 0, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20%(w/v)가 되도록 첨가한 ASW-YP 고체배지에 균주를 접종한 후 3일간 배양하여 성장을 관찰하였다. pH 변화에 따른 균주 S4의 성장은, pH 4.0–11.0(pH 1.0의 간격)의 고체배지를 만들어 균주를 접종한 후 3일간 배양하여 성장을 관찰하였다. 또한 배양온도에 따른 성장은 4, 15, 25, 37, 40, 45°C에서 각각 3일간 배양하여 성장 정도를 관찰하였다.

S4 균주의 생화학적 특성 분석

생화학적 특성 분석에는 균주 S4를 ASW-YP 고체배지로

40°C에서 2일간 배양 후 회수된 균체를 사용하였다. 균체의 지방산은 methyl ester화[17] 시킨 fatty acid methyl esters (FAME) 혼합물을 Microbial Identification System(MIDI Inc., USA)의 지침에 따라 gas chromatography(GC) 분석법으로 분석하였다[20]. Genomic DNA의 G+C 농도는 역상-HPLC를 이용하였다[15].

16S rRNA 유전자 서열 해독 및 계통수 제작

균주 S4를 ASW-YP 액체배지에서 2일간 진탕 배양 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체만을 회수하였다. 회수된 균체로부터 genomic DNA를 Genomic DNA extraction kit(DyneBio, Korea)로 추출하여 PCR 주형으로 사용하였다. 16S rRNA 유전자는 bacterial universal primer (27F와 1492R)를 사용하여 증폭하였으며[21], 증폭된 DNA 단편은 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 클로닝 한 후 염기서열을 분석하였다. 분석된 16S rRNA 유전자 서열은 GenBank에 JN578474로 등록하였으며, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 BlastN program [1]을 사용하여 GenBank database의 정보로부터 염기서열의 상동성 검사를 수행하였다. 또한 EzTaxon database (<http://www.eztaxon.org/>)로부터 표준 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 확보하여 계통발생적 연관성을 분석하였다[7]. 확보된 염기서열들 간의 Multi alignment는 ClustalW program[25]을 사용하였고 5'-과 3'-말단의 gap은 BioEdit program[10]으로 편집하였다. 진화적 거리(evolutionary distance matrix)는 Kimura's two-parameter evolutionary model[12]에 의해 계산되었고, Neighbour-joining(NJ) 법[19]으로 계통수를 제작하였다. 신뢰도(bootstrap value)는 1,000 회의 재구성된 자료로부터 새롭게 tree를 제작하여 계산하였다.

균주 S4의 성장 및 agarase 생산

균주 S4를 ASW-YP 액체배지와 최종농도 0.1%로 agar가 첨가된 ASW-YPA 액체배지에 각각 5일 동안 배양하면서 (40°C, 180 rpm), 24시간 간격으로 샘플을 채취하였다. 600 nm에서 흡광도를 측정하여 샘플의 균체 성장을 측정하였고, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 샘플 상등액을 취하여 agarase 활성을 측정하였다. Agarase 활성은 0.2% agarose를 기질로 하는 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)법[8]으로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단, 효소반응은 20 mM Tris-Cl buffer(pH 7.0)를 사용하여 40°C에서 수행하였다. Agarase 1 unit(U)는 사용한 반응조건에서 1분당 1 μ mol의 galactose를 생산할 수 있는 효소량으로 정의하였다. 환원당 정량을 위한 표준곡선 제작은 galactose를 사용하였다.

Agarase 효소활성에 미치는 온도와 pH의 효과

균주 S4를 ASW-YPA 액체배지 10 ml에서 72시간 배양한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체가 제거된 배양액을 회수하였다. 회수된 배양액 8 ml를 ultrafiltration (10 kDa cut-off, PALL, USA)으로 500 μ l까지 농축하여 조효소로 사용하였다. 온도 조건에 따른 S4의 총 agarase의 효소활성을 조사하기 위해서, 준비된 조효소를 이용하여 20, 30, 37, 40, 45, 50°C에서 각각 agarose를 기질로 하는 효소반응(20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.0)을 10분간 실시하여, DNS법으로 활성을 측정하였다[16]. pH 조건에 따른 agarase의 효소활성은 pH 6.0–10.0(pH 1.0의 간격)의 조건에서 40°C에서 10분간 효소반응을 실시하여 측정하였다. 이 때 사용된 버퍼는 20 mM MOPS buffer(pH 6–7), 20 mM Tris-Cl buffer(pH 7–9), 20 mM Glycine-NaOH buffer(pH 9–10)이다.

Thin layer chromatography 분석

조효소 10 μ l를 0.2% agarose가 포함된 20 mM Tris-Cl buffer(pH 7.0)에 첨가한 후 40°C에서 24시간 동안 반응하였다. 반응액은 Temujin 등[23]에 의해서 서술된 방법에 따라서 silica gel 60 plate(Merck, USA)를 이용한 Thin layer chromatography(TLC)를 수행하여 가수분해산물을 분석하였다.

결과 및 고찰

균주 S4의 형태적-생리적 특성

균주 S4는 그람-음성균이며, ASW-YP 한천배지 위에서 베이지색의 둥근 콜로니를 형성하였다. 전자현미경하에서 S4는 단일 polar flagellum을 갖는 것으로 관찰되었다(Fig. 1).

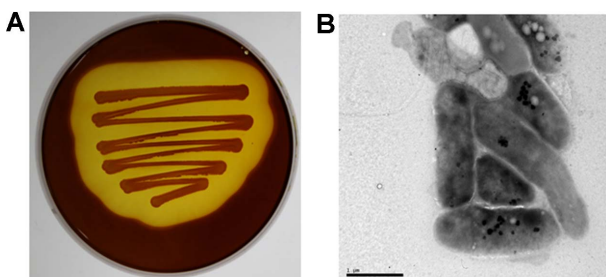


Fig. 1. Phenotypic characteristics of agarolytic bacterial strain S4. (A) Detection of agarolytic activity on agar plates. Strain S4 was cultivated on ASW-YP agar plate at 40°C for 2 days. The agar plate was stained with Lugol's iodine solution. (B) Transmission electron microscopy (TEM) analysis. Strain S4 grown on ASW-YP agar plate at 40°C for 2 days was negatively stained and observed using transmission electron microscopy. Scale bar = 1 μ m.

균주 S4는 15–42°C, pH 6–9, 0.5–5%(w/v) NaCl 농도에서 잘 자라며, chloramphenicol(25 μ g)에 감수성을 보이는 반면, ampicillin(100 μ g), apramycin(100 μ g), kanamycin(100 μ g), neomycin(100 μ g), thiostrepton(100 μ g)에는 저항성을 보였다. 균주 S4는 nitrate 환원, indole 생산(weak), arginine dihydrolase, urease(가변적), alkaline phosphatase, esterase (C4 and C8), leucine arylamidase, valine arylamidase(약함), acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β -glucosidase(가변적)에 양성 반응을 나타낸 반면, Voges-Proskauer, gelatinase, lipase(C14), cystine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminase, α -mannosidase, α -fucosidase에는 음성 반응을 보였다. D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-maltose, D-lactose, D-trehalose, D-mannitol, D-melibiose(약함), D-xylose, D-saccharose, methyl- α -D-glucopyranoside(약함), N-acetylglucosamine로부터 유기산 생성이 관찰되었다(Table 1).

균주 S4의 생화학적 특성

균주 S4의 염색체 DNA 내 G+C 농도는 49.93%이며, 세포 내 주요지방산(>15%)은 C_{18:1}07c, C_{16:0}, Summed feature 3 (comprising C_{16:1}07c/iso-C_{15:0} 2-OH) 등으로 분석되었다.

균주 S4의 계통발생학적 연관관계 규명

균주 S4의 16S rRNA 유전자 서열을 해독하여 NCBI의 BlastN 프로그램으로 다른 미생물들과의 상동성을 조사한 결과, S4는 *Vibrio* 속의 균들과 높은 상동성을 보였다. 특히, 균주 S4의 16S rRNA 유전자 서열은 *Vibrio variabilis* R-40492^T(99.23%), *Vibrio neptunius* LMG 20536^T(98.31%), *Vibrio coralliilyticus* ATCC BAA-450^T(97.09%) 등과 높은 상동성을 나타냈다(Table 1). 이러한 결과로부터 균주 S4는 *Vibrio* 속의 한 종으로 판단되었다. 16S rRNA 유전자 서열을 토대로 표준균주들과의 계통발생적 연관관계를 규명하고자 N-J 법으로 계통수를 제작하였다. 그 결과, 균주 S4는 16S rRNA 유전자 서열 상동성 결과와 마찬가지로 *V. neptunius* LMG 20536^T(98.31%), *V. coralliilyticus* ATCC BAA-450^T(97.09%), *V. variabilis* R-40492^T(99.23%) 등과 clade를 형성하였으며, 특히 *V. variabilis* R-40492^T와 보다 밀접한 subcluster를 형성하였다(Fig. 2).

전술한 바와 같이 형태학적·생리학적 특성들과 유전학적·생화학적 특성들을 토대로 균주 S4는 *Vibrio* 속의 미생물로 분류될 수 있다. 그러나 S4 균주는 *Vibrio* 속의 계통발생적 연관관계가 높은 다른 종 *V. neptunius* LMG 20536^T, *V. coralliilyticus* ATCC BAA-450^T, *V. variabilis* R-40492^T들과는 생리·생화학적 특성들에서 많은 차이점들을 보였다

Table 1. Phenotypic characteristics of strain S4 and its closely related type strains of genus *Vibrio*.

Strains: 1, Strain S4; 2, *V. variabilis* R-40492^T [6]; 3, *V. neptunius* LMG20536^T [24]; *V. corallilyticus* YB1^T [2, 6]. All strains did not grow at 0% and 8% NaCl. Symbols : +, positive; -, negative; ND, Not detected/not mentioned; W, weak positive; V, vary

Characteristic	1	2*	3*	4*
G+C content (mol%)	49.93	46.8	46	45.6
Growth at 40°C	+	+	-	ND
Colony color	beige	beige	beige	yellow
Enzyme activity:				
Lipase (C14)	-	-	+	W
Cystine arylamidase	-	+	-	-
Trypsin	-	+	+	+
Acid phosphatase	+	+	-	ND
Naphtol-AS-BI-phosphorylase	+	+	-	ND
α-galactosidase	-	+	-	ND
β-galactosidase	-	+	-	+
α -glucosidase	-	+	-	ND
β -glucosidase	V ^a	-	-	+
N-acetyl-β-glucosaminase	-	+	+	-
Urease	V ^b	-	-	-
Acidification from:				
D-mannitol	+	+	-	V
D-melibiose	W	-	-	-
Voges Proskauer test	-	-	+	+

^aPositive reaction in API 20NE strip (esculin hydrolysis) but not in API ZYM strip (6-Br-2-naphthyl-β-D-glucopyranoside hydrolysis).

^bPositive reaction in API 20NE strip but not in API Staph strip. All strain positive for glucose fermentation and nitrate reduction.

*Data were obtained from the cited literatures

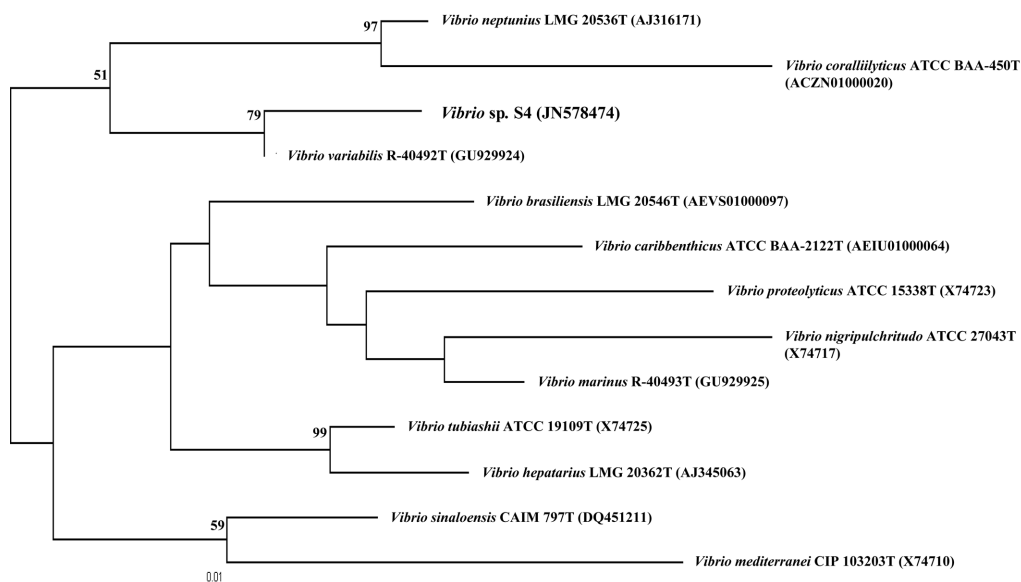


Fig. 2. Neighbour-joining (NJ) phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. Distances was determined according to the Kimura's two-parameter evolutionary model and bootstrap values (>50%) based on 1,000 replicates are listed as percentages at nodes. Nucleotide sequence accession numbers are given in parentheses. Scale bar, 0.01 substitutions per 100 nucleotides.

(Table 1). 또한 균주 S4는 N-J phylogenetic tree에서 계통 발생학적 연관관계가 높은 표준 균주들과 분리된 monophyletic clade를 형성하였다. 이러한 결과들은 균주 S4가 지금까지 보고된 *Vibrio* 속의 미생물과는 구별되는 균주임을 시사한다. 결론적으로, 계통발생학적 연관관계가 높은 균주들과 S4의 형태적·생화학적 특성의 많은 차이점을 감안하여 균주 S4를 *Vibrio* sp. S4로 명명하였다.

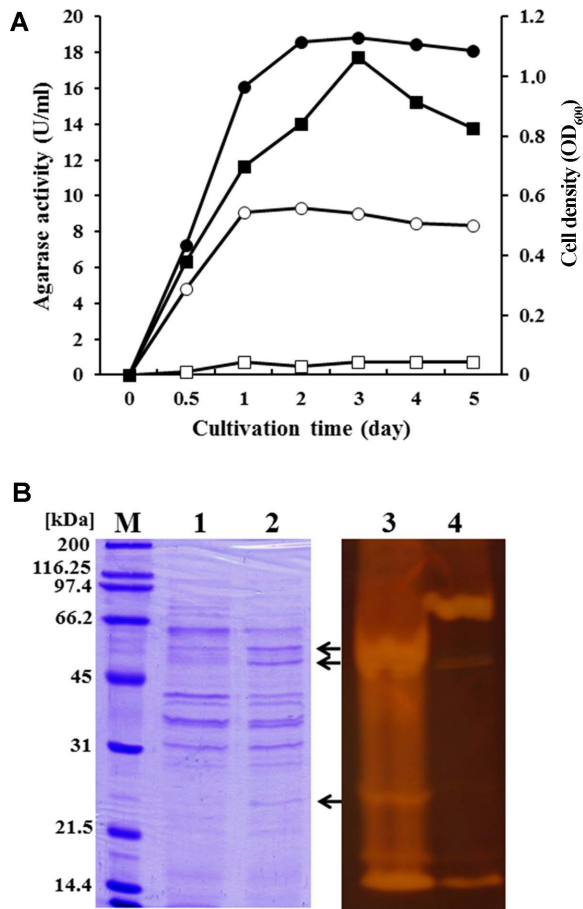


Fig. 3. Cell growth and agarase activity of strain S4 in liquid culture. (A) Cell growth and agarase activity. Strain S4 was cultivated in ASW-YP based broth and agarase activity was measured by DNS method. Open circle and square indicate cell growth and agarase activity in ASW-YP broth, respectively. Filled circle and square indicate cell growth and agarase activity in ASW-YPA supplemented with 0.1% agar. All data shown are mean values from at least three replicate experiments. (B) SDS-PAGE analysis of total extracellular proteins of strain S4. The protein samples were prepared from 72 h cultured broth of strain S4 and concentrated by ultrafiltration. M, molecular weight standards; lane 1, proteins prepared from culture broth in ASW-YP; lane 2, proteins prepared from culture broth in ASW-YPA. lane 3, zymogram of proteins prepared from culture broth in ASW-YPA. lane 4, zymogram of proteins prepared from culture broth in ASW-YP. Proteins showing enhanced production by addition of agar are indicated by arrows.

균주 S4의 성장과 agarase 생산

균주 S4는 ASW-YP 배지에서 진탕 배양 시(37°C) 12시간 부터 급격히 성장하여 배양 24시간에 최고점($OD_{600} = 0.56$)에 도달한 후 서서히 성장이 감소하였다. 반면 agar가 포함된 ASW-YPA 배지에서는 배양 72시간에 최대 성장($OD_{600} = 1.13$)을 보인 후 점차 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3A). ASW-YP 배지에서의 agarase 활성은 거의 무시할 만한 수준(최고 0.7 U/ml)이었으나, ASW-YPA 배지에서는 72시간 배양 시 최고 활성(17.7 U/ml)을 보였다. 이러한 결과로부터 균주 S4는 배지에 공급된 agar로부터 탄소 및 에너지를 보충 함으로서 성장이 촉진될 뿐만 아니라 이에 필요한 agarase 생산도 유도적으로 생산하는 것으로 예상된다.

균체를 제거한 배양액의 세포의 총 단백질을 ultrafiltration (10 kDa cut-off)으로 농축하여 0.1% SDS-12% polyacrylamide gel 전기영동으로 분석한 결과, 적어도 세 종류의 단백질이 agar 첨가 배지(ASW-YPA)에서 생산이 유도되는 것으로 확인되었다. 이들 세 종류 단백질의 agarase 활성을 zymography 분석으로 확인하였으며, SDS-PAGE 전기영동결과 분자량은 대략 25-, 50-, 66-kDa 정도로 추정되었다(Fig. 3B). 또한, 약 80-kDa 정도의 agarase 활성을 갖는 단백질이 agar 무첨가 배지(ASW-YP)에서만 생산되는 것을 확인하였다. 따라서 agarase 효소 발현에도 정교한 조절시스템이 작동하고 있는 것으로 판단되며, 이들 단백질 발현 조절에 대한 구체적인 연구가 필요하다.

균주 S4가 생산하는 agarase의 효소적 특성

균주 S4가 세포외로 배출하는 총 agarase는 45°C와 pH 7.0의 조건에서 최대 활성을 보였다(Fig. 4). 또한 S4 agarase는 40°C에서는 최대 활성의 약 98.6%의 활성을 보이고 50°C에서는 최대 활성의 약 87.6%의 활성이 관찰되었다. 따라서 균주 S4가 생산하는 agarase는 40–50°C 범위에서 높은 효소활성을 유지하는 내열성 agarase로 판단된다(Fig. 4A). 40°C에서 효소반응을 유도하였을 때, pH 7.0에서 최대 활성이 관찰되었고 pH 10.0에서는 최대 활성의 약 40% 미만의 활성만이 관찰 되었다(Fig. 4B).

균주 S4의 24시간 배양액으로부터 준비된 조효소를 이용하여 agarose를 기질로 하는 효소반응을 유도한 후 반응산물을 TLC로 분석하였다(Fig. 5). 그 결과, 균주 S4에 의해서 세포외부로 생산되는 agarase는 agarose를 분해하여 (neo)agarotetraose와 (neo)agarohexaose를 최종산물로 생산할 수 있음을 확인하였다.

지금까지 많은 종류의 해양미생물 또는 극소수의 토양미생물로부터 agarase 생산이 보고되어 왔다. 하지만 대부분의 경우 agarase의 효소 활성이 35–40°C 범위에서 활성을 보이는 중온성 효소이다. 실제 한천의 효소적 분해과정에서 심

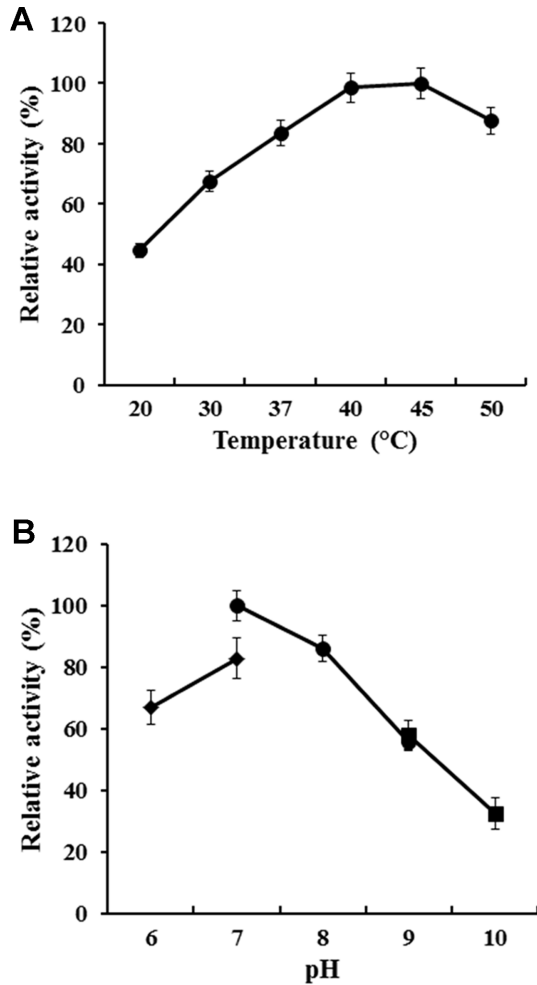


Fig. 4. Biochemical properties of the extracellular agarases. (A) Effect of temperature on agarase activity. The reaction was carried out at pH 7.0 at various temperatures. The values obtained at 45°C were taken to be 100%. The relative activities are the averages from three independent experiments. (B) Effect of pH on agarase activity. The reaction was carried out at 40°C at various pH conditions. The values obtained at pH 7.0 were taken to be 100%. -◆-, 20 mM MOPS buffer; -●-, 20 mM Tris-Cl buffer; -■-, 20 mM Glycine-NaOH buffer. All data shown are mean values from at least three replicate experiments.

각한 제한요소가 효소의 작용 온도이다. 한천은 상온에서 겔화 되는 특성이 있어 중온성 agarase를 사용할 경우 0.5% 이하의 농도에서만 효소반응이 가능하다. 만일 agarase의 작용온도가 43°C 이상이 된다면 1.5% 정도의 한천농도까지도 효소반응이 가능해지고 경제성 면에서 많은 이점을 갖게 된다. 그러나 현재까지 지금까지 43°C 이상에서 작용하는 효소의 보고는 그렇게 많지 않다(Table 2). 보고에 의하면 *Microbulbifer JAMB-A7* 가 생산하는 agarase는 50°C [18], *Microbulbifer thermotolerans JAMB-A94*가 생산하는 MtAgaA

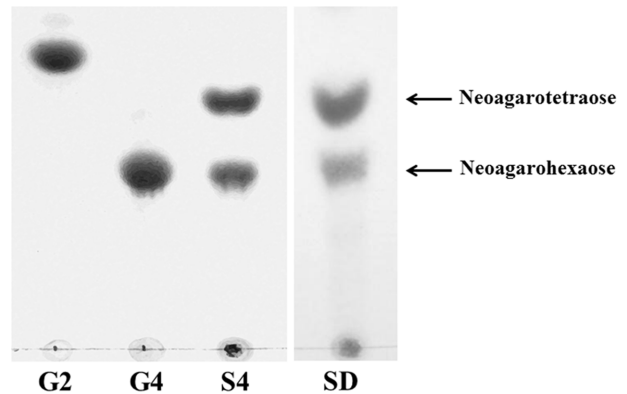


Fig. 5. Thin layer chromatography (TLC) analysis of the agarose hydrolysate by S4 crude agarase. The hydrolysis reactions were carried out at 40°C for 24 h in 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.0) containing 0.2% agarose and then separated on a Silica Gel 60 TLC plate. G2, galactobiose; G4, galactotetraose; S4, hydrolyzed sample by S4 agarase; SD, neoagarotetraose and neoagarohexaose prepared with DagA [23]. The spots corresponding to neoagarotetraose and neoagarohexaose are depicted by arrows.

agarase[22]는 55°C에서 최대 활성을 갖는다. 본 연구실에서도 두 종의 *Pseudoalteromonas*로부터 45°C에서 최대활성을 보이는 agarase를 보고한 바 있다[4, 5]. 최근에는 60°C와 70°C에서 최대활성을 보이는 agarase가 *Catenovulum agarivorans* YM01[8]과 *Bacillus* sp. BI-3 70 [14]에서 보고되기도 하였다.

한천올리고당은 항산화 효과, 미백효과, 면역활성 증진 효과 등의 기능성을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다[27]. 본 연구실에서도 한천올리고당이 당노 및 비만, 면역활성 증진에 유의한 효과를 보이고 있음을 보고한 바 있으며, 특히 neoagarotetraose와 neoagarohexaose의 효과가 탁월함을 입증하였다(대한민국 특허 출원번호 10-2012-0128087, 10-2013-0112706). 따라서 본 연구에서 사용한 *Vibrio* sp. S4 균주는 재조합 효소를 만들지 않고 균체 발효액을 이용하여 45°C에서 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 제조할 수 있는 공정에 사용할 수 있는 탁월한 장점을 갖고 있다.

요 약

대한민국 제주도 연안 해수로부터 agarase를 생산하는 균주 S4를 분리하였다. 균주 S4는 그람-음성의 막대형 세포로 부드러운 베이지색 원형 콜로니를 형성하며, 한 개의 극성 편모를 갖는다. S4 균주는 15-42°C, 0.5-5%(w/v) NaCl, pH 6.0-9.0, 0.5-5%(w/v) NaCl 농도에서 안정된 성장을 보인다. S4 균주의 G+C content는 49.93 mol%, 세포내 주요 지방산 (>15%)은 C_{18:1}ω7c, C_{16:0}, Summed feature 3(comprising

Table 2. Summary of thermostable β -agarases from literatures.

Strain	Agarase name	Glycosyl hydrolase family	Optimum temperature ($^{\circ}$ C)	Final product from agarose	Reference
<i>Vibrio</i> sp. S4	-	-	45	neoagarotetraose neoagarohexaose	This study
<i>Pseudoalteromonas hodoensis</i>	AgaA7	-	45	neoagarotetraose neoagarohexaose neoagarooctaose(minor)	[5]
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. H9	AgaH92	16	45	neoagarotetraose neoagarohexaose	[4]
<i>Catenovulum agarivorans</i> YM01T	Agarase YM01-3	16	60	neoagarotetraose neoagarohexaose	[8]
<i>Bacillus</i> sp. BI-3	-	-	70	neoagarobiose	[14]
<i>Microbulbifer thermotolerans</i> JAMB-A94	MtAgaA	16	55	neoagarotetraose	[22]
<i>Microbulbifer</i> JAMB-A7	-	16	50	neoagarotetraose	[18]

C_{16:1 ω 7c}/iso-C_{15:0} 2-OH)이다. 16S rRNA 염기서열, 생화학적 및 분류학적 특징에 기초하여 S4 균주를 *Vibrio* sp. S4로 명명하였다. 0.1% agar를 첨가한 액체배지에서 S4 균주는 72시간에 세포농도와 agarase 활성이 최대치를 보였다. 반면, agar를 첨가하지 않은 배양액에서의 agarase 활성은 무시할만한 수준이었으며, 이는 균주의 agarase 유전자 발현이 agar에 의해 유도됨을 시사하고 있다. 균주 S4가 세포외부로 분비하는 총 agarase는 45 $^{\circ}$ C와 pH 7.0에서 최상의 효소 활성을 보였으며, agarose를 분해하여 (neo)agarotetraose와 (neo)agarohexaose를 생산하였다.

Acknowledgments

This research was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR201529201).

References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang A, Miller W, et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base.
- Ben-Haim Y, Thompson FL, Thompson CC, Cnockaert MC, Hoste B, Swings J, et al. 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 309–315.
- Chi WJ, Chang YK, Hong SK. 2012. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 917–930.
- Chi WJ, Lee CR, Dugerjonjuu S, Park JS, Kang DK, Hong SK. 2015. Biochemical characterization of a novel iron-dependent GH16 β -agarase, AgaH92, from an agarolytic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. H9. *FEMS Microbiol. Lett.* **362**(7) doi: 10.1093/femsle/fnv035.
- Chi WJ, Park JS, Kang DK, Hong SK. 2014. Production and characterization of a novel thermostable extracellular agarase from *Pseudoalteromonas hodoensis* newly isolated from the West Sea of South Korea. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **173**: 1703–1716.
- Chimetto LA, Cleenwerck I, Moreira APB, Brocchi M, Willems A, Vos PD, et al. 2011. *Vibrio variabilis* sp. nov. and *Vibrio marinus* sp. nov., isolated from *Palythoa caribaeorum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* Doi:10.1099/ijs.0.026997-0.
- Chun J, Lee JH, Jung YY, Kim MJ, Kim SI, Kim BK, et al. 2007. ExTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2259–2261.
- Cui F, Dong S, Shi X, Zhao X, Zhang XH. 2014. Overexpression and characterization of a novel thermostable β -agarase YM01-3, from marine bacterium *Catenovulum agarivorans* YM01(T). *Mar. Drugs* **12**: 2731–2747.
- Duckworth M, Yaphe W. 1971. Structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**: 189–197.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95–98.
- Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czejek M, Michel G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**: 908–912.
- Kimura M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Knutsen SH, Myslabodski DE, Larsen B, Usov AI. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina* **37**: 163–169.

14. Li J, Sha Y, Seswita-Zilda D, Hu Q, He P. 2014. Purification and characterization of thermostable agarase from *Bacillus* sp. BI-3, a thermophilic bacterium isolated from hot spring. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 19–25.
15. Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 159–167.
16. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
17. Miller L, Berger T. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard Application note. pp. 228–241.
18. Ohta Y, Hatada Y, Nogi Y, Miyazaki M, Li Z, Akita M, et al. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 505–514.
19. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
20. Sasser M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Inc., Newark, DE, USA.
21. Suzuki MT, Giovannoni SJ. 1996. Bias caused by template annealing in the amplification of mixture of 16S rRNA genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 625–630.
22. Takagi E, Hatada Y, Akita M, Ohta Y, Yokoi G, Miyazaki T, et al. 2015. Crystal structure of the catalytic domain of a GH16 β -agarase from a deep-sea bacterium, *Microbulbifer thermotolerans* JAMB-A94. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**: 625–632.
23. Temuujin U, Chi WJ, Lee SY, Chang YK, Hong SK. 2011. Overexpression and biochemical characterization of DagA from *Streptomyces coelicolor* A3(2): an endo-type β -agarase producing neoagarotetraose and neoagarohexaose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 749–759.
24. Thompson FL, Li Y, Gomez-Gil B, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, et al. 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 245–252.
25. Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
26. Usov AI. 1998. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloids* **12**: 301–308.
27. Xiao TF, Kim SM. 2010. Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characterization and applications. *Mar. Drugs* **8**: 200–218.
28. Yun EJ, Lee S, Kim JH, Kim BB, Kim HT, Lee SH, et al. 2013. Enzymatic production of 3,6-anhydro-L-galactose from agarose and its purification and in vitro skin whitening and anti-inflammatory activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**: 2961–2970.