

Characterization of Agarase from an Isolated Marine Bacterium, *Simiduia* sp. SH-1

Sol-Ji Lee¹, Soo-Jeong Oh², Dong-Geun Lee^{1,2} and Sang-Hyeon Lee^{1,2*}

¹Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received July 23, 2015 / Revised September 16, 2015 / Accepted September 20, 2015

Agarase from a novel agar-degrading bacterium isolated from seawater in Namhae at Gyeongsangnam-do province of Korea was characterized. The SH-1 strain was selected from thousands of colonies on Marine agar 2216 media. Almost full 16S rRNA gene sequence of the agarolytic SH-1 strain showed 99% similarity with that of bacteria of *Simiduia* genus and named as *Simiduia* sp. SH-1. Agarase production was growth related, and activity was declined from stationary phase. Secreted agarase was prepared from culture media and characterized. It showed maximum activity of 698.6 units/L at pH 7.0 and 30°C in 20 mM Tris-HCl buffer. Agarase activity decreased as the temperature increased from an optimum of 30°C, with 90% and 75% activity at 40°C and 50°C, respectively. Agarase was not heat resistant. Slightly lower agarase activity was observed at pH 6.0 than at pH 7.0, without statistical difference, and 80% and 75% activity were observed at pH 5.0 and 8.0, respectively. Neoagarotetraose and neoagarobiose were the main final products of agarose, indicating that it is β -agarase. *Simiduia* sp. SH-1 and its β -agarase would be useful for the industrial production of neoagarotetraose and neoagarobiose, which have a whitening effect on skin, delaying starch degradation, and inhibiting bacterial growth.

Key words : β -Agarase, marine bacterium, neoagarobiose, neoagarotetraose, *Simiduia* sp. SH-1

서 론

한천(agar)은 홍조류의 세포벽에서 유래되며, galactose 및 galactopyranose의 중합체로서 agarose와 agaropectin으로 구성된 다당류이다[20, 21]. 한천은 오래 전부터 식품산업, 의약품산업, 화장품산업에 널리 이용되어 왔으며, 국내에서 연간 생산량이 약 3,600 ton에 이르는 풍부한 수산자원이다. 하지만 국내 생산량의 90% 이상이 방치되고 있고, 약 6.5% 정도만이 단순가공으로 처리되어 값싼 원료로 사용되고 있다. 특히, 한천을 원료로 생산되는 시약용이나 의약품용 등의 고가 제품의 경우는 오히려 수입에 의존하고 있어, 국내 연안에 풍부한 국내 수산자원인 한천의 새로운 용도개발 및 부가가치 향상에 관한 연구가 요구되고 있는 실정이다[4, 7, 8].

한천의 약 70%를 차지하는 agarose는 황산기 함량이 적고 강한 겔 형성능을 부여하는 성분이며, 1→3결합으로 연결된 β -D-galactose와 1→4결합으로 연결된 3,6-anhydro- α -L-galactose가 반복적으로 연결되어 있는 중성다당류이고, agar-

opectin은 agarose와 유사한 구조를 가지고 있으나 황산염, pyruvic acid, glucuronic acid 등의 치환기를 부분적으로 가지는 산성다당류이다[10, 17].

한천으로부터 한천올리고당을 생산하기 위한 대표적인 방법으로는 산가수분해법과 효소가수분해법 등이 있다. 산가수분해법의 경우는 반응 후 부산물이 생성되고, 중화과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있으며, 생성된 한천올리고당의 기능성이 떨어지는 문제가 있다. 반면, 효소가수분해법의 경우는 효소가 다당체의 특정부위에 특이적으로 작용함으로써 한천을 선택적으로 분해하여 활성형 한천올리고당을 쉽게 생산할 수 있는 장점이 있다. 따라서 한천올리고당을 산업적으로 이용하기 위해서는 한천분해효소에 관한 연구가 이루어져야 하며, 현재까지 새로운 한천분해효소를 생산하는 세균의 분리 및 미생물을 이용한 한천분해효소의 생산에 관한 연구 등이 있었다 [16, 20].

한천분해효소는 한천의 α -(1→3)결합을 분해하여 환원말단에 3,6-anhydro- α -L-galactose를 갖는 한천올리고당인 agarooligosaccharides를 생산하는 α -agarase와 β -(1→4)결합을 분해하여 환원말단에 D-galactose를 갖는 한천올리고당인 neoagarooligosaccharides를 생산하는 β -agarase로 나뉜다. Agarooligosaccharides의 경우는 항산화 및 항암 효과를 가지고, neoagarooligosaccharides의 경우는 세균생장 억제, 전분노화 방지, 대식세포 활성화, 보습효과, 미백효과 등의 많은 유용한 효과를 가지는 것으로 알려져 있다[1, 11]. 이처럼 다양한 생물

*Corresponding author

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

E-mail : slee@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

학적 기능이 규명된 한천올리고당을 식품, 화장품, 의약품 등의 많은 산업 분야에 활용하여 부가가치가 높은 제품을 생산할 수 있을 것으로 기대하고 있다[2, 23].

본 연구에서는 한천분해능이 뛰어난 신규의 해양유래 세균을 국내 연안의 해수에서 분리하여 동정하였고, 분리한 해양성 세균이 생산하는 한천분해효소의 생화학적 특성을 검토함으로써, 산업적으로 유용하게 이용될 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

한천분해 균주의 분리 배양

경상남도 남해군 미조면 연안의 해수를 멸균종류수로 연속적으로 희석하여 시료액을 제조하였다. 배양배지로는 일반적인 해양세균 분리 및 증균용 배지인 Marine broth 2216 (Difco, Detroit, USA) 배지에 agar (LPS solution, Daejeon, KOREA)를 최종농도 1.2%로 첨가한 Marine Agar 2216 배지를 사용하였다. 희석된 시료액 100 μ l를 고체배지 위에 도말한 후에 30°C에서 배양하면서 한천분해활성에 의해 Marine agar 2216 배지를 함몰시키는 균주를 선별하였다.

한천분해 균주의 선정 및 동정

한천분해활성을 가진 균주들을 Marine agar 2216 배지에서 배양하면서 활성이 가장 우수한 SH-1 균주를 선별하였고, Marine agar 2216 배지에서 3차례 이상 순수분리하였다. Marine broth 배지 4 ml에 순수분리한 균주를 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 1일간 배양한 후, 배양액을 원심분리하여(3,000 \times g, 4°C, 15 min) 균체를 회수하였다. Wizard Genomic DNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 균체로부터 genomic DNA를 획득하였고, 16S rDNA 유전자 단편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. PCR primer들은 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였으며, 증폭된 DNA 단편은 PCR/ Gel Combo Kit (NucleoGen, Siheung, Korea)로 정제하였다. DNA 염기서열 분석은 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 분석된 염기서열은 BLAST를 사용하여 보고된 균주들과 유사도를 검토하였으며, Clustal 프로그램 (Clustal W2)을 이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 Neighbor-joining method와 Bootstrap method (n=1,000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

배양시간에 따른 세균의 성장과 효소활성

0.2%(w/v) agar가 포함된 Marine broth 배지(pH 7.6) 100 ml가 든 250 ml 플라스크에 순수분리한 균주를 접종하여 배양하면서(30°C, 250 rpm) 12시간마다 배양액 일부를 채취하여

생육양상과 한천분해효소의 활성을 측정하였다.

한천분해 균주의 생육 및 조효소액의 제조

Marine broth 배지 4 ml에 SH-1 균주를 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 1일간 배양한 후 배양된 액을 0.2% agar가 첨가된 Marine broth 배지 100 ml에 계대배양하였고, 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 3일간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여(3,000 \times g, 4°C, 15 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액 15 ml를 SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Scientific, USA)에 넣은 후 900 ml의 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)에 넣어 4°C에서 투석을 3회 실시하였다. 투석은 2시간마다 한번씩 완충용액을 교체하여 시행하였고, 마지막에는 12시간 이상 시행하였다. 투석이 완료된 조효소액은 Membrane filter (0.45 μ m, Milipore, USA)를 통과시킨 후에 4°C에서 냉장 보관하였다.

효소활성 측정

한천분해효소(agarase)의 활성은 반응산물의 환원당을 측정하는 방법인 DNS법으로 측정하였다. DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변법으로 실시하였다[2, 15]. 반응액 1 ml에 DNS용액(NaOH 13.2 g, 3,6-dinitrosalicylic acid 7.07 g, sodium sulfate 5.53 g, potassium tartrate (Rochelle salt) 204 g, phenol 5.07 g per ddH₂O 1l) 3 ml를 첨가하여 100°C에서 10분간 가열하고 반응시킨 후 흐르는 수돗물에 식히고, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표준물질로 D-galactose를 사용하였고, 1분당 1 μ mole의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1 unit (U)으로 정의하였다.

한천분해효소의 pH에 따른 활성측정

한천분해효소의 pH에 따른 활성을 측정하기 위하여 20 mM sodium acetate 완충용액(pH 3.0-5.0), 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 5.0-8.0), 20 mM GTA (3,3-dimethyl- glutamic acid, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) 완충용액(pH 8.0-9.0)을 이용하였다. 최종농도 0.2% (w/v)의 agarose (Promega, Wisconsin, USA)가 포함된 pH 3-9 범위의 세가지 완충용액을 중탕가열하고 30°C에서 냉각한 후 반응수조의 온도를 유지하면서 완충용액 1.0 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 한천분해효소의 활성을 측정하였다.

한천분해효소의 온도에 따른 활성측정

표준기질용액은 0.2%(w/v)의 agarose를 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)을 이용하였다. 기질용액을 중탕가열한 후 20, 30, 40, 50, 60, 70°C의 온도별로 냉각하였다. 처리된 기질용액 1.0 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 20-70°C의 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 한천분해효소의 활성을 측정하였다.

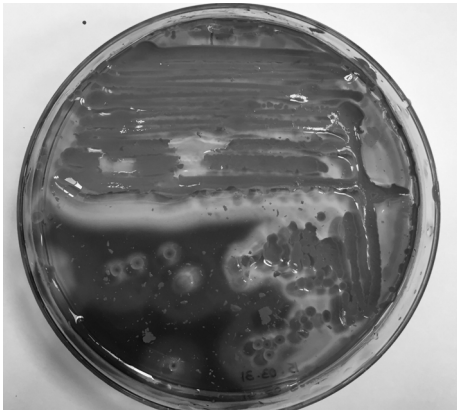


Fig. 1. Agar degrading activity of the isolated bacterium SH-1 on a Marine agar 2216 medium.

한천분해효소의 열안정성 측정

표준 기질용액으로 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)을 이용하였다. 조효소액 0.5 ml을 20, 30, 40, 50, 60, 70°C의 각 온도별로 열처리하면서 시간별로 조효소액을 채취한 후, 기질용액 1.0 ml를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 한천분해효소의 열안정성은 열처리하지 않은 한천분해효소의 활성과 비교하여 나타내었다.

한천올리고당 가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

조효소액을 이용한 agarose의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 조효소액과 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)을 30°C에서 0, 0.25, 0.5, 1, 6, 12, 24, 48 및 72시간 반응시킨 후, Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)을 이용하여 분석하였다. TLC 분석은 N-butanol/ acetic acid/H₂O (2/1/1 (v/v/v))를 이용하여 전개시켰고, 10% (v/v) H₂SO₄로 가시화시켰다. 표준물질은

D-galactose (Sigma) 및 neoagarooligosaccharides [12]를 사용하였다. 한천올리고당 가수분해산물의 농도 측정에는 Image J 1.44o (Wayne Rasband, Bethesda, USA)를 이용하였으며, TLC에서 spot 부분의 arbitrary unit을 측정하여 계산하였다.

결과 및 고찰

한천분해 균주의 분리 및 배양

총 1,000여 개의 한천분해균주 중 한천분해 활성이 우수한 균주를 선발하였다. 합몰이 일어난 부위의 균을 멸균된 백금이틀을 이용하여 Marine agar 2216 배지에서 streaking하는 것을 3차례 이상 반복한 후 균주를 순수분리하였다. 분리한 균주는 0.2%(w/v)의 한천을 포함하는 Marine broth 2216 배지로 30°C, 250 rpm에서 3일간 진탕 배양한 후 DNS법을 이용하여 한천분해능을 측정하였다. 분리한 균주는 NaCl을 성장에 필요로 하는 해양성 균주로 확인 되었으며, 분리한 SH-1 균주가 나타내는 한천분해 양상을 Fig. 1에 나타내었다.

한천분해 균주의 동정

분리된 한천분해균 SH-1 균주의 16S rDNA 염기서열 분석 결과 1,465 bp의 염기서열을 얻었고, NCBI의 BLAST 탐색을 수행하여 *Simidiua agarivorans* 및 *Simidiua curdlanivorans*와 99%의 가장 높은 상동성이 나타났으므로, 분리균주를 *Simidiua* sp. SH-1으로 명명하였다. 본 연구와 Genbank에서 획득한 16S rDNA 염기서열을 Neighbor-joining method와 Bootstrap method (n=1,000)로 분석하여 나타난 본 연구 균주의 계통분류학적 위치를 Fig. 2에 나타냈다.

분리균주의 성장과 한천분해효소 생산

0.2%(w/v) agar가 포함된 Marine broth 배지(pH 7.6) 100 ml가 든 250 ml 플라스크에 순수분리한 균주를 접종하여 배양

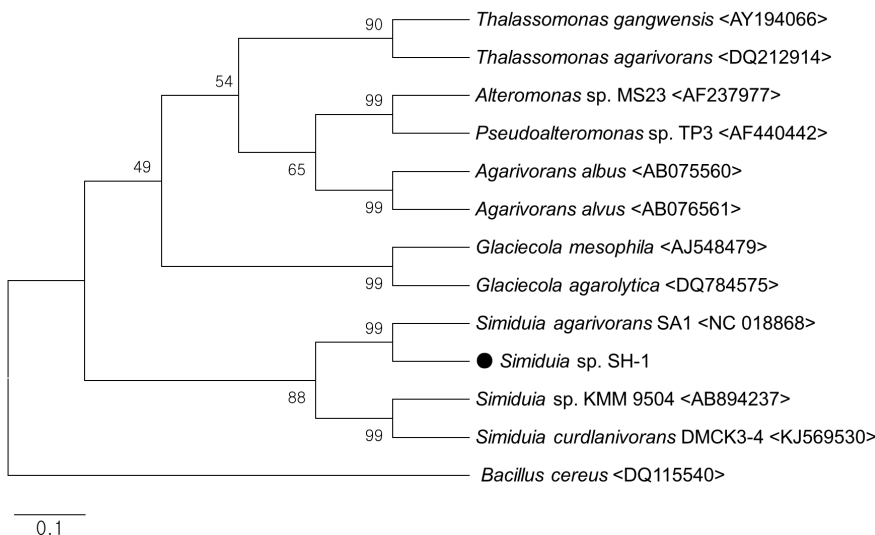


Fig. 2. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing isolated *Simidiua* sp. SH-1 strain with other bacteria. The numbers at the branch node are percentages of bootstrap values (n=1,000) and numbers in parenthesis are numbers in GenBank.

하였을 때 보이는 생육양상과 한천분해효소의 활성을 Fig. 3에 나타냈다. 접종 후 0.5 day까지의 OD 변화가 큰데 이는 전배양과 동일한 배지를 사용하여 세균들의 생장에 적응기가 필요 없는 것이 원인으로 생각된다. 배양시간에 따른 세균의 생장과 효소활성의 결과를 살펴보면, 3.5 day까지가 세균의 수가 늘어나는 지수생장시기이며, 그 이후 생장이 지체되는 것을 알 수 있었다. 한천분해효소의 활성은 지수생장기 직전인 3.0 day까지 세균의 생장에 비례하여 증가하였으며 이후 효소활성이 감소되는 것을 알 수 있었다. 기존 균주들의 한천분해효소의 특징을 살펴본 결과 *Thalassomonas* sp. SL-5 [13], *Pseudoalteromonas antarctica* N-1 [22] 및 *Bacillus cereus* ASK202 [8]도 한천분해활성이 세포농도에 비례하고, 세균생장 속도가 감소됨에 따라 한천분해활성도 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 *Simidiua* sp. SH-1의 한천분해효소는 생장의 존성 산물(growth-related product)로 판단되었으며, 이후의 연구에서는 3.0 day까지 배양한 후 효소활성을 측정하였다.

pH에 따른 한천분해 효소의 활성

한천분해효소가 각 pH에서 보이는 상대활성을 Fig. 4에 나타냈다. 사용한 완충용액과 pH 중에서 최고의 한천분해 활성을 나타내는 것은 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 pH 7.0으로 나타났다. 20 mM Tris-HCl 완충용액으로 활성을 측정하였을 때 pH 6.0에서는 오차범위 내에서 pH 7.0보다 조금 낮은 활성을 보였으며, pH 5.0에서는 7.0과 비교하여 80% 이상의 활성을 보여 약산성과 중성 범위에서 높은 활성을 보이는 것으로 판단되었다. 균주에 따른 한천분해효소의 최적 pH는 *Glaciecola* sp. SL-12 [14], *Thalassomonas* sp. SL-5 [13], *Flammeovirga* sp. mbrc-1 [5], *Agarivorans albus* YKW-34 [3], *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 [19], *Pseudoalteromonas* spp. [18] 및 *Saccharophagus degradans* 2-40 [9]은 모두 pH 7.0으로 대부분 중성이며, 그 외 *Pseudomonas* sp. PT-5 [22]는 pH 8.5, *Agarivorans* sp. JA-1 [6]의 경우에는 pH 8.0이었고, *Bacillus cereus* ASK202 [4]는 pH 7.8로 다양한 최적 pH가 보고되어 있다.

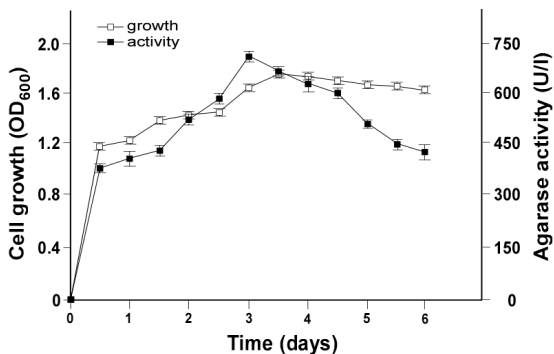


Fig. 3. Cell growth and agarase activity of *Simidiua* sp. SH-1 (■ agarase activity [U/l], □ cell growth [OD₆₀₀]).

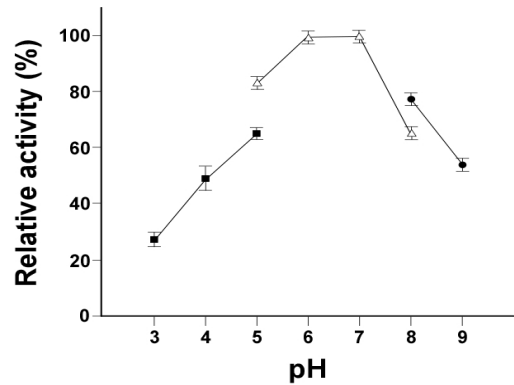


Fig. 4. Effect of pH on agarase activity (■ 20 mM sodium acetate, pH 3.0-5.0; △ 20 mM Tris-HCl, pH 5.0-8.0; ● 20 mM GTA, pH 8.0-9.0). The reactions were carried out at 30°C in 1.0 ml of corresponding buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min.

온도에 따른 한천분해 효소의 활성

각 온도별로 보이는 한천분해효소의 상대활성을 Fig. 5에 나타냈다. 가장 높은 활성을 나타낸 30°C에서의 효소활성을 100%로 하였을 때, 40°C에서 92%, 50°C에서 77%, 60°C에서 61%의 상대활성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이러한 결과로 *Simidiua* sp. SH-1이 생산하는 한천분해효소는 50°C에서도 높은 상대활성을 나타내므로, 비교적 고온에서도 활성이 높은 효소라는 것을 알 수 있었다. 균주에 따른 한천분해효소의 최적 온도는 *Glaciecola* sp. SL-12 [14], *Agarivorans albus* YKW-34 [3] 및 *Saccharophagus degradans* 2-40 [9]은 30°C로 *Simidiua* sp. SH-1과 같은 최적 온도를 나타내었으며, *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 [19] 및 *Pseudoalteromonas* spp. [18]는 35°C, *Thalassomonas* sp. SL-5 [13] 및 *Agarivorans* sp. JA-1 [6]은 40°C, *Flammeovirga* sp. mbrc-1 [5]은 45°C로 다양한 최적 온도가 보고되어 있다. 또한, 한천분해활성의 강도에 있어서도 *Simidiua* sp. SH-1 유래 한천분해효소의 최고활성은 698.6 U/l로서

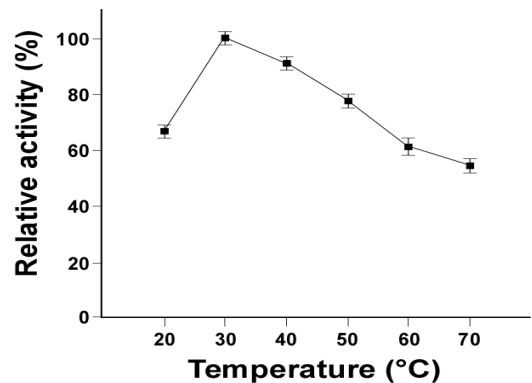


Fig. 5. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reactions were carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C in 1.0 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min.

Glaciecola sp. SL-12 [14]의 233 U/1 및 *Thalassomonas* sp. SL-5 [13] 의 363 U/1 보다 1.4~2.1배 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

한천분해 효소의 열안정성

Simiduia sp. SH-1이 생산하는 한천분해효소의 열안정성을 Fig. 6에 나타냈다. 40°C에서는 0.5, 1, 1.5, 2시간 열처리하였을 때 약 20%의 상대활성을 유지하는 것으로 보였지만, 50°C 이상의 온도에서는 30분간 열처리하였을 때 약 10% 미만의 상대 활성을 보였으며, 2시간 열처리하였을 때는 활성을 완전히 잃어버려 열안정성을 보이지 않았다. 따라서 *Simiduia* sp. SH-1 이 생산하는 한천분해효소는 내열성을 나타내지 않는 것으로 사료된다.

한천올리고당 가수분해산물의 TLC 분석

Simiduia sp. SH-1 균주를 3일 동안 배양하여 제조된 조효소 액에 agarose를 기질로 첨가하여 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 7에 나타냈다. Agarose를 기질로 사용할 경우 β-agarase는 neoagarotetraose와 neoagarobiose를 생성하고, α-agarase는 agaropentaose와 agarotriose를 생성한다 [5]. *Simiduia* sp. SH-1 균주의 한천분해효소의 분해산물을 TLC로 분석한 결과, 반응시간이 경과함에 따라 neoagarotetraose와 neoagarobiose의 농도가 증가하였다. 각 시간대에서 산물의 합을 100%로 간주하고 시간대 별로 산물의 종류와 비율을 조사해보면, 0.25시간에는 neoagarohexaose (13%)와 neoagarotetraose (46%) 및 neoagarobiose (41%)가 모두 생성되었고, 6시간부터는 neoagarohexaose (9%)와 neoagarotetraose (36.4%)의 농도는 감소하였고, neoagarobiose (54.6%)의 농도는 증가하였다. 이는 neoagarohexaose와 neoagarotetraose의

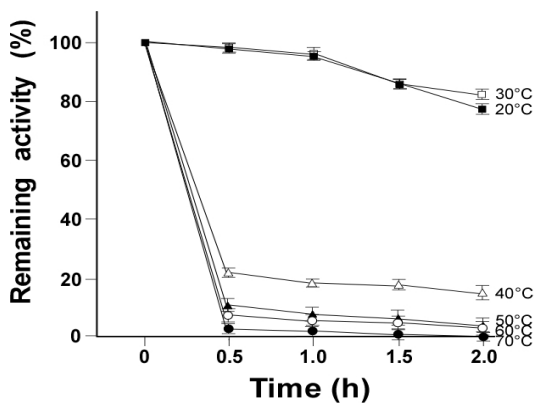


Fig. 6. Remaining activity of agarase according to time of heat treatment. The enzyme solutions were pre-incubated at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reaction was then carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C in 1.0 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of heat-treated enzyme solution for 30 min.

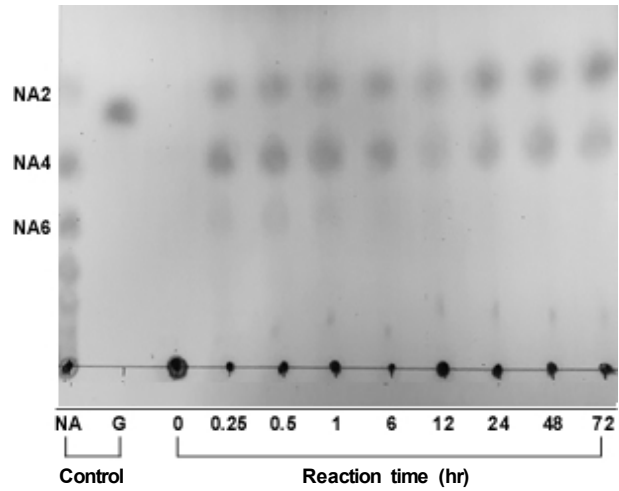


Fig. 7. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reaction was carried out at 30°C in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer with enzyme solution for 0, 0.25, 0.5, 1, 6, 12, 24, 48 and 72 hr. The reaction mixtures were developed by TLC (G, D-galactose; NA, neoagarooligosaccharides; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose).

분해를 나타내는 것으로 사료된다. 또한 1일, 2일간 반응시켰을 때에는 neoagarotetraose (40%)와 neoagarobiose (50%)의 비율이 비슷하게 유지되다가 3일째에는 neoagarotetraose (26%)의 농도가 감소하면서 neoagarobiose (56%)의 농도가 조금 더 증가되었다. 따라서 *Simiduia* sp. SH-1 균주의 한천분해효소는 최종적으로 neoagarotetraose와 neoagarobiose를 생성하는 것으로 나타나 β-agarase에 속하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 획득한 균주는 β-agarase를 생산하는 것으로 파악되었으며, 배양조건을 최적화하거나 agarase 유전자의 cloning을 통하여 한천분해효소를 대량생산할 수 있다면 다양한 기능성 소재물질의 산업적 생산에 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Cha, J. A., Kim, Y. J., Seo, Y. B. and Yoon, M. H. 2009. Isolation of an agarolytic bacteria, *Cellvibrio mixtus* SC-22 and the enzymatic properties. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 157-162.
2. Chi, W. J., Lim, J. H., Park, D. Y., Kim, M. C., Kim, C. J., Chang, Y. K. and Hong, S. K. 2013. Isolation and characterization of a novel agar degrading bacterium, *Alteromonas macleodii* subsp. GNUM08120, from red macroalgae. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 8-16.
3. Fu, X. T., Pan, C. H., Lin, H. and Kim, S. M. 2009. Gene cloning, expression, and characterization of a beta-agarase, agaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 257-264.
4. Hong, J. H., Lee, J. J., Choi, H. S., Hur, S. H. and Kong, J. Y. 2000. Antibacterial activity of agarooligosaccharides

- produced by β -agarase from *Bacillus cereus* ASK 202. *J. Fd. Hyg. Safety* **15**, 277-281.
5. Jang, H. J., Lee, D. G., Lee, S. W., Jeon, M. J., Chun, W. J., Kwon, K. K., Lee, H. S. and Lee, S. H. 2011. Isolation of a marine-derived *Flammeovirga* sp. mbrc-1 strain and characterization of its agarase. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **26**, 552-556.
 6. Jeon, M. J., Kim, A. R., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2012. Cloning, expression, and characterization of a novel GH-16 β -agarase from *Agarivorans* sp. JA-1. *J. Life Sci.* **22**, 1545-1551.
 7. Jung, I. S. 2007. Purification and characterization of agarase produced from marine bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* AS-1 and *Aligibacter lectus* AS-3. M.S. dissertation. Silla University, Busan, Korea.
 8. Kim, B. J., Song, C. M., Ha, S. D., Hwang, S. H., Kim, H. J., Bae, S. K. and Kong, J. Y. 2000. Physicochemical properties of agarooligosaccharides for using as food stuffs. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 284-290.
 9. Kim, H. T., Lee, S., Lee, D., Kim, H. S., Bang, W. G., Kim, K. H. and Choi, I. G. 2010. Overexpression and molecular characterization of Aga50D from *Saccharophagus degradans* 2-40: an exo-type beta-agarase producing neoagarobiose. *Appl. Microbiol. Biochemol.* **86**, 227-234.
 10. Kim, Y. J. 2010. Properties of the agarase and its gene isolated from a marine bacterium, *Tamlana agarivorans*. M.S. dissertation. Chungnam National University, Taejeon, Korea.
 11. Kim, Y. N. 2011. Isolation and purification of new agarase from marine bacterium. M.S. dissertation. Gyeongsang National University, Jinju, Korea.
 12. Lee, D. G., Jang, M. K., Lee, O. H., Kim, N. Y., Ju, S. A. and Lee, S. H. 2008. Over-production of a glycoside hydrolase family 50 β -agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 in *Bacillus subtilis* and the whitening effect of its product. *Biotechnol. Lett.* **30**, 911-918.
 13. Lee, D. G., Kim, N. Y., Jang, M. K., Lee, O. H. and Lee, S. H. 2007. Isolation and characterization of a marine bacterium *Thalassomonas* sp. SL-5 producing β -agarase. *J. Life Sci.* **17**, 70-75.
 14. Lee, D. G., Lee, O. H., Jang, H. J., Jang, M. K., Yoo, K. H. and Lee, S. H. 2008. Isolation and characterization of a marine derived bacterium *Glaciecola* sp. SL-12 producing β -agarase. *J. Life Sci.* **18**, 58-62.
 15. Lee, J. H. and Lee, S. Y. 2014. Isolation and characterization of marine bacterial strain SH-1 producing agar-degrading enzymes. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 324-330.
 16. Lim, D. J., Kim, B. J., Bae, S. K., Kim, J. D. and Kong, J. Y. 1999. Immobilization of agarase for the agarooligosaccharide production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 208-214.
 17. Liu, N., Mao, X., Du, Z., Mu, B. and Wei, D. 2014. Cloning and characterization of a novel neoagarotetraose-forming- β -agarase, AgWH50A from *Agarivorans gilvius* WH0801. *Carbo. Res.* **388**, 147-151.
 18. Oh, C., Nikapitiya, C., Lee, Y., Whang, I., Kim, S. J., Kang, D. H. and Lee, J. 2010. Cloning, purification and biochemical characterization of beta agarase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. AG4. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 483-494.
 19. Rhee, Y. J., Han, C. R., Kim, W. C., Jun, D. Y., Rhee, I. H. and Kim, Y. H. 2010. Isolation of a novel freshwater agarolytic *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 and characterization of its extracellular beta-agarase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1378-1385.
 20. Seok, J. H., Park, H. G., Lee, S. H., Nam, S. W., Jeon, S. J., Kim, J. H. and Kim, Y. H. 2010. High-level secretory expression of recombinant β -agarase from *Zobellia galactanivorans* in *Pichia pastoris*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 40-45.
 21. Shi, Y. L., Lu, X. Z. and Yu, W. G. 2008. A new β -agarase from marine bacterium *Janthinobacterium* sp. SY12. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2659-2664.
 22. Vera, J., Alvarez, R., Murano, E., Slebe, J. C. and Leon, O. 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4378-4383.
 23. Yang, J. I., Chen, L. C., Shih, Y. Y., Hsieh, C., Chen, C. Y., Chen, W. M. and Chen, C. C. 2011. Cloning and characterization of β -agarase AgaYT from *Flammeovirga yaeyamensis* strain YT. *J. Biosci. Bioeng.* **112**, 225-232.

초록 : 해양성 *Simiduia* sp. SH-1 균주의 분리 및 한천분해효소의 특성조사이솔지¹ · 오수정² · 이동근^{1,2} · 이상현^{1,2*}(¹신라대학교 일반대학원 바이오과학과, ²신라대학교 제약공학과)

경상남도 남해군 연안의 해수를 이용하여 신규의 한천분해 해양성세균을 분리하고 한천분해효소의 특징을 분석하였다. Marine agar 2216 배지에서 분리한 SH-1 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통해 *Simiduia* 속 세균과 99% 유사하여 *Simiduia* sp. SH-1으로 명명하였다. *Simiduia* sp. SH-1 균주가 생성하는 한천분해효소는 성장의존성 산물로 판단되었으며 정체기부터 효소활성이 감소되었다. 한천분해효소는 pH 7.0(20 mM Tris-HCl buffer), 30°C에서 최대활성(698.6 units/l)을 나타내었다. 효소의 활성은 30°C에서 최적이었고 이후 온도가 증가함에 따라 활성이 감소하였으며, 40°C와 50°C에서 각각 약 90%와 75%의 상대활성을 보였으나 내열성은 보이지 않았다. 최적 pH인 pH 7.0에 비해 pH 6.0에서는 오차범위 내에서 조금 낮은 활성을 보였으며 pH 5.0과 pH 8.0에서는 각각 80%와 75% 정도의 상대활성을 보였다. TLC 분석을 통하여 *Simiduia* sp. SH-1 균주가 생성하는 한천분해효소는 agarose를 분해하여 피부의 미백활성, 전분노화의 방지 및 세균성장의 억제 등의 유용한 효과를 가지는 기능성 한천올리고당인 neoagarotetraose와 neoagarobiose를 최종적으로 생성하는 β -agarase로 확인되었다. 따라서, *Simiduia* sp. SH-1 균주와 이 균주가 생산하는 β -agarase는 산업적 생산에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.