

서해안 해수로부터 분리한 한천분해 해양미생물 *Pseudoalteromonas* sp. H9의 동정 및 특성 연구

지원재¹, 윤영상², 김종희³, 홍순광^{2*}

¹국립생물자원관 유용자원분석과

²명지대학교 생명과학정보학부

³서일대학교 식품영양과

Received: March 9, 2015 / Revised: May 11, 2015 / Accepted: May 11, 2015

Isolation and Characterization of an Agar-hydrolyzing Marine Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. H9, from the Coastal Seawater of the West Sea, South Korea

Won-Jae Chi¹, Young Sang Youn², Jong-Hee Kim³, and Soon-Kwang Hong^{2*}

¹Biological and Genetic Resource Assessment Division, National Institute of Biological Resource, Incheon 404-170, Republic of Korea

²Department of Biological Science, Myongji University, Yongin 449-728, Republic of Korea

³Department of Food and Nutrition, Seoil University, Seoul 131-702, Republic of Korea

An agarolytic marine bacterium (H9) was isolated from the coastal seawater of the West Sea, South Korea. The isolate, H9, was gram-negative and rod-shaped with a smooth surface and polar flagellum. Cells grew at 20–30°C, between pH 5.0 and 9.0, and in ASW-YP (Artificial Sea Water-Yeast extract, Peptone) media containing 1–5% (w/v) NaCl. The G+C content was 41.56 mol%. The predominant isoprenoid quinone in strain H9 was ubiquinone-8. The major fatty acids (>10%) were C_{16:1(ω)7c} (34.3%), C_{16:0} (23.72%), and C_{18:1(ω)7c} (13.64%). Based on 16S rRNA gene sequencing, and biochemical and chemotaxonomic characterization, the strain was designated as *Pseudoalteromonas* sp. H9 (=KCTC23887). In liquid culture supplemented with 0.2% agar, the cell density and agarase activity reached a maximum level of OD = 4.32 (48 h) and OD = 3.87 (24 h), respectively. The optimum pH and temperature for the extracellular crude agarases of H9 were 7.0 and 40°C, respectively. Thin-layer chromatography analysis of the agarase hydrolysis products revealed that the crude agarases hydrolyze agarose into neoagarotetraose and neoagarohexaose. Therefore, the new agar-degrading strain, H9, can be applicable for the production of valuable neoagarooligosaccharides and for the complete degradation of agar in bio-industries.

Keywords: Agarase, marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. H9, phylogenetic analysis

서론

한천은 홍조류 세포벽의 주요 구성성분으로서 agaropectin과 agarose로 구성되어 있다. 아가로스는 3,6-anhydro- α -L-galactose와 β -D-galactose를 unit로 하여 반복적으로 연결되어 있는 polymer이고, 아가로펙틴은 3,6-anhydro- α -L-galactose에 sulfoxyl, methoxyl, pyruvate 등의 잔기가 수식되어 있는 점이 아가로스와 구별된다. 아가로스를 구성하는

두 종류의 잔기인 3,6-anhydro- α -L-galactose와 β -D-galactose는 α -1,3 결합에 의해서 연결되어 있고, β -D-galactose는 β -1,4 결합에 의해서 뒤에 위치한 3,6-anhydro- α -L-galactose와 연결되어 있는 구조를 형성한다. 따라서 한천의 효소적 분해에는 α -결합을 가수분해하는 α -agarase와 β -결합을 인식하는 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[4]. (네오)아가로올리고당은 온도 안정성, 정장 작용, 저칼로리 등의 특성을 갖고 있으며, 비만 및 대사질환 치료와 예방효과 등이 있어

*Corresponding author

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

E-mail: skhong@mju.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

기능성 식품, 의약품, 화장품 분야 등 다양한 산업에 응용될 수 있다[10]. 또한 (네오)아가로올리고당은 hydrolase에 의해서 최종적으로 3,6-anhydro-L-galactose와 D-galactose로 분해되는데, D-galactose는 감미료 또는 바이오에탄올 생산 등에 사용될 수 있다. 3,6-anhydro-L-galactose는 신기능성 물질 합성을 위한 전구체로 사용될 수 있으며, 미백 및 항염증 효과가 뛰어난 것으로 보고되었다[22]. 효소를 이용한 한천 분해방법은 화학적 분해 방법에 비해 환경친화적이며, 원하는 길이의 올리고당을 선택적으로 생산 할 수 있다는 장점이 있다. 자연 친화적 방법으로 기능성 (네오)아가로올리고당을 생산하기 위해서는 agarase에 대한 연구가 필요하며, 우선적으로 활성이 뛰어난 agarase를 생산하는 신규 미생물의 동정이 선행되어야 한다.

본 연구그룹은 대한민국 서해 연안의 해수로부터 agarase를 생산하는 신규 미생물을 확보하여 동정하고 그 특성을 규명함으로써, 우리나라의 생물자원 및 유전자원을 확보하고, 해양자원인 한천을 이용한 산업 발전에 응용하고자 하였다. 그 결과, 40°C에서 최대활성을 나타내는 agarase를 생산하는 균주 H9을 분리하였으며, 본 논문에서는 H9 균주의 동정, 생리적·생화학적 특성을 서술하였다.

재료 및 방법

Agarase 생산 미생물의 분리

해수에 서식하는 agarase 생산 미생물을 분리하기 위해서, 충청남도 보령시 대천 인근에 위치한 호도 근해의 해수를 채취하여 멸균수에 10^{-1} – 10^{-5} 로 희석한 후 ASW-YP 평판고체배지(6.1 g Tris base, 12.3 g MgSO₄, 0.74 g KCl, 0.13 g (NH₄)₂HPO₄, 17.5 g NaCl, 0.14 g CaCl₂, 1% Yeast extract, 0.3% bacto peptone, 1.5% agar; per liter; pH 7.2)에 도말하였다. 도말한 평판고체배지는 28°C에서 2일간 배양한 후 성장하는 모든 colony들을 새로운 고체배지에 접종하였다 (replica 제작). 28°C에서 2일 배양 후 Lugol's Iodine 용액 (0.05 M Iodine in 0.12 M KI)으로 염색하여 colony 주변에 아가분해활성을 나타내 투명하게 보이는 colony를 선별하였다. 선별된 미생물 균주는 새로운 ASW-YP 또는 marine agar (Difco 2216) 고체배지에 옮겨서 2일간 배양하여 colony의 모양, 색깔, 투명도, 크기 등을 관찰하여 형태적 특성을 토대로 3개의 그룹으로 나누었다. 이들 3개의 그룹에서 각각 한 균주씩을 대표균주로 선정하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 최종적으로 활성이 우수한 균주 H9을 선택하여 본 연구에 사용하였다.

균주 H9의 형태적·생리적 특성 분석

균주 H9는 Gram stain kit (BD Biosciences, USA)를 사

용하여 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 균주 H9의 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 2%가 되도록 첨가하여 28°C에서 2일간 배양한 후 관찰하였다. 균주 H9의 성장 특성은, NaCl을 최종농도 0–10% (1% 간격)가 되도록 각각 첨가한 ASW-YP 고체배지에 균주를 접종한 후 4일간 배양하여 성장을 관찰하였다. 균주 H9의 성장에 영향을 미치는 pH 조건을 알아보기 위해서, pH 4.0–pH 10.0 (pH 1.0의 간격)의 고체배지를 만들어 균주를 접종한 후 4일간 배양하여 성장을 관찰하였다. 또한 배양 온도에 따른 성장을 관찰하기 위해서 4, 15, 20, 25, 37, 40°C에서 각각 4일간 배양하여 성장을 관찰하였다.

H9 균주의 생화학적 특성 분석

균주 H9을 ASW-YP 고체배지로 28°C에서 2일간 배양 후 회수된 균체를 분석에 사용하였다. 주요 키논은 C18 컬럼을 사용한 역상-HPLC로 분석하였다. HPLC 시스템(Younglin SP930D, Korea)에 역상 칼럼인 Spherisorb 5 µm ODS2 (250 mm × 4.6 mm, Waters Corp., USA)를 장착하여 사용하였으며, 이동상(메탄올:아이소프로필 에테르 = 4:1)은 1.0 ml/min 유속으로 사용하였다. 균체의 지방산은 methyl ester화[14] 시킨 fatty acid methyl esters (FAME) 혼합물을 Microbial Identification System (MIDI)의 지침[18]에 따라 Gas chromatography (Agilent technologies 6890, USA) 방법으로 분석하였다. HP ultra 2 컬럼(25 m × 0.2 mm phenyl methyl silicone fused silica capillary column)을 이용하여 지방산을 분리하고 Sherlock system으로 검출하여 분석하였다. 초기온도 170°C에서 분당 5°C씩 상승시킨 후 최종 300°C에서 2 분간 유지하였으며, carrier gas는 H₂를 사용하였고 makeup gas는 N₂를 사용하였다. Genomic DNA의 G+C 농도 분석은 역상-HPLC (C18 컬럼, 이동상 0.2 M NH₂H₂PO₄ (pH 4.5):acetonitrile = 20:1, 유속 1 ml/min)를 이용하였다[12].

16S rRNA 유전자 염기서열 해독 및 계통수 제작

균주 H9을 ASW-YP 액체배지에서 2일간 진탕배양 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[19], 증폭된 DNA 단편

은 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 클로닝한 후 염기서열을 분석하였다. 분석된 16S rRNA 유전자 염기서열은 GenBank에 JF965427로 등록하였으며, National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 BlastN program을 사용하여 GenBank database의 정보로부터 염기서열의 상동성 검사를 수행하였다. 또한 EzTaxon database (<http://www.eztaxon.org/>)로부터 표준균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 확보하여 계통발생적 연관성을 분석하였다. 확보된 염기서열들 간의 Multi alignment는 ClustalW program (www.soft82.com/download/windows/clustalW2/)을 사용하였고 5'-과 3'-말단의 gap은 GeneDoc program으로 편집하였다. 진화적 거리(evolutionary distance matrix)는 Kimura's two-parameter evolutionary model [9]에 의해 계산되었고, Neighbor-Joining (N-J)법[17]으로 계통수를 제작하였다. 신뢰도(bootstrap value)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 새롭게 tree를 제작하여 계산하였다.

균주 H9의 성장 및 agarase 생산

균주 H9을 ASW-YP 액체배지와 최종농도 0.2%로 agar가 첨가된 ASW-YPA 액체배지에 각각 96시간동안 배양하면서 (28°C, 180 rpm) 24시간 간격으로 샘플을 채취하였다. 600 nm에서 흡광도를 측정하여 샘플의 균체 성장을 측정하였고, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 샘플 상등액의 agarase 활성을 측정하였다. Agarase 활성은 0.2% agarose (AMRESCO LLC., USA)를 기질로 하는 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)법[13]으로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단, 효소반응은 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)를 사용하여 40°C에서 수행하였다.

균주 H9 배양액으로부터 조효소의 준비

균주 H9을 ASW-YPA 액체배지에서 24시간 배양한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체가 제거된 배양액을 회수하였다. 준비된 배양액은 ultrafiltration (3 kDa cut-off, PALL, USA)으로 10배 농축하여 조효소로 사용하였다.

Agarase 효소활성에 미치는 온도와 pH의 효과

온도 조건에 따른 H9의 총 agarase의 효소활성을 조사하기 위해서, 준비된 조효소를 이용하여 25-50°C (5°C 간격)에서 각각 agarose를 기질로 하는 효소반응(20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)을 10분간 실시하여, DNS 법으로 활성을 측정하였다. pH 조건에 따른 agarase의 효소활성은 pH 6.0-10.0 (pH 1.0의 간격)의 조건에서 40°C로 10분간 효소반응을 실시하여 측정하였다. 이 때 사용된 버퍼는 20 mM MOPS buffer (pH 6.0-7.0), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0-9.0), 20 mM Glycine-NaOH buffer (pH 9.0-10.0)이다.

Thin layer chromatography 분석

조효소 10 µl를 0.2% agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 첨가한 후 40°C에서 24시간동안 반응하면서 12시간 간격으로 반응액을 취하여, Thin layer chromatography (TLC) 방법으로 가수분해산물을 분석하였다 [5]. 반응액(10 µl)을 Silica Gel 60 plate(EMD Merck AG, Darmstadt, Germany)에 로드하고 *n*-butanol, acetic acid 및 물(2:1:1, v/v/v)의 용매시스템 상에서 2회 연속 전개하여 분리하였다. 플레이트에 30%(w/v) 황산이 함유된 에탄올 용액을 분무하고 120°C로 가열하여 분리된 산물을 발색하였다.

결과 및 고찰

균주 H9의 형태적 특성

충청남도 대천 인근에 위치하는 호도 해안에 서식하는 agarase 생산 미생물 한 종을 선별하여 균주 H9으로 명명하였다. 균주 H9은 Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에 KCTC23889로 기탁하였다. 균주 H9은 marine agar (MA; Difco 2216)와 ASW-YP 고체배지에서 노란색을 띄며 매끈한 표면을 갖는 colony를 형성하였고(Fig. 1A), 그램 염색 결과 Gram 음성으로 판명되었다. 투과전자현미경 관찰 결과, H9 균체는 세로 1.5-2.0 µm 가로 0.6-0.8 µm 크기이며, 각각의 세포에는 1개의 polar flagellum을 갖고 있는 것으로 관찰되었다(Fig. 1B).

균주 H9은 배지내에 Na⁺ 이온이 존재하지 않으면 자라지 않는 Na⁺ 요구성 균주로 관찰되었고 Na⁺ 이온 농도가 6% 이상에서는 성장하지 못하였으며, 2-3%의 농도에서 최적의 성장이 관찰되었다. H9은 pH 4.0 이하와 pH 10.0 이상의 조건에서는 성장하지 못하였지만, pH 5.0-pH 9.0의 조건에서는 성장할 수 있고 pH 7.0-pH 8.0의 중성조건에서 최적의 성장이 관찰되었다. 또한 H9 균주는 10°C 이하와 40°C 이상의 온도 조건에서는 성장하지 못하지만, 15°C에서 약한 성장을 나타내고 25-30°C에서 최적의 성장이 관찰되었다.

균주 H9의 생리적 특성

API 20NE kit를 사용한 생리적 특성 분석 결과, nitrate reduction, indole production, D-glucose fermentation 등의 반응과 urease, arginine dihydrolase, β-galactosidase 등의 효소생산에서 음성으로 관찰되었다. Arabinose, mannose, potassium gluconate, capric acid, adipic acid, phenylacetic acid 등의 assimilation 반응에서 음성으로 관찰되었다. 그러나 esculin hydrolysis, gelatinase 등의 효소반응은 양성을 보였고 D-glucose, mannitol, *N*-acetylglucosamine, D-maltose, malic acid, trisodium citrate 등

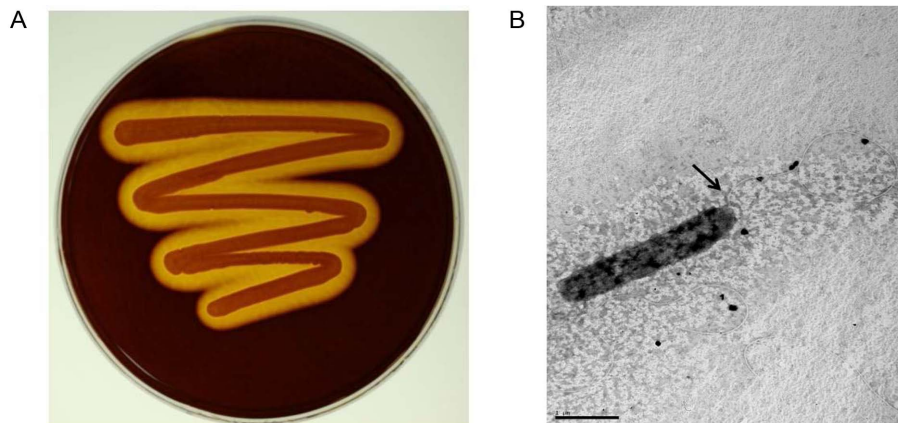


Fig. 1. Isolation of agarolytic bacterial strain H9. (A) Detection of agarolytic activity on agar plates. The strain was cultured on ASW-YP plates at 28°C for 2 days and the plate was stained with Lugol's iodine solution. (B) Transmission electron microscopy (TEM) analysis. Cells cultured on ASW-YP agar plates at 28°C for 2 days were stained with 1% (w/v) phosphotungstic acid and observed with transmission electron microscopy. Bar, 1 μ m.

Table 1. Phenotypic and chemotaxonomic characteristics of strain H9 and its related strains.

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pigmentation	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Growth at:									
4°C	-	+	-	-	+	-	+	+	+
37°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6% NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Enzyme activity of:									
Agarase	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	+
β -Galactosidase	-	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+
Lipase (C14)	-	+	+	+	ND	ND	+	+	-
Fermentation of:									
D-Glucose	-	+	+	-	+	-	ND	ND	-
Assimilation of:									
Mannose	-	-	+	-	-	+	-	-	+
N-acetyl-glucosamine	+	-	-	-	-	-	-	ND	-
G+C content (mol%)	41.6	42.7	42.1	42.1	38.9	43.6	40.2	42.1	42.3

Strains: 1, strain H9; 2, *Pseudoalteromonas espejiana* NCIMB2127^T [3, 6]; 3, *P. atlantica* IAM12927^T [1, 6]; 4, *P. agarivorans* KMM255^T [16]; 5, *P. carrageenovora* ATCC12662^T [1, 6]; 6, *P. distincta* ATCC70051^T [7]; 7, *P. haloplanktis* ATCC14393^T [20]; 8, *P. tetradonis* IAM14160^T [8]; 9, *P. arctica* A37-1-2^T [2]. Symbol: +, positive; -, negative; ND, not mentioned.

의 assimilation 반응은 양성으로 관찰되었다.

API ZYM kit를 사용한 균주 H9의 효소생산 분석 결과, alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -galactosidase, α -

glucosidase, N-acetyl- β -glucosamidase 등의 효소반응이 양성으로 관찰된 반면, lipase (C14), β -galactosidase, β -glucuronidase, β -glucosidase, α -mannosidase, α -fucosidase 등의 효소반응은 음성으로 관찰되었다. 균주 H9과 계통발생적 연관관계가 높은 표준 균주들의 형태적·생리학적 특성을 Table 1에 비교하였다.

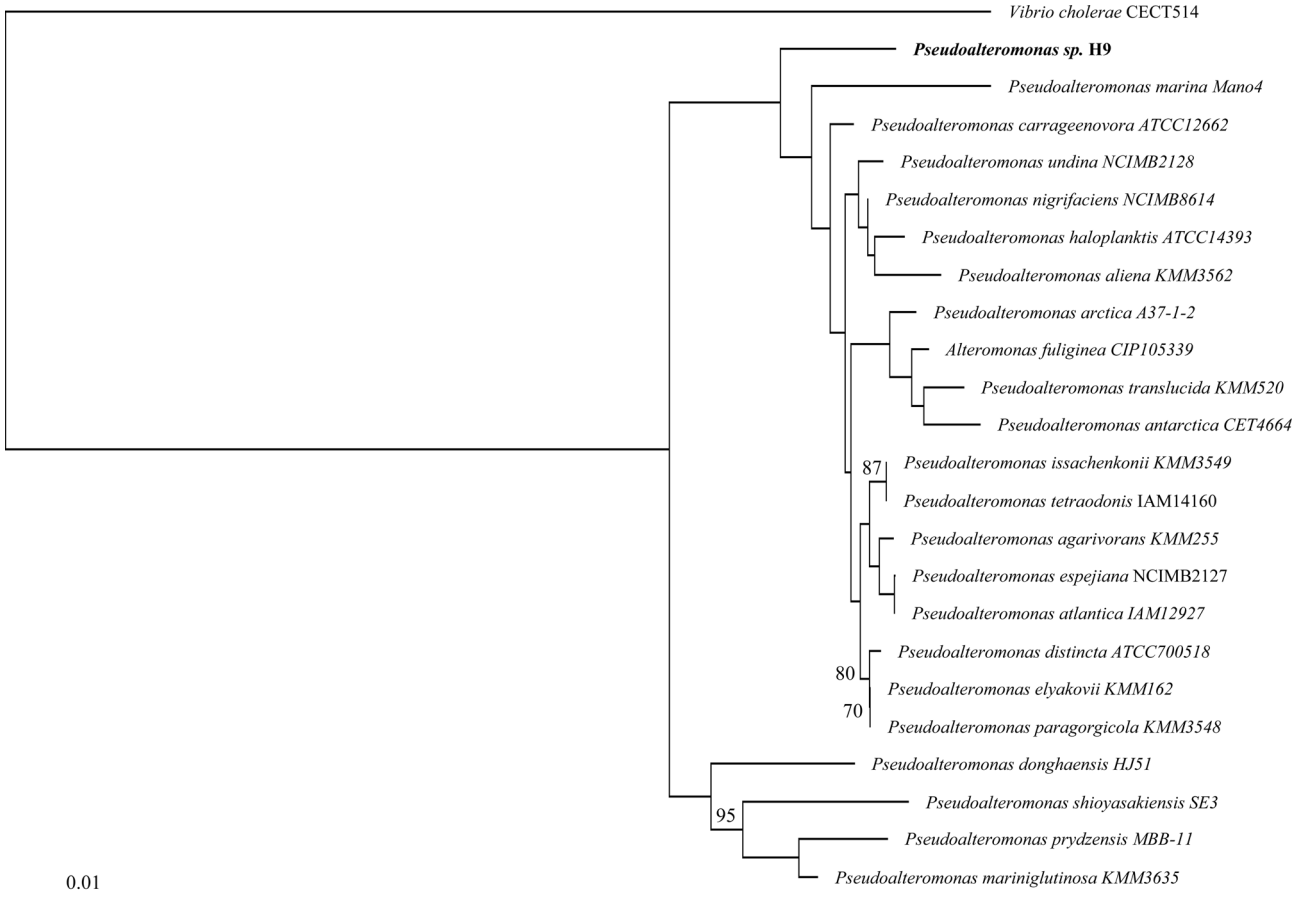


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence. A neighbor-joining phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA sequences of *Pseudoalteromonas* sp. H9^T (JN578479) and closely related *Pseudoalteromonas* species. Numbers at nodes indicate bootstrap percentages (based on 1,000 resamplings). Bar, 0.01 substitutions per 100 nucleotide positions.

균주 H9의 계통발생학적 연관관계 규명

균주 H9의 16S rRNA 유전자 염기서열을 해독하여 NCBI의 BlastN 프로그램으로 다른 미생물들과의 상동성을 조사한 결과, *Pseudoalteromonas* 속의 균들과 높은 상동성을 보였다. 균주 H9의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *P. espejiana* NCIMB2127 (98.98%), *P. carrageenovora* ATCC12662 (98.78%), *P. atlantica* IAM12927 (98.64%) 등과 높은 상동성을 나타냈다. 이러한 결과로부터 균주 H9은 *Pseudoalteromonas* 속의 한 종으로 판단되었다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 토대로 표준균주들과의 계통발생적 연관관계를 규명하고자 N-J 법으로 계통수를 제작하였다. 그 결과, 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성 조사와 마찬가지로 *P. espejiana* NCIMB2127, *P. carrageenovora* ATCC12662, *P. atlantica* IAM12927, *P. agarivorans* KMM255 등과 계통발생학적 연관관계를 갖는 것으로 예상되었다(Fig. 2). 따라서 계통발생학적 연관관계가 높은 균들과 H9의 형태적·생화학적 특성의

많은 차이점을 감안하여 균주 H9을 *Pseudoalteromonas* sp. H9으로 명명하였다.

***Pseudoalteromonas* sp. H9의 유전학적 특성 및 세포벽 지방산 조성**

균주 H9의 염색체 DNA 내 G+C 농도는 41.56%로 분석되었다. 이는 보고된 *Pseudoalteromonas* 속 미생물들의 G+C 농도 수치인 38-44% 범위에 속한다[16]. 균주 H9은 quinone-8 (Q-8)을 주요 퀴논으로 함유하고 있었는데, Q-8은 *Pseudoalteromonas* 속 미생물이 함유하는 주요 퀴논으로 보고 되어 있다. 균주 H9의 주요지방산(>10%)은 C_{16:1}ω7c (34.3%), C_{16:0} (23.72%), C_{18:1}ω7c (13.64%) 등으로 관찰되었는데, 이들 주요지방산은 *Pseudoalteromonas* 속 미생물이 함유하는 주요 지방산과도 잘 일치한다[2]. 이러한 결과들은, H9이 *Pseudoalteromonas* 속에 속한다는 사실을 지지하는 증거이다. 전술한 바와 같이 형태학적·생리학적 특성들과 유전학적

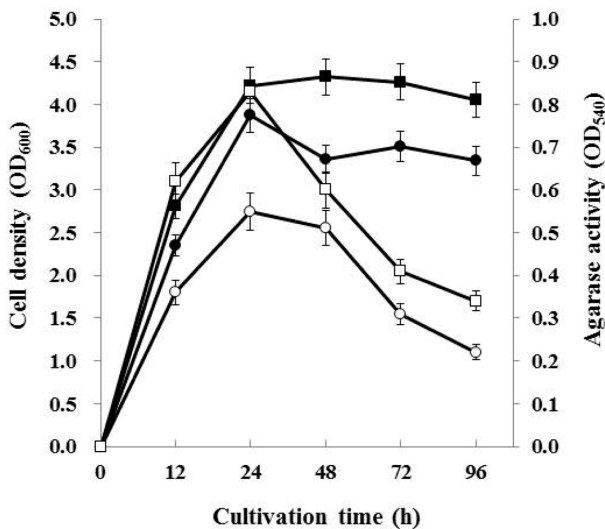


Fig. 3. Cell growth and agarase activities in liquid culture. Strain H9 was cultured in ASW-YP broth and ASW-YPA (ASW-YP containing 0.2% agar) with vigorous shaking at 28°C for 4 days. Cell density was determined at 600 nm and agarase activity was determined by the DNS method. All data shown are mean values from at least three replicate experiments. ●, cell growth in ASW-YP; ○, agarolytic activity in ASW-YP; ■, cell growth in ASW-YPA; □, agarolytic activity in ASW-YPA.

특성들을 토대로 균주 H9은 *Pseudoalteromonas* 속의 미생물로 분류될 수 있다. 그러나 H9 균주는 *Pseudoalteromonas* 속의 계통발생적 연관관계가 높은 다른 종들과는 생리화학적 특성들에서 많은 차이점들을 보였다(Table 1). 또한 균주 H9은 N-J phylogenetic tree에서 계통발생학적 연관관계가 높은 표준균주들과 분리된 monophyletic clade를 형성하였다. 이러한 결과들은 균주 H9이 지금까지 보고된 *Pseudoalteromonas* 속의 미생물과는 구별되는 균주임을 시사한다.

균주 H9의 성장과 agarase 생산

균주 H9은 agar가 포함된 배지에서는 배양 초기부터 급격히 성장하여 배양 24시간째 stationary phase ($OD_{600} = 4.22$)에 접어들었고, 배양 48시간에 가장 높은 성장 ($OD_{600} = 4.32$)을 보인 후 서서히 감소하였다. 반면 agar가 포함되지 않은 배지에서는 배양 24시간째 최대 성장 ($OD_{600} = 3.87$)을 보인 후 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). H9의 agarase 활성은 두 종류 배지 모두에서 배양 24시간째 가장 높은 활성이 관찰되었는데, agar가 포함된 배지에서 약 1.5배 높은 활성이 관찰되었다. 이러한 결과로부터 균주 H9은 agar에 의해서 성장이 촉진될 뿐만 아니라 agarase 생산도 유도적으로 촉진되는 것으로 예상된다.

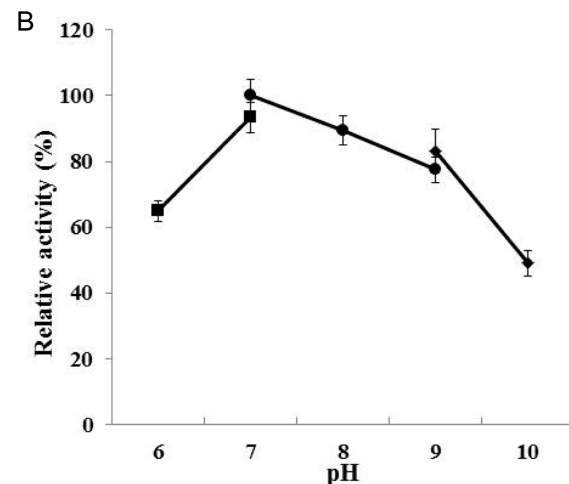
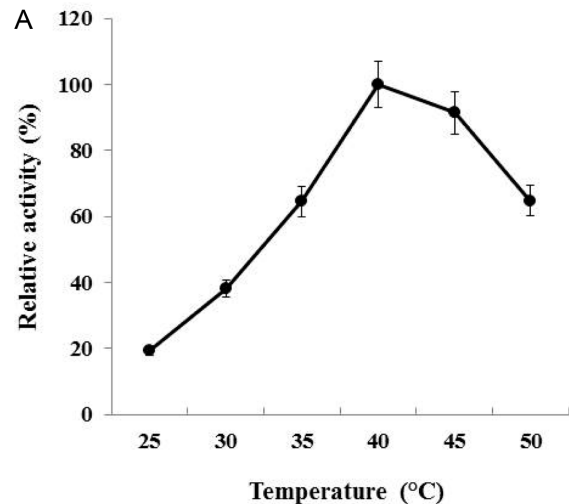


Fig. 4. Biochemical properties of the extracellular agarases. (A) The effect of temperature. An agarase assay was carried out at pH 7.0 by the DNS method at different temperatures. The maximum value obtained at 40°C was taken to be 100%. The relative activities are the averages from three independent experiments. (B) The effect of pH. An agarase assay was carried out at 40°C at different pH conditions. The maximum value obtained at pH 7.0 was taken to be 100%. ■, 20 mM MOPS buffer; ●, 20 mM Tris-HCl buffer; ◆, 20 mM Glycine-NaOH buffer. All data shown are mean values from at least three replicate experiments.

균주 H9이 생산하는 agarase의 효소적 특성

균주 H9이 세포외로 배출하는 총 agarase는 40°C와 pH 7.0의 조건에서 최대 활성을 보였다(Fig. 4). 45°C에서는 최대 활성의 약 91%의 활성을 보이고 35°C와 50°C에서는 최대 활성의 약 64%의 활성이 관찰되었다. 따라서 균주 H9이 생산하는 agarase는 40–45°C 범위에서 높은 효소활성을 갖는 것으로 판단된다(Fig. 4A). 40°C에서 효소반응을 유도하

였을 때, pH 7.0에서 최대 활성이 관찰되었고 pH 8.0에서는 최대 활성의 약 90%의 활성이 관찰 되었다(Fig. 4B). pH 9.0의 조건에서는 최대 활성의 약 83% 정도의 활성이 유지되어, 균주 H9의 agarase는 중성 및 약알칼리의 조건에서 높은 효소활성을 갖는 것으로 판단된다. 이는 해양 미생물이 서식하는 바닷물이 약알칼리성이기 때문인 것으로 추측된다.

최근까지 *Pseudoalteromonas* 속의 미생물균주의 agarase에 대한 연구는 많이 보고되어 있지 않는데, 단지 두 종류의 β -agarase에 대한 효소적 특성만이 알려져 있다. *Pseudoalteromonas* sp. strain N-1의 β -agarase는 30°C와 pH 7.0의 조건에서 최대 활성을 보였고[21], *Pseudoalteromonas* sp. CY24의 β -agarase AgaB는 40°C와 pH 6.0 조건에서 최대 활성을 보인다[11]. 소라의 내장에서 동정된 *Pseudoalteromonas* sp. JYBCL 1이 생산하는 총 agarase는 35°C와 pH 7.0에서 최대 활성을 보인다[15]. 최근, 본 연구진은 H9 균주로부터 agarase를 코딩하는 유전자 *agaH92*를 클로닝하고 대량발현하여 agarase AgaH92가 45°C와 pH 6.0에서 최대 활성을

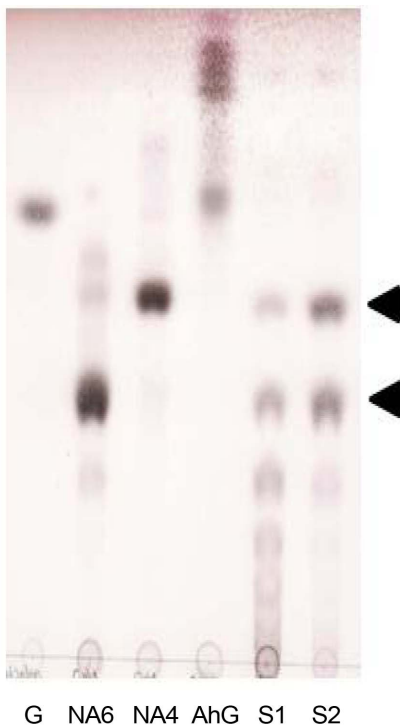


Fig. 5. Thin layer chromatography (TLC) analysis of hydrolysis product of agarose. The reaction was carried out by using the crude agarases at 40°C for 24 h in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) containing 0.2% agarose, and then the hydrolysis products were separated on a Silica Gel 60 TLC plate. G, D-galactose; NA6, neoagarohexaose; NA4, neoagarotetraose; AhG, 3,6-anhydro-D-galactose; S1, 12-h reaction sample; S2, 24-h reaction sample. Major end products, NA4 and NA6, are indicated by arrow heads.

보임을 보고하였다[5]. 이와 같은 AgaH92 agarase의 생화학적 특성은, 본 논문에서 제시하고 있는 H9 균주의 전체 세포외 단백질내에 존재하는 agarase의 최적 활성 조건(40°C, pH 7.0)과는 차이를 보이고 있다. 이러한 차이는, 전체 세포외 단백질내에는 AgaH92와는 다른 생화학적 속성을 갖는 agarase가 공존하고 있음을 시사하고 있어 이에 대한 후속 연구가 필요하다. 또한 AgaH92는 Fe^{2+} 이온에 의존성을 보이는 독특한 특징을 갖는 최초의 agarase임이 판명되어, H9 균주가 타 균주와는 구별되는 독특한 특성을 갖는 agarase들을 생산할 가능성이 크다.

균주 H9의 agarase를 이용한 한천올리고당의 생산

균주 H9의 24시간 배양액으로부터 준비된 조효소를 이용하여 agarose를 기질로 하는 효소반응을 유도한 후 반응산물을 TLC로 분석하였다(Fig. 5). 그 결과, 균주 H9에 의해서 세포외부로 생산되는 agarase는 (neo)agarotetraose와 (neo)agarohexaose를 최종산물로 생산할 수 있음을 확인하였다. (Neo)agarooligosaccharide는 서론에서 언급했듯이 다양한 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있는 유용한 천연화합물로서 산업적으로 가치가 있다. 특히 일본에서는 한천의 화학적 분해방법을 통해서 한천유래 올리고당을 생산하여 식음료제품에 첨가한 기능성 상품을 판매 중에 있다. 따라서 균주 H9의 agarase를 이용한다면 자연친화적인 효소적 방법에 의해서 한천으로부터 기능성 올리고당의 생산이 가능하며, 이의 산업적 응용이 가능할 것으로 사료된다.

요 약

대한민국 대천 해수로부터 agarase를 생산하는 균주 H9을 분리하였다. 본 균주는 16S rRNA 염기 염기서열 분석결과로부터 *Pseudoalteromonas espejiana* NCIMB2127^T (98.98%), *Pseudoalteromonas carrageenovora* ATCC12662^T (98.78%), *Pseudoalteromonas atlantica* IAM12927^T (98.64%), *Pseudoalteromonas issachenkonii* KMM3549^T (98.63%) 등과 높은 상동성을 보였다. 균주 H9은 genomic DNA 내 G+C 농도가 41.56%이고 주요 퀴논으로 quinone-8을 포함하고 있다. 균주 H9의 주요 지방산으로 $C_{16:1\omega7c}$ (34.3%), $C_{16:0}$ (23.72%), $C_{18:1\omega7c}$ (13.64%) 등이 포함되었다. 이러한 유전적, 생리적 특성에 따라 균주 H9은 *Pseudoalteromonas* 속의 균으로 분류하여 *Pseudoalteromonas* sp. H9으로 명명하였다. 균주 H9이 세포외부로 분비하는 총 agarase는 40–45°C와 pH 7.0–8.0의 조건에서 높은 효소 활성을 갖으며, agarose를 분해하여 (neo)agarotetraose와 (neo)agarohexaose를 생산하였다. 균주 H9은 한천분해를 위해 유용하게 사용될 수 있으며, 다양한 생리활성을 갖는

(neo)agarooligosaccharide는 기능성 식품, 화장품 등의 산업에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Next-Generation BioGreen 21 Program (PJ01129301), Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Akagawa-Matsushita M, Matsuo M, Koga Y, Yamasato K. 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carraegenova* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 621-627.
- Al Khudary R, Stösser NI, Qoura F, Antranikian G. 2008. *Pseudoalteromonas arctica* sp. nov., an aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2018-2024.
- Chan KY, Baumann L, Garza MM, Baumann P. 1978. Two new species of *Alteromonas*: *Alteromonas espejiana* and *Alteromonas undina*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 217-222.
- 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.* doi: 10.1093/femsle/fnv035.
- Gauthier G, Gauthier M, Christen R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding four small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 755-761.
- Ivanova EP, Chun J, Romanenko LA, Matte ME, Mikhailov VV, Frolova GM, et al. 2000. Reclassification of *Alteromonas distincta* Romanenko et al. 1995 as *Pseudoalteromonas distincta* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 141-144.
- Ivanova EP, Romanenko LA, Matté MH, Matté GR, Lysenko AM, Simidu U, et al. 2001. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1071-1078.
- Kimura M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, Kirimura K, Usami S. 1997. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 162-163.
- Ma C, Lu X, Shi C, Li J, Gu Y, Ma Y, et al. 2007. Molecular cloning and characterization of a novel beta-agarase, AgaB, from marine *Pseudoalteromonas* sp. CY24. *J. Biol. Chem.* **282**: 3747-3754.
- 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.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Miller L, Berger T. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard Application note. pp. 228-241.
- Oh YH, Jung C, Lee J. 2011. Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudoalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 818-821.
- Romanenko LA, Zhukova NV, Rohde M, Lysenko AM, Kikhailov VV, Stackebrandt E. 2003. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 125-131.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sasser M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Inc., Newark, DE, USA.
- 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.
- Venkateswaran K, Dohmoto N. 2000. *Pseudoalteromonas peptidolytica* sp. nov., a novel marine mussel-thread-degrading bacterium isolated from the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 565-574.
- Vera J, Alvarez R, Murano E, Slebe JC, Leon O. 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4378-4383.
- 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.