

Characterization of Agarase Produced from the Isolated Marine Bacterium *Marinomonas* sp. SH-2

Jeong-Gwon Jo, Sol-Ji Lee, Dong-Geun Lee and Sang-Hyeon Lee*

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

Received October 27, 2015 / Revised November 23, 2015 / Accepted November 24, 2015

This study aimed to isolate a novel agarase-producing marine bacterium and characterize its agarase, as agarases are known to produce biofunctional agarooligosaccharides or neo-agarooligosaccharides. A novel agar-degrading bacterium, SH-2, was isolated from the seawater of Namhae in Gyeongnam Province, Korea, and cultured in Marine agar 2216 medium. The 16S rRNA gene sequence represented 99% identity with that of the members of the *Marinomonas* genus; hence, the isolated bacterium was named *Marinomonas* sp. SH-2. The crude agarase was prepared from a culture medium of *Marinomonas* sp. SH-2, and exhibited maximum agarase activity at 170.2 units/l. The optimum conditions were pH 6.0 and 30°C in 20 mM Tris-HCl buffer. The agarase activity of the bacterium was highly elevated from 20°C (42% relative activity) to 30°C (100%), and 82% activity was shown at 40°C. Its relative activities were less than 40% at over 40°C after a 0.5 hr exposure. Relative activity was 100% at pH 6.0, while it was 72% and 48% at pH 5.0 and pH 7.0, respectively. The enzyme from *Marinomonas* sp. SH-2 degraded agarose to neoagarohexaose and neoagarotetraose, indicating that the enzyme is β -agarase. Thus, *Marinomonas* sp. SH-2 and its enzyme could be practical for applications in food, cosmetic, and medical research.

Key words : Agarase, marine bacterium, *Marinomonas* sp. SH-1, neoagarohexaose, neoagarotetraose

서 론

한천(agar)은 홍조류의 세포벽에 존재하는 다당류로 미생물 배양 배지, 식품 산업의 안정제, 농축제 등으로 광범위하게 사용되어왔다. 한천에서 약 70%를 차지하고 있는 agarose는 3,6-anhydro α -L-galactopyranose와 β -D-galactopyranose의 잔기로 구성되어 있으며 전하를 띠지 않는 겔화 특성을 가진 다당류이다[2, 11].

한반도인 우리나라는 3면이 바다로 둘러싸여 있으며, 제주도과 남해안에서 대량으로 한천이 생산되고 있지만 전체생산량의 약 6.5% 정도만이 1차적인 가공형태로 활용되며 나머지는 대부분 방치되고 있다. 그러므로 방치되는 풍부한 한천을 이용하여 가치를 증진시킨다면 수산 경제 발전에 기여할 수 있을 것이다[8, 10, 12].

한천분해 효소(agarase)는 해조류의 세포벽에 있는 한천을 가수분해하는 능력을 가지고 있어 불안정한 물질의 추출, 원형질체의 제조 및 생체 활성 화합물의 제조 등에 사용될 가능

성이 높다. 한천분해효소의 분자량은 18,000 Da에서 360,000 Da의 여러 가지의 크기로 나타났으며 대부분 30~45°C, pH 중성 영역에서 최적의 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다 [5, 13]. 한천의 가수분해효소는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, α -agarase와 β -agarase로 구성된다. α -agarase는 α -1,3-결합을 가수분해하여 한천올리고당(agarooligosaccharides)을 생성하며, β -agarase는 β -1,4결합을 가수분해하여 네오한천올리고당(neoagarooligosaccharides)을 생산한다고 알려져 있다 [11].

고부가가치 소재로서의 활용 가능성이 높은 한천올리고당 및 네오한천올리고당의 보고된 기능성은 면역증진, 항암작용, 간세포보호, 항산화작용, 항균작용, 미백작용, 보습효과 등이 고, 바이오에탄올 생산을 포함하는 많은 연구가 수행되어져 왔다[3, 11].

한천분해효소에 의해 한천을 분해하는 균주로는 *Thalassomonas* sp. SL-5 [7], *Glaciecola* sp. SL-12 [8], *Agarivorans albus* QM38 [16], *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 [15], *Pseudoalteromonas* spp. [14] 등으로 많은 세균들이 보고되어 왔다.

미생물로부터 분리된 한천분해효소에 대한 특성이 연구되고 있으며, 한천분해효소 유전자를 클로닝하여 대량생산하는 연구도 진행되었다. 효소처리 생성물에 대한 생물학적 활성 연구는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 광범위하게 연구되고 있다[1, 4, 9].

본 연구에서는 해양에서 한천분해능이 있는 신규 미생물인 *Marinomonas* sp. SH-2를 분리·동정하였고, 균주가 생산하는

*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.

한천분해효소의 특성을 규명하여 산업적 사용 가능성을 분석하였다.

재료 및 방법

해양유래 한천분해 균주의 분리 및 동정

경상남도 남해군의 해안에서 시료를 채취하여 연속적으로 희석한 후 원액과 희석수를 100 μ l씩 Marine agar 2216 media (Difco, Detroit, USA)에 도말하였다. 시료액이 도말된 Marine agar 2216 media는 30°C에서 배양하였으며 평판배지를 함몰시키는 한천분해활성이 있는 SH-2 균주를 선별하였다. 선별한 SH-2 균주는 Marine broth 2216 media (Difco, Detroit, USA)에 접종하여 1일간 진탕배양(30°C, 250 rpm)하였다. 배양된 한천분해균주를 동정하기 위하여 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였다. Genomic DNA는 Wizard Genomic DNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 분리하였다. 분리된 Genomic DNA는 PCR을 하기 위한 주형으로 사용하였고, PCR primer는 1492R (5'-TAC GGH TACCT GTT ACG ACT T-3')과 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')를 이용했으며, PCR반응산물은 PCR/Gel Combo Kit (NulcleoGen, Siheung, Korea)로 정제하였다. DNA 염기서열 분석은 Cosmogentech (Seoul, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 분석된 염기서열은 BLAST를 사용하여 알려진 균주와 비교하였으며 윈도우 버전의 Clustal 프로그램(ClustalW2)을 이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 Neighbor-joining method와 Bootstrap method (n=1,000)로 분석하여 계통분류학적인 위치를 파악하였다.

배양시간에 따른 한천분해균의 성장과 효소활성

250 ml 삼각플라스크에 0.2% agar (LPS solution, Daejeon, KOREA)가 포함된 Marine broth 2216 media를 준비한 후 SH-2를 접종하여 30°C, 250 rpm으로 진탕배양하면서 12시간 간격으로 일부배양액을 채취하여 균주의 성장양상과 한천분해효소의 활성을 측정하였다.

해양유래 한천분해 균주의 생육 및 조효소액 제조

0.2% agar가 포함된 Marine broth 2216 media 4 ml가 들어 있는 시험관에 순수분리한 SH-2 균주를 접종한 후 30°C, 250 rpm에서 진탕배양기를 이용해서 1일간 진탕배양한 후 배양액을 Marine broth 2216 media 50 ml가 든 250 ml 삼각플라스크에 계대 배양한 후 4.5일간 30°C, 250 rpm에서 배양하였다. 4.5일간 배양된 배양액을 원심분리(3,000×g, 4°C, 15분)하여 획득한 상층액을 반투과성막(SnakeSkin Dialysis Tube, Thermo Scientific, USA)에 옮겨 담은 후 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충액에 넣고 4°C에서 투석을 실시하였다. 투석은 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충액을 2시간 간격으로 2회 교체

후 마지막은 12시간 이상으로 시행하였다. 조효소액은 투석 후 membrane filter (0.45 μ m, Milipore, USA)로 여과하였다. 여과된 조효소액은 Centriprep ultracell YM-10 (10,000 MWCO, Merck Millipore, Germany)을 이용하여 농축한 후 사용하였다.

효소활성 측정

한천분해효소의 반응산물의 환원당은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 측정하였다[9]. DNS용액은 NaOH 13.2 g, 3,6-dinitrosalicylic acid 7.07 g, sodium sulfate 5.53 g, potassium tartate (Rochelle salt) 204 g, phenol 5.07 g을 3차중류수 1 l에 녹여 제조하였다.

한천분해효소의 반응온도와 열안정성 측정에는 0.2% (w/v)의 agarose (Promega, Wisconsin, USA)를 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충액을 표준기질용액으로 사용하였다. 표준기질용액 1.0 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시키고, 효소반응액 1 ml에 DNS용액 3 ml를 첨가한 후 중탕으로 10분 동안 끓여서 반응시켰으며, 흐르는 물에 식힌 후에 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1분당 1 μ mole의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였으며, galactose를 이용하여 표준검정선을 작성하였다.

반응온도에 따른 한천분해 효소의 활성측정

중탕가열한 표준기질용액을 20, 30, 40, 50, 60, 70°C 등의 각 온도별로 냉각한 후 각 온도에서 효소 활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 열안정성 측정

조효소액 0.5 ml을 20, 30, 40, 50, 60, 70°C 등 각 온도별로 각각 0.5, 1, 1.5, 2시간 열처리한 후 효소 활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 pH에 따른 효소 활성 측정

pH에 따른 한천분해 활성을 측정하기 위해서 0.2%(w/v)의 agarose를 포함한 완충용액을 이용하였다. 측정에 사용된 pH와 완충용액의 종류는 pH 4.0-5.0 (20 mM sodium acetate), pH 5.0-8.0 (20 mM Tris-HCl), pH 8.0-9.0 (20 mM GTA (3,3-dimethyl- glutaric acid, Tris ((hydroxymethyl)-amino-methane, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol)였다.

한천가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

효소액을 이용하여 생산된 agarose의 분해산물을 thin-layer chromatography (TLC)로 분석하였다. 분해산물은 agarose 0.2% (w/v)가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충액 1 ml에 조효소액 0.5 ml을 혼합하여 30°C에서 0, 1, 24시간 동안 반응시켜 제조하였고, Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석하였다. TLC 분석은 *n*-butanol/acetic acid/

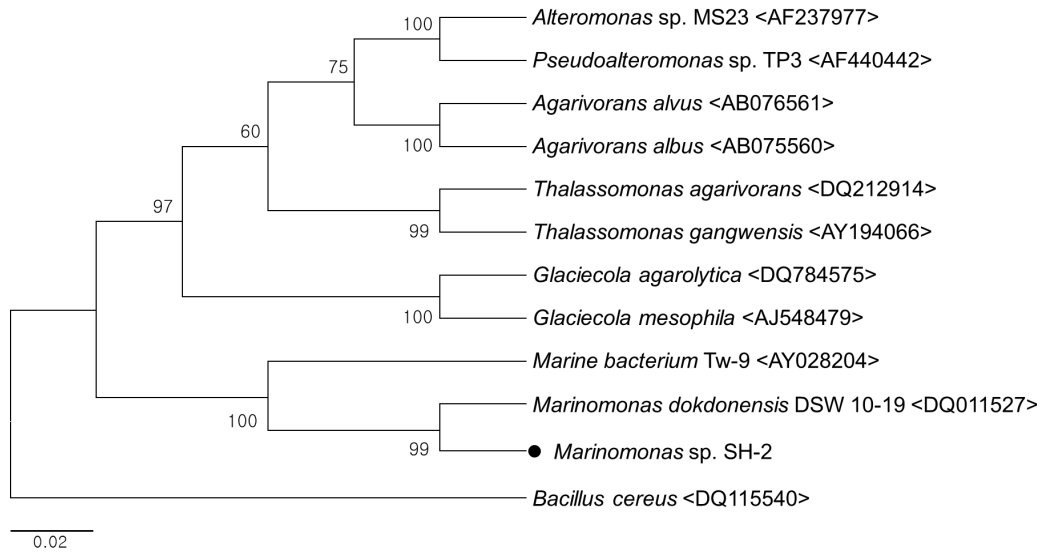


Fig. 1. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing isolated *Marinomonas sp. SH-2* strain with other bacteria. The numbers at the branch node are percentages of bootstrap values (n=1,000) and numbers in parenthesis are accession numbers in GenBank.

H₂O (2:1:1, by volume)를 사용하여 전개하였고, 10%(v/v) H₂SO₄를 이용하여 발색시켰다. 표준물질로는 D-galactose (Sigma, St. Louis, USA) 및 neoagarooligosaccharides [6]를 사용하였다.

결과 및 고찰

한천분해 균주의 분리 및 동정

경남 남해군 연안 해수를 채취한 후 한천분해 활성에 의해 배지를 함몰시키는 균주를 선발하였다. 선발된 균주를 Marine broth 2216 media에 접종하여 5일간 진탕배양(30°C, 250 rpm) 하였다. 배양된 균주의 16S rDNA를 PCR로 증폭시킨 후 정제하여 분석한 결과, 1,465 bp의 염기서열을 확인하였고, BLAST 탐색으로 *Marinomonas dokdonensis* DSW 10-19 [17] 및 *Marine bacterium Tw-9*와 99%의 가장 높은 상동성을 나타냈으므로, 분리균주를 *Marinomonas sp. SH-2*로 명명하였다. 본 연구와 Genbank에서 획득한 16S rDNA 염기서열을 Neighbor-joining method와 Bootstrap method (n=1,000)로 분석한 계통분류학적인 위치를 Fig. 1에 나타냈다.

한천분해균주의 성장과 효소 생산

0.2% agar가 포함된 Marine broth 2216 media에 *Marinomonas sp. SH-2*을 접종하였을 때 보이는 성장양상과 agarase 활성을 Fig. 2에 나타냈다. 배양시간에 따른 세균 성장의 결과를 살펴 보면 접종한 후 1일까지 흡광도 변화가 크게 나타났으며, 4일까지 개체군의 성장률이 점차 증가하였고, 그 이후 감소되었다. Agarase 활성은 개체군의 성장률이 가장 높은 4.5일에 높게 나타나 이후 연구에서는 4.5일 배양한 배양액을 이용하

여 agarase 활성을 측정하였다.

온도에 따른 한천분해 효소의 활성

각 온도별로 보이는 한천분해 효소의 활성을 Fig. 3에 나타냈다. 한천분해활성은 30°C에서 가장 높게 나타났으며, 30°C의 반응온도에서 나타난 활성을 100%로 하였을 경우, 40°C의 반응온도에서는 82%, 50°C의 반응온도에서는 47%, 60°C의 반응온도에서는 18%, 70°C의 반응온도에서 8%의 상대활성을 나타냈다. 균주에 따른 최적 온도는 *Agarivorans albus* QM38 [16], *Cellvibrio sp. KY-YJ-3* [15] 및 *Pseudoalteromonas spp.* [14]는 35°C로 *Marinomonas sp. SH-2*보다 높은 최적온도를 나타내었다. 또한, 한천분해활성의 강도에 있어서는 *Marinomonas sp. SH-2* 유래 한천분해 효소의 최고활성은 170.2 units/l로서 *Thalassomonas sp. SL-5* [7]의 363 units/l 및 *Glaciecola sp. SL-12* [8]의 233 units/l 보다는 낮은 활성을 나타내는 것을 확인할

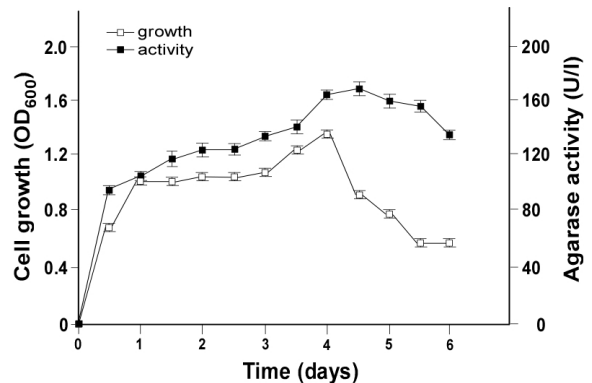


Fig. 2. Cell growth and agarase activity of *Marinomonas sp. SH-2* (■ agarase activity [units/l], □ cell growth [OD₆₀₀]).

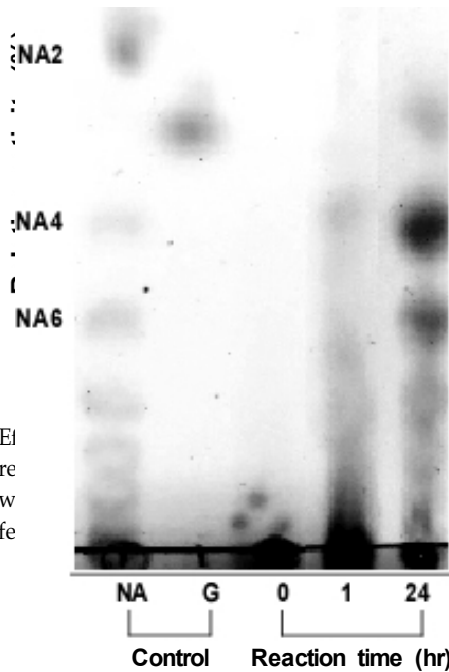


Fig. 3. Elution of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 30°C in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer with enzyme solution for 0, 1 and 24 hr. The reaction mixture was developed by TLC. (G, D-galactose; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose).

Fig. 6. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 30°C in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer with enzyme solution for 0, 1 and 24 hr. The reaction mixture was developed by TLC. (G, D-galactose; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose).

수 있었다.

Marinomonas sp. SH-2가 생성하는 한천분해효소의 열안정성은 0.5, 1, 1.5, 2시간 동안 각각의 온도(20, 30, 40, 50, 60, 70°C)에서 반응시킨 후 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 4). 0.5시간 열처리한 조효소의 활성은 20°C에서는 56%, 30°C에서는

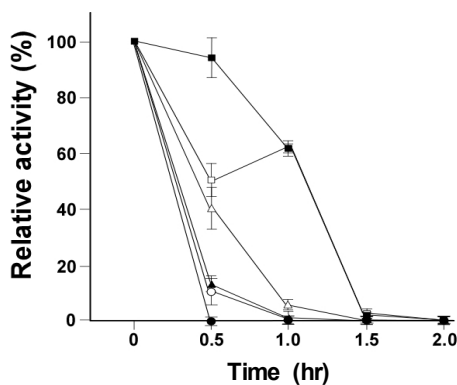


Fig. 4. Heat stability of agarase activity. The enzyme solutions were pre-incubated at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reactions were then carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C with 1 ml of 0.2% agar in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer and 0.5 ml of heat-treated enzyme solution for 30 min. (□ 20°C; ■ 30°C; △ 40°C; ▲ 50°C; ○ 60°C; ● 70°C).

94%, 40°C에서는 40%로 활성이 유지되는 것으로 보였지만, 0.5시간 이후에 40°C 이상의 온도에서는 활성이 50%이하로 감소하였다. 따라서 본 효소는 열안정성을 가지지 않는 것으로 판단되었다. 반면 *Thalassomonas* sp. SL-5의 agarase는 70°C에서 0.25시간 처리하였을 때 76%의 잔존활성이 있었고, 1시간 처리 후에도 약 30%의 잔존활성을 나타내었으며[7], *Glaciecola* sp. SL-12의 agarase는 0.5시간 처리하였을 때 40°C에서 80% 이상의 활성을 나타내었으며, 60°C에서도 50%이상의 활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다[8].

pH에 따른 한천분해 효소의 활성

최적 온도인 30°C의 반응온도에서 나타난 각 pH별 한천분해 효소의 상대활성을 Fig. 5에 나타냈다. 최고의 한천분해 활성을 나타내는 것은 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 pH 6.0으로 나타났다. 20 mM Tris-HCl 완충용액을 사용하였을 때 pH 6.0에서의 활성에 비해 pH 5.0에서 72%, pH 7.0에서 48%, pH 8.0에서 25%로 나타났다. 따라서 *Marinomonas* sp. SH-2는 약산성 범위에서 높은 활성을 나타내는 것으로 파악되었다. 균주에 따른 한천분해 효소의 최적 pH는 *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 [15] 및 *Pseudoalteromonas* spp. [14]는 pH 7.0으로 본 연구의 *Marinomonas* sp. SH-2보다 높은 최적 pH를 나타내었다.

한천올리고당 가수분해 산물의 TLC 분석

Marinomonas sp. SH-2 균주를 4.5일간 배양하여 제조한 조효소액에 agarose를 기질로 첨가하여 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 한천 혹은 agarose를 기질로 사용하면 β-agarase는 neoagarohexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose를 생성할 수 있으며, α-agarase는 agaropentose 및 agarotriose를 생성할 수 있다[2]. *Marinomonas* sp. SH-2 균주가 생산하는 한천분해 효소의 분해산물을 TLC로 분석한 결과, 반응시간 24시간 이하에서는 spot이 뚜렷하게 나타나지 않는 것으로 보아 agarose가 완전히 분해되지

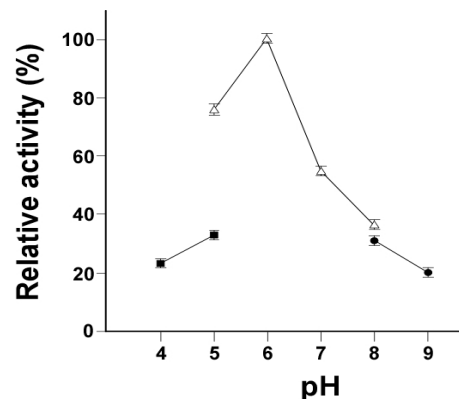


Fig. 5. Effect of pH on agarase activity. (■ 20 mM sodium acetate, pH 4.0-5.0; △ 20 mM Tris-HCl, pH 5.0-8.0; ● 20 mM GTA, pH 8.0-9.0).

않았다고 판단되었다. Spot이 뚜렷하게 나타난 24시간에는 neoagarotetraose와 neoagarohexaose가 생성되는 것으로 확인되었으며, 전체분해산물의 46.1%가 neoagarohexaose이고, 36.2%가 neoagarotetraose인 것으로 확인되었다. 주요 분해산물이 네오한천올리고당인 것으로 보아 *Marinomonas* sp. SH-2가 생산하는 한천분해효소는 β -agarase로 판단되었다[11]. 본 연구결과를 바탕으로 *Marinomonas* sp. SH-2의 배양조건 최적화 및 DNA cloning을 시도하여 β -agarase를 대량생산하고, 아가로스나 한천을 분해하여 고기능성 네오한천올리고당을 대량생산하면 화장품, 식품 및 의약품 산업 등의 다양한 분야에서 사용할 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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Kim, Y. J. 2010. Properties of the agarase and its gene isolated from a marine bacterium, *Tamlana agarivorans*. Chungnam National Univ. Taejon, Korea.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Lee, S. A., Kim, J. U., Jung, J. G., Kim, I. H., Lee, S. H., Kim, S. J. and Lee, J. H. 2006. Production of β -agarase in batch and fed-batch culture by *Agarivorans* sp. JA-1. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 389-393.
11. Lee, Y. D., Oh, C. H., Zoysa, M. D., Kim, H. W., Wickramarachchi, W. D. N., Whang, I. S., Kang, D. H. and Lee, J. H. 2013. Molecular cloning, overexpression, and enzymatic characterization of glycosyl hydrolase family 16 β -agarase from marine bacterium *Saccharophagus* sp. AG21 in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 913-922.
12. 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.
13. Nikapitiya, C., Oh, C. H., Lee, Y. D., Lee, S. K., Whang, I. S. and Lee, J. H. 2010. Characterization of a glycoside hydrolase family 50 thermostable β -agarase AgrA from marine bacteria *Agarivorans* sp. AG17. *Fish. Aqu. Sci.* **13**, 36-48.
14. Oh, Y. H., Jung, C. and 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.
15. Rhee, Y. J., Han, C. R., Kim, W. C., Jun, D. Y., Rhee, I. K. 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.
16. Xie, H., Han, B., Dong, W., Yang, Y., Chang, J., Peng, Y. and Liu, W. 2009. Isolation and characterization of a marine agarase. *Wei. Sheng. Wu. Xue. Bao.* **49**, 896-901.
17. Yoon, J. H., Kang, S. J. and Oh, T. K. 2005. *Marinomonas dokdonensis* sp. Nov., isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2303-2307.

초록 : 해양성 *Marinomonas* sp. SH-2 균주가 생성하는 agarase의 분리 및 특성조사

조정권 · 이솔지 · 이동근 · 이상현*

(신라대학교 일반대학원 바이오과학과)

본 연구에서는 많은 생리활성 기능을 갖는 한천올리고당과 네오한천올리고당을 생산할 수 있는 agarase를 생성하는 신규 해양성 세균을 분리하고, 이 균주가 생성하는 한천분해효소의 특성을 조사하였다. 한천분해활성을 가진 신규의 SH-2 균주는 경상남도 남해군 연안에서 채취한 해수에서 분리하였으며, 16S rDNA 염기서열분석을 통해 *Marinomonas* 속 세균과 약 99% 유사하여 *Marinomonas* sp. SH-2로 명명하였다. Agarase는 *Marinomonas* sp. SH-2 균주의 배양액으로부터 추출하였으며, 한천분해활성을 측정한 결과, pH 6.0의 20 mM Tris-HCl buffer를 사용할 경우 30°C에서 최고 활성(170.2 units/l)이 나타났다. 하지만, 40°C 이상의 온도에서 0.5시간 이상 처리할 경우 효소의 잔존활성이 40% 이하로 감소하는 것으로 보아 이 효소는 내열성을 가지지 않는다고 판단되었다. 효소의 가수분해산물을 TLC로 분석한 결과, *Marinomonas* sp. SH-2으로부터 생성되는 효소는 아가로스를 분해하여 neo-agarohexaose와 neoagarotetraose를 생성하여 β -agarase로 확인되었다. 따라서 *Marinomonas* sp. SH-2와 이 균주의 한천분해효소는 식품, 화장품, 의약품 연구 등에 실용적으로 적용할 수 있을 것이다.