ISSN (Print) 1225-9918
ISSN (Online) 2287-3406
Journal of Life Science **2016** Vol. 26. No. 4. 453~459 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2016.26.4.453

Characterization of β-agarase from Isolated *Simiduia* sp. SH-4

Jae-Deog Kim[1], Sol-Ji Lee[2], Jeong-Gwon Jo[2], Dong-Geun Lee[1,2] and Sang-Hyeon Lee[1,2]*

[1]*Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea*
[2]*Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 617-736, Korea*

Received November 13, 2015 /Revised December 18, 2015 /Accepted December 31, 2015

Agarases are classified into α-agarase and β-agarase that produce agarooligosaccharides and neoagarooligosaccharides, respectively. Neoagarooligosaccharides have whitening effect of skin, delay of starch degradation, and inhibition of bacterial growth etc. Hence, the object of this study was to isolate a novel agarase producing marine bacterium and characterization of its β-agarase. A novel agar-degrading bacterium was isolated from seashore of Namhae at Gyeongnamprovine, Korea and purely cultured with Marine agar 2216 media. The isolated bacterium was identified as *Simiduia* sp. SH-4 after 16S rRNA gene sequencing. The enzymatic sample was obtained from culture media of *Simiduia* sp. SH-4. Enzymatic activity was highly increased from 20(30% relative activity) to 30℃ (100%) and decreased from 30 to 40℃(75%) and so more. Relative activity was 100% at pH 6 while those were about 91% and 59% at pH 5.0 and 7.0, respectively, meaning the enzyme possesses narrow optimal pH range. Hence, the enzyme exhibited the maximal activity with 120.4 units/l at pH 6.0 and 30℃ in 20 mM Tris-HCl buffer. Thin layer chromatography (TLC) analysis showed that *Simiduia* sp. SH-4 produces β-agarase, which hydrolyze agarose to produce biofunctional neoagarooligosaccharides such as neoagarotetraose and neoagarobiose. Hence, broad applications would be possible using *Simiduia* sp. SH-4 and its enzyme in the food industry, cosmetics and medical fields.

Key words : β-Agarase, marine bacterium, neoagarobiose, neoagarotetraose, *Simiduia* sp. SH-4

서 론

Agaropectin과 agarose로 구성되어 있는 다당류인 한천(agar)은 홍조류의 세포벽성분으로 3,6-anhydro α-L-galactopyranose와 β-D-galactose의 중합체이다[3, 19]. 한천은 오래 전부터 젤리, 아이스크림 등 식품공업에 사용되어 왔으며 사람의 소화효소로는 분해되지 않아 다이어트 식품으로도 널리 이용되고 있다. 또한 agaropectin 등의 성분을 제거하고 순수정제한 agarose는 비전하를 띄는 낮은 융점의 물질로 미생물 배지 및 전기영동의 매체로 분자생물학 실험에 이용되고 있으며, 의약품, 화장품 등의 소재로 이용되고 있다[12, 18].

올리고당(oligosaccharides)은 2-10개의 당이 glycoside결합으로 탈수축합된 소당류로서, 기존당류의 과다섭취에 의해 충치, 비만, 성인병 발생의 문제점이 제기되자, 이를 예방하기 위한 대체 감미료로 주목받기 시작했다[7, 13].

과거에는 기능성 올리고당을 생산하기 위해 산가수분해법을 이용하였으나 특정한 올리고당을 생산하는데 있어 안정성과 기능성이 떨어지는 문제가 있었다[6]. 하지만 효소를 이용한 생산법은 특정한 올리고당을 생산할 수 있으며, 이렇게 생산된 올리고당은 고부가가치 천연감미료로 사용되고, 장내의 비피더스균을 증식시켜 주는 등 다양한 기능성을 가지기 때문에 새로운 소재로 각광받고 있다[17, 20]. 따라서 많은 연구진들이 한천분해효소를 생산하는 균주를 찾기 위해 많은 노력을 기울이고 있어 *Agarivorans* 속[10, 16], *Bacillus* 속[22], *Cellvibrio* 속[1], *Flammeovirga* 속[4], *Glaciecola* 속[12, 17], *Microbulbifer* 속[8], *Pseudoalteromonas* 속[18, 23], *Saccharophagus* 속[14], *Sphingomonas* 속[6], *Thalassomonas* 속[11], *Vibrio* 속[15, 21], *Zobellia* 속[20] 세균 등이 보고되어 있다. 또한 효소 유전자의 연구 및 agarose로부터 생성되는 물질의 생화학적 특성을 밝히는 연구가 활발하게 진행되고 있다[1].

한천분해효소는 분해하는 형태에 따라 α-agarase와 β-agarase로 분류된다[23]. α-agarase는 한천 다당류의 α-1,3 결합을 절단하여 한천올리고당(agarooligosaccharides)을 생산하고[4], β-agarase는 β-1,4 결합을 절단하여 네오한천올리고당(neoagarooligosaccharides)을 생산한다[13]. 특히 β-agarase에 의해 생산된 네오한천올리고당에 대해서는 세균성장 억제, 전분노화 방지, 대식세포 활성화, 미백효과, 보습효과, prebiotics, 바이오 에탄올 생산, 화장품, 식품 및 시약을 포함하는 등의 많은 연구가 수행되어왔다. 네오한천올리고당은 유용한 기능을 가지고 있어 이들을 활용하여 부가가치가 높은 다양한 제품을 생산할 수 있을 것이라 기대할 수 있다[5, 9, 12, 14].

***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.

본 연구에서는 국내 연안의 해수에서 한천분해효소를 생산하는 해양세균 *Simiduia* sp. SH-4를 분리하여 동정하였고, 이 해양세균의 성장 및 한천분해효소의 최적조건 등을 검토하였다.

재료 및 방법

한천분해 균주의 분리 및 동정

경상남도 남해군 미조면 연안의 해수를 멸균수로 희석하여 시료액을 제조한 후 해양세균 분리 및 증균용 배지인 Marine broth 2216 (Difco, Detroit, USA) 배지에 한천을 첨가한 Marine agar 2216 배지에 도말하여 30℃에서 배양하였다. 배양 후 한천분해활성에 의해 Marine agar 2216 배지를 함몰시키는 SH-4 균주를 3차례이상 순수분리하여 선발하였다. 순수분리한 균주를 Marine broth 배지 4 ml에 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 30℃, 250 rpm에서 1일 배양한 후 원심분리(3,000× g, 4℃, 15 min)하여 균체를 회수하였다. 균체로부터 Wizard Genomic DNA isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 genomic DNA를 획득하고, 이를 16S rDNA 단편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. PCR primer로는 27F [5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′ (M=C/A)]와 1492R [5′-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3′ (Y=C/T)]를 사용하였으며, 증폭된 DNA 단편은 PCR/Gel Combo Kit (NucleoGen, Siheung, Korea)로 정제하였다. DNA 염기서열 분석은 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에서 수행하였다. 분석된 염기서열은 BLAST를 사용하여 보고된 균주들과 유사도를 검토하였으며, Clustal 프로그램(ClustalW2)을 이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 neighbor-joining method로 계통분류학적 위치를 파악하였고 bootstrap method (n=1,000)로 타당성을 확인하였다.

배양시간에 따른 균주의 생장과 한천분해효소 활성 측정

Marine broth 배지 100 ml에 0.2% agar를 첨가하여 6일 동안 배양하면서 12시간마다 배양액을 채취하여 균주의 생장 및 한천분해효소활성을 측정하였다.

한천분해 균주의 생육 및 조효소액의 제조

Marine broth 2216 배지 4 ml가 들어있는 시험관에 순수분리한 균주를 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 30℃, 250 rpm에서 1일간 배양하고, 0.2%(w/v) 한천을 포함하는 Marine broth 배지 100 ml에 계대배양하여 3일간 진탕배양 하였다. 배양 후 배양액을 원심분리(3,000× g, 4℃, 15 min)하여 획득한 상층액에서 순수한 조효소액만을 획득하기 위하여 SnakeSkin Dialysis tubing (Thermo Scientific, USA)에 넣은 후 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 900 ml를 첨가하고, 4℃인 냉장실에서 3회 투석을 실시하였다. 투석을 통해 측정에 영향을 줄 수 있는 상층액 속의 한천분해산물 등을 제거하였다. 투석은 2시간마다 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)를 교환하는 것을 2번 반복한 후, 3회에는 12시간 이상 투석을 수행하였다. 투석이 완료된 조효소액은 membrane filter (0.45 μm, Millipore, USA)를 통과시킨 후 사용할 때까지 냉장보관하였다.

효소활성 측정

Agarase 활성은 반응산물인 환원당을 측정하는 DNS법으로 측정하였다. 조효소 반응액 1 ml에 DNS 시약(NaOH 13.2 g, 3,5-dinitrosalicylic acid 7.07 g, sodium sulfate 5.53 g, potassium sodium tartrate 204 g, phenol 5.07 g /D.W. 1 l) 3 ml을 첨가하여 100℃에서 10분간 가열한 후 분광광도계(X-ma 3000, Human Corporation, Korea)를 이용하여 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준적정곡선으로 D-galactose를 사용하여 작성하였고, 1분당 1 μmol의 galactose를 생산해내는 한천분해 효소의 양을 1 unit (U)로 정의하였다.

반응온도에 따른 한천분해 효소의 활성측정

온도에 따른 한천분해효소의 활성을 측정한 후 비교하기 위해서 기질용액으로 0.2% agarose (w/v)가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 중탕가열한 후 20-70℃의 온도별로 냉각하였다. 기질용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml을 첨가하여 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

pH에 따른 한천분해 효소의 활성측정

pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 축정하기 위해서 0.2% agarose (w/v)가 포함된 20 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.0-5.0), 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. 기질이 함유된 완충용액을 중탕가열한 후 30℃까지 냉각하고 항온수조를 이용하여 온도를 유지하면서 완충용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 열안정성 측정

열처리에 따른 효소의 열안정성을 측정하기 위해서 0.2% agarose (w/v)가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 조효소액 0.5 ml를 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃에서 0.5시간, 1시간, 1.5시간, 2시간 열처리한 후 기질용액 1 ml를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 측정된 효소활성은 열처리전의 효소활성과 비교하였다.

한천 가수분해산물의 TLC (Thin Layer Chromatography) 분석

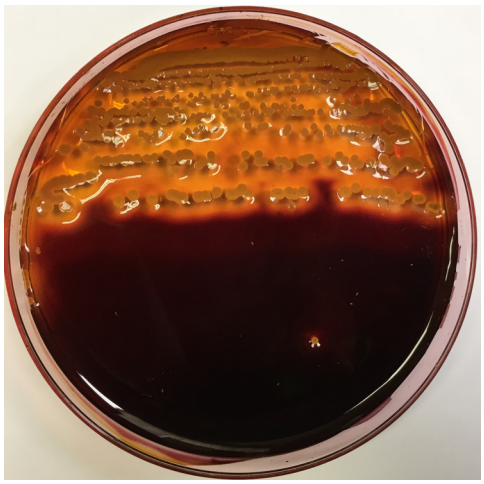

Fig. 1. Agar degrading activity of the isolated bacterium SH-4 on a Marine agar 2216 medium. Bright region represents the degradation of agar.

한천 분해산물을 TLC로 분석하기 위해서 0.2% agarose (w/v)가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 완충용액을 중탕가열한 후 30℃까지 냉각하고 완충용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 0, 0.25, 1, 6, 12, 24시간 반응시킨 후, Silica Gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 행하였다. 전개용매로 *n*-Butanol/acetic acid/H_2O [2/1/1(v/v/v)]를 이용하였고, 10%(v/v) H_2SO_4로 가시화시켰다. 표준물질로는 D-galactose (Sigma) 및 neo-agarooligosaccharides [10]를 사용하였다. TLC에 나타난 spot은 Image J 1.44o (Wayne Rasband, Bethesda, USA) 프로그램을 사용하여 분석하였으며, 이를 통해 가수분해산물의 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

한천분해균주의 분리 및 동정

해수 시료를 Marine agar 2216 배지에 도말하여 한천분해 활성이 우수한 균주를 선발하였다. 함몰이 일어난 부위의 균을 멸균된 백금이를 이용하여 Marine agar 2216 배지에 분리하는 것을 3차례 이상 수행하여 균주를 순수분리하였다. 분리한 SH-4 균주는 0.2%(w/v)의 agar를 포함하는 Marine broth 2216 배지에 접종하여 30℃, 250 rpm에서 3일간 진탕 배양한 후 DNS법을 이용하여 한천분해 활성을 측정하였다. 분리한 SH-4 균주가 나타내는 한천분해 양상을 Fig. 1에 나타내었다. 분리된 한천분해균 SH-4 균주의 16S rDNA 염기서열 분석결과 1,465 bp의 염기서열을 얻었고, BLAST 탐색으로 *Simiduia areninigrae* M2-5, *Simiduia* sp. KLE1111 및 *Simiduia aestuariiviva* J-MY2와 99%의 높은 상동성을 나타냈으므로, 분리균주를 *Simiduia* sp. SH-4으로 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.

균주의 생장에 따른 한천분해효소의 활성

Marine broth 배지 100 ml에 0.2% agar를 첨가하여 시간에 따른 균주의 생장 및 한천분해효소의 활성을 Fig. 3에 나타냈다. 균주 접종 후 12시간까지의 흡광도 변화가 크게 나타났으

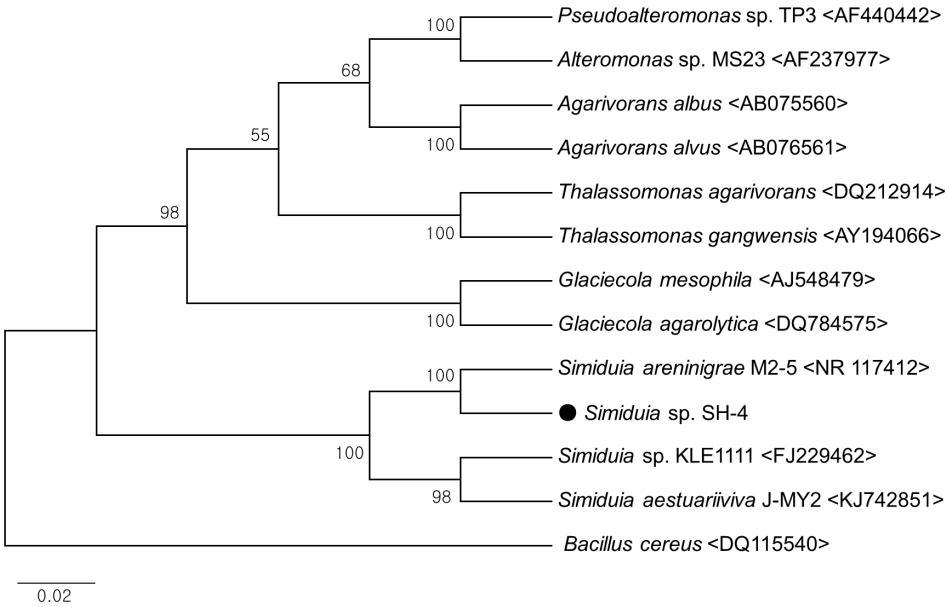

Fig. 2. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing isolated *Simiduia* sp. SH-4 strain with other bacteria. The numbers at the branch node are percentages of bootstrap values (n=1,000) and numbers in parenthesis are numbers in GenBank.

며, 72시간에서 균주의 생장이 정지기에 도달하였고, 그 이후 생장율이 감소하였다. 한천분해효소의 활성은 균주의 정지기인 84시간에 최고치를 나타내었으며, 96시간부터 감소되었다. 한천을 첨가한 경우보다 낮지만 *Simiduia* sp. SH-4 균주는 한천을 첨가하지 않아도 한천분해활성을 보였다(자료미제출). 따라서 *Simiduia* sp. SH-4 균주의 한천분해효소는 한천유무와 상관없이 발현되는 구성성(constitutive) 효소일 가능성도 있는 것으로 사료되었다. 따라서 이후의 연구에서는 균주를 84시간까지 배양시킨 후 효소활성 측정에 이용하였다.

온도변화에 따른 한천분해효소의 활성

각 온도에서 나타난 *Simiduia* sp. SH-4 유래 한천분해효소의 활성을 Fig. 4에 나타냈다. 20 mM Tris-HCl (pH 6.0)을 완충용액으로 사용하였을 때 30℃에서 최고의 활성이 나타났다. 30℃ 반응온도에서 나타난 효소활성을 100%로 나타냈을 때 40℃에서 75%, 50℃에서 48%, 60℃에서 13%의 상대활성을 나타냈다(Fig. 4). 이러한 결과로 *Simiduia* sp. SH-4가 생산하는 한천분해효소는 40-50℃에서도 높은 상대활성을 나타내므로, 비교적 고온에서도 활성이 높은 효소라는 것을 알 수 있었다. 균주에 따른 온도별 최적활성은 *Glaciecola* sp. SL-12 [12]는 30℃, *Thalassomonas* sp. SL-5 [11]는 40℃로 다양한 최적 온도가 보고되어 있다. 또한, 한천분해활성의 강도에 있어서도 *Simiduia* sp. SH-4 유래 한천분해효소의 최고활성이 120.4 U/l였다.

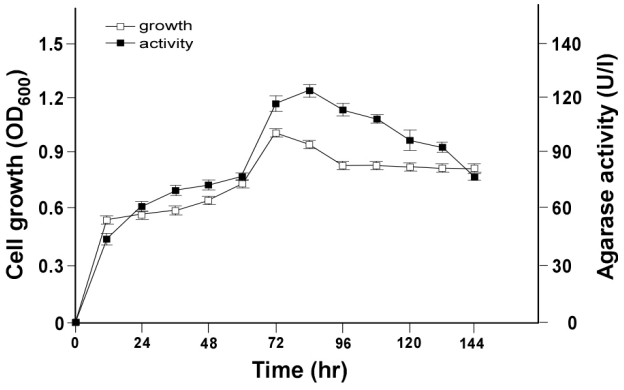

Fig. 3. Cell growth and agarase activity of *Simiduia* sp. SH-4 (■ agarase activity [units/l], □ cell growth [OD_{600}]).

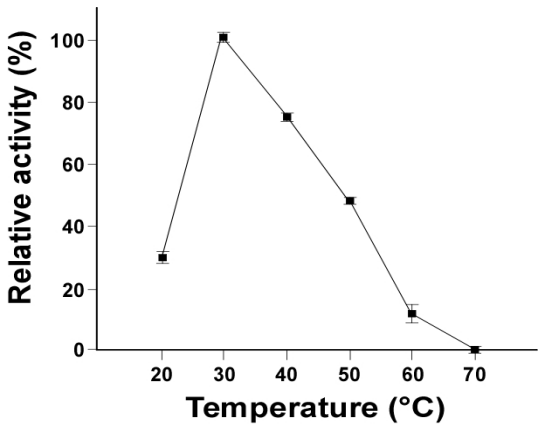

Fig. 4. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reaction was carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70℃ with 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min.

pH에 따른 한천분해효소의 활성

각 pH에서 *Simiduia* sp. SH-4 유래 한천분해효소의 활성을 Fig. 5에 나타냈다. 20 mM Tris-HCl (pH 6.0)을 완충용액으로 사용하였을 때 최고의 한천분해 활성을 나타냈다. 한천분해활성은 pH 5.0에서 90% 이상 상대활성을 나타내었으며 pH 7.0, 8.0, 9.0에서도 50% 이상의 상대활성을 나타내었다. 균주에 따른 한천분해효소의 최적 pH는 *Agarivorans* sp. JA-1 [19]과 *Vibrio* sp. JT0107 [21]의 경우 pH 8.0, *Bacillus* sp. MK03 [22]의 경우 pH 7.8, *Pseudomonas* sp. PT-5 [23]는 pH 8.5, *Agarivorans* sp. AG17 [16]은 pH 5.5로 균주에 따라 다양한 최적 pH가 보고되어 있다. *Simiduia* sp. SH-4 균주의 한천분해효소는 pH 5.0에서 최적활성의 90% 이상의 효율을 보여 추후 연구를 통하여 한천올리고당의 생산에 산가수분해법과의 결합도 가능할 수 있으며 중화에 필요한 염기성물질의 소모를 줄일 수도 있을 것으로 판단되었다.

열처리에 따른 한천분해효소의 활성

각 온도에서 열처리한 *Simiduia* sp. SH-4 유래 한천분해효소의 열안정성을 Fig. 6에 나타냈다. 20℃와 30℃에서 조효소액을 0.5, 1, 1.5 시간으로 열처리를 하였을 때 열처리를 하지 않은 효소에 비해 80% 이상의 상대활성을 유지하였다. 하지만 40℃ 이상의 온도에서는 0.5시간의 열처리하면 활성을 거의 잃어버렸다. 따라서 *Simiduia* sp. SH-4는 내열성을 가지고 있

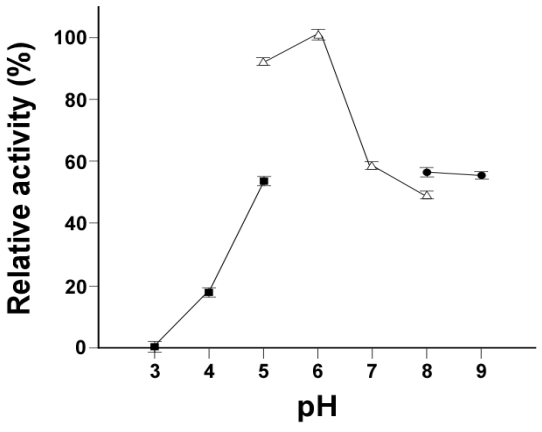

Fig. 5. Effect of pH on agarase activity. (■ 20 mM sodium acetate, pH 3.0-5.0; △ 20 mM Tris-HCl, pH 5.0-8.0; ● 20mM GTA, pH 8.0-9.0). The reactions were carried out at 30℃ in 1 ml of corresponding buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min.

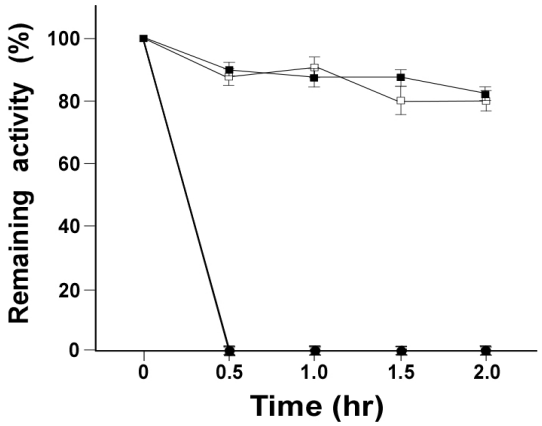

Fig. 6. Heat stability of agarase activity. The enzyme solution was pre-incubated at 20, 30, 40, 50, 60 and 70℃ for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reactions were then carried out at 30℃ in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of heat-treated enzyme solution for 30 min.

지 않다고 판단된다.

한천가수분해산물의 TLC분석

Simiduia sp. SH-4 균주를 84시간 배양하여 제조된 조효소액을 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 7에 나타냈다. 한천을 기질로 사용하면 β-agarase는 neoagarohexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose를 생성할 수 있으며, α-agarase는 agaropentose 및 agarotriose를 생성할 수 있다고 보고되어 있으며, TLC로 확인할 수 있다[4, 8, 16]. 각 반응 시간대에서 가수분해산물의 합을 100%으로 하였을 때 반응 시간대 별로 가수분해산물의 종류와 그 비율을 분석한 결과, 반응 1시간까지는 분해산물이 명확하게 보이지 않았고, 반응 6시간에는 neoagarotetraose (70.6%)와 neoagarobiose (29.4%)가 생산되었다. 반응 12시간에는 neoagarotetraose (61.7%)의 농도가 감소되고 neoagarobiose (38.3%)의 농도가 증가되었으며, 이후 24시간에는 neoagarobiose의 생산량이 증가되어 39.4%로 나타났다. *Simiduia* sp. SH-4 균주의 한천분해효소를 TLC 분석한 결과, neoagarotetraose와 neoagarobiose가 생산되었으므로 β-1, 4 결합을 절단하는 β-agarase로 판단되었다. β-agarase에 의해 생산되는 neoagarobiose 등의 neoagarooligosaccharide는 세포독성이 없는 피부 미백활성과 항산화 효과 등이 보고되어 있으므로[11, 16], 기능성 소재로서의 가능성이 높다고 할 수 있다. 본 연구에서 확보한 *Simiduia* sp. SH-4의 β-agarase는 보고되어 있는 타 균주의 β-agarase와 달리 약산성에서 활성이 좋다. 따라서 배양조건을 최적화하고, cloning을 통하여 *Simiduia* sp. SH-4가 생산하는 β-agarase의 최적온도 혹은 내열성을 증진시킨 후 대량생산한다면 neoagarooligosaccharide의 산업적 생산에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 기대된다. β-agarase는 아미노산 서열의 차이와 산물의 종류에 따라 GH (glycoside hydrolase) -16, -50, -86, 그리고 -118로 나누며 세포내 효소와 세포외 효소로 나눌 수 있다 [13]. 현재 파악한 최적 pH, 최적 온도, 주산물 외에 추가적 연구로 아미노산 서열의 파악 등을 통해 보다 심층적 비교가 가능할 것이다.

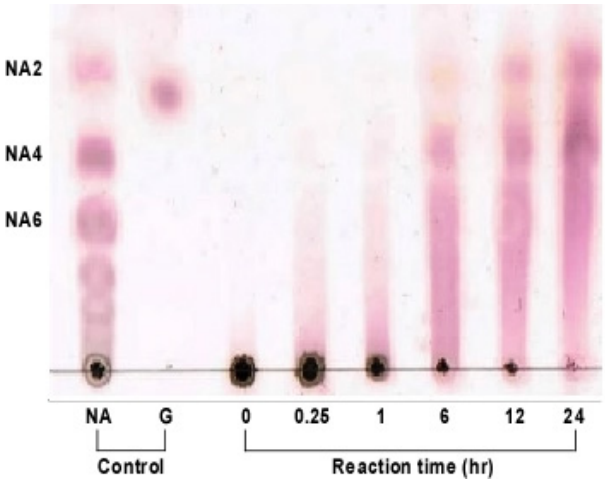

Fig. 7. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by the agarase. The reactions were carried out at 30℃ in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 0, 0.25, 1, 6, 12 and 24 hr. The reaction mixtures were developed by TLC. (G, D-galactose; NA, neoagarooligosaccharides; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose).

References

1. Ariga, O., Inoue, T., Kubo, H., Minami, K., Nakamura, M., Iwai, M., Moriyama, H., Yanagisawa, M. and Nakasaki, K. 2012. Cloning of agarase gene from non-marine agarolytic bacterium *Cellvibrio* sp. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22,** 1237-1244.
2. Fu, X. T., Pan, C. H., Lin, H. and Kim, S. M. 2009. Gene cloning, expression, and characterization of a beta-agarase, agarB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19,** 257-264.
3. Hong, J. H., Lee, J. J., Hur, S. H., Choi, H. S. and Kong, J. Y. 2001. Effect of agarooligosaccharides on the growth of intestinal bacteria. *J. Fd. Hyg. Safety* **16,** 11-15.
4. 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.
5. Jang, M. K., Lee, O. H., Yoo, K. H., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2007. Secretory overexpression of β-agarase in *Bacillus subtilis* and antibacterial activity of enzymatic products. *J. Life Sci.* **17,** 1601-1604.

6. Jung, I. S., Kim, Y. J., Song, H. J., Gal, S. W. and Choi, Y. J. 2008. Purification and properties of a novel extracellular agarase from marine bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* AS-1. *J. Life Sci.* **18,** 103-108.
7. 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.
8. Kim, D. K., Jang, Y. R., Kim, K. H., Lee, M. N., Kim, A. R., Jo, E. J., Byun, T. H., Jeong, E. T., Kwon, H. J., Kim, B. W. and Lee, E. W. 2011. Isolation and culture properties of a thermophilic agarase-producing strain, *Microbulbifer* sp. SD-1. *Fish Aquat. Sci.* **14,** 186-191.
9. Kim, Y. N., Lee, J. R., Kim, M. C., Kim, S. B., Chang, Y. K., Hong, S. K. and Kim, C. J. 2011. Optimization of anion-exchange chromatography for the separation of agarase from culture broth of *Pseudoalteromonas* sp.. *Kor. Chem. Eng. Res.* **49,** 840-845.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Lee, D. G. and Lee, S. H. 2012. The classification, origin, collection, determination of activity, purification, production, and application of agarases. *J. Life Sci.* **22,** 266-280.
14. Lee, Y. D., Oh, C. H., Zoysa, M. D., Kim, H. W., Wickramaarachchi, 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. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23,** 913-922.
15. Meinita, M. D. N., Luyen, H. Q., Hwang, S. Y., Kang, J. Y., Jin, D. H. and Hong, Y. K. 2008. Isolation of the agarolytic bacterium *Vibrio cyclotrophicus* DAG-130 from abalone cut. *Fish Aquat. Sci.* **11,** 76-81.
16. Nikapitiya, C., Oh, C. H., Lee, Y. D., Lee, S. Y., 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 Aqua. Sci.* **13,** 36-48.
17. Ohta, Y., Hatada, Y., Miyazaki, M., Nogi, Y., Ito, S. and Horikoshi, K. 2005. Purification and characterization of a novel alpha-agarase from a *Glaciecola* sp. *Curr. Microiol.* **50**, 212-216.
18. Park, D. Y. 2013. Molecular characterization of agarase from the novel marine bacterium, *Pseudoalteromonas hodoens*. *M.S. dissertation*. Myongji University, Seoul, Korea.
19. Park, G. T., Lee, D. G., Kim, N. Y., Lee, E. J., Jung, J. G., Lee, J. H., Heo, M. S. and Lee, S. H. 2005. Isolation and characterization of a marine bacterium producing thermotolerant agarase. *J. Life Sci.* **15,** 884-888.
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. Sugano, Y., Terada, I., Arita, M., Noma, M. and Matsumoto, T. 1993. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* **59,** 1549-1554.
22. Suzuki, H., Sawai, Y., Suzuki, T. and Kawai, K. 2002. Purification and characterization of an extracellular α-neoagarooligosaccharide hydrolase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci. Bioeng.* **93,** 456-463.
23. 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.

초록 : 분리된 *Simiduia* sp. SH-4가 생산하는 β-agarase의 특성조사

김재덕[1] · 이솔지[2] · 조정권[2] · 이동근[1,2] · 이상현[1,2]*
([1]신라대학교 제약공학과, [2]신라대학교 일반대학원 바이오과학과)

경상남도 남해군 미조면 연안으로부터 채취한 해수를 Marine agar 2216 배지에 도말하여 한천분해활성을 보이는 SH-4 균주를 분리하였다. 선택된 SH-4 균주는 16S rDNA 염기서열분석을 통해 *Simiduia* sp. SH-4로 명명하였다. *Simiduia* sp. SH-4 균주의 배양액으로부터 한천분해효소를 획득하여 한천분해활성을 측정하였다. 한천분해활성의 강도에 있어서 *Simiduia* sp. SH-4 유래 한천분해효소의 최고활성은 120.4 U/l로 나타났다. 한천분해활성은 30℃에서 최고치를 나타내었으며, 30℃에서의 활성을 100%로 하였을 때 20℃에서 30%, 40℃에서 75%의 상대활성을 나타내었다. 최적 pH는 pH 6.0으로 pH 6.0의 활성을 100%로 하였을 때 pH 5.0과 pH 7.0에서 각각 91%와 59%의 상대활성을 나타내었다. TLC 분석 결과, *Simiduia* sp. SH-4는 neoagarotetraose 및 neoagarobiose 등의 neoagarooligosaccharides를 생성하는 것으로 보아 β-agarase를 생산하는 균주로 확인되었다. 따라서 *Simiduia* sp. SH-4균주와 이 균주가 생산하는 β-agarase는 식품, 화장품, 의약품 산업에서 기능성소재 생산자로서 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.