

신규 한천분해세균 *Maribacter* sp. SH-1의 분리 및 효소 특성조사

이창은¹, 이솔지², 이동근², 이상현^{1,2*}

¹신라대학교 그린화학융합공학과

²신라대학교 바이오과학과

Received: November 11, 2015 / Revised: April 14, 2016 / Accepted: May 2, 2016

Isolation of a New Agar Degrading Bacterium, *Maribacter* sp. SH-1 and Characterization of its Agarase

Chang-Eun Lee¹, Sol-Ji Lee², Dong-Geun Lee², and Sang-Hyeon Lee^{1,2*}

¹Department of Green-Chemistry Convergence Engineering, ²Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 46958, Republic of Korea

In this study, we isolated a new agar-degrading marine bacterium and characterized its agarase. An agar-degrading marine bacterium SH-1 was isolated from seawater, collected from the seashore of Namhae in Gyeongnam province, Korea, and cultured in marine agar 2216 media. It was identified as *Maribacter* sp. SH-1 by phylogenetic analyses, based on 16S rRNA gene sequence. The extracellular agarase was extracted from culture media of *Maribacter* sp. SH-1 and characterized. Its relative activities were 56, 62, 94, 100, and 8% at 20, 30, 40, 50, and 60°C, respectively, whereas 15, 100, 60, and 21% relative activities were observed at pH 5, 6, 7, and 8, respectively. Its extracellular agarase exhibited maximum activity (231 units/l) at pH 6.0 and 50°C, in 20 mM Tris-HCl buffer. Therefore, this agarase would be applicable as it showed the maximum activity at the temperature at which the agar is in a sol state. Furthermore, the agarase activities remained over 90% at 20, 30, and 40°C after 0.5 h exposure at these temperatures. Thin layer chromatography analysis suggested that *Maribacter* sp. SH-1 produces extracellular β -agarase, as it hydrolyzes agarose to produce neoagarooligosaccharides, such as neoagarohexaose (34.8%), neoagarotetraose (52.2%), and neoagarobiose (13.0%). *Maribacter* sp. SH-1 and its β -agarase would be useful for the production of neoagarooligosaccharides, which shows functional properties, like skin moisturizing, skin whitening, inhibition of bacterial growth, and delay in starch degradation.

Keywords: Agar-degrading bacterium, β -agarase, marine bacterium, *Maribacter* sp. SH-1, neoagarooligosaccharides

서 론

한천(agar)은 홍조류에서 추출한 친수 콜로이드로 바다에 서식하는 대형 홍조류인 우뚝가사리, 해지누아리, 석무 및 꼬시래기 등의 주요 세포벽 구조성분이다[2, 5, 7, 21]. 한천은 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있으며, agarose는 1→3 결합으로 연결된 β -D-galactopyranose와 1→4 결합으로 연결된 3,6-anhydro- α -L-galactose가 교대로 결합된 중합체이다. Agaropectin에는 agarose와 달리 sulfoxy, methoxy 및 pyruvate 잔기 등에 의해서 수식된 3,6-anhydro- α -L-

galactose가 존재한다[22, 23].

한천분해효소인 agarase에 의한 분해생성물인 한천올리고당은 생리활성이 높아 화장품, 의약품 및 건강기능성식품에 널리 사용되고 있으며, 당뇨병, 난소화성, 비만, 변비 등의 예방과 치료에도 효과가 있다고 알려져 있다[6, 10, 12, 21]. 고부가가치 소재로서의 활용 가능성이 높은 한천올리고당을 생산하기 위한 방법으로는 산가수분해법과 한천분해효소(agarase)를 이용하는 효소적 가수분해법이 있는데[8], 산가수분해법은 무작위로 한천을 분해하므로, 한천올리고당의 기능성 및 안정성이 확보되기 어렵고, 효소적 가수분해법은 선택적으로 한천을 분해하므로 활성형 올리고당을 생산하는데 유용한 것으로 알려져 왔다[10]. 한천분해효소는 한천의 α -1, 3 결합을 끊어 agarooligosaccharides를 생산하는 α -agarase와 β -1, 4 결합을 끊어 neoagarooligosaccharides를

*Corresponding author

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

E-mail: slee@silla.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

생산하는 β -agarase로 나뉜다. α -agarase가 생산하는 agarooligosaccharides는 항산화 효과와 항암 활성을 가지고 있으며, β -agarase가 생산하는 neoagarooligosaccharides는 세균성장 억제, 전분노화 방지, 대식세포 활성화, 보습효과 및 미백효과를 가지므로, 의약품, 건강기능식품 등에 이용될 수 있다[3, 7, 12].

따라서 고기능성인 한천분해산물의 생산을 위해 한천분해 효소를 생산하는 균주에 대한 연구들이 많이 이루어지고 있으며 특히 β -agarase에 관한 연구가 최근까지 많이 보고되고 있다. 지금까지 보고된 균주로는 *Cellvibrio* 속[3], *Alteromonas* 속[4], *Microbulbifer* 속[11], *Pseudoalteromonas* 속[14, 20], *Flammeovirga* 속[8], *Glaciecola* 속[17], *Thalassomonas* 속[16], *Neiella* 속[18] 등이 있으며, 이 균주들이 생산하는 β -agarase의 효소학적 특성규명이 두드러지게 연구되고 있는 상태이다.

한편, 기질이 고체보다는 액체상태 그리고 gel 상태보다는 sol 상태일 때 효소에 의한 반응이 원활히 일어난다. 한천은 45°C 이상의 온도에서 sol 상태에 있다[8]. 따라서 45°C 이상의 고온에서 활성이 있는 한천분해효소를 생산하는 균주를 탐색하는 것은 중요하다.

본 연구에서는 45°C 이상의 온도에서 활성이 우수한 한천분해효소를 생산하는 미생물을 분리하기 위하여 국내 연안의 해수로부터 한천 분해 세균을 분리하고 동정하였으며 이 세균이 생산하는 한천분해효소의 생화학적 특성을 조사하였고 산업적 적용가능성이 높을 것으로 판단하였다.

재료 및 방법

한천분해 균주의 분리 및 동정

경상남도 남해군 미조면 연안에서 한천분해활성을 가지는 세균의 분리를 위한 시료를 채취하였으며, Marine broth 2216 (Difco, USA) 배지에 한천을 첨가한 Marine agar 2216 배지에 시료액을 도말한 후 30°C에서 배양하면서 한천분해활성으로 Marine agar 2216 배지를 함몰시키는 SH-1 균주를 3차례 이상 순수분리하여 선별하였다. 순수분리된 균체로부터 Wizard Genomic DNA Isolation Kit (Promega, WI, USA)를 사용하여 genomic DNA를 획득하고, 16S rDNA 유전자 단편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. PCR primer로는 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, Korea)로 정제하였다. DNA 염기서열 분석은 Cosmo Genetech (Korea)에서 수행하였다. 분석된 염기서열은 BLAST를 사용하여 보고된 균주들과 유사도를 검토하였으며, Clustal 프로그램(ClustalW2)을

이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 Neighbor-joining method와 Bootstrap method ($n = 1,000$)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

한천분해 균주의 배양

Marine broth 2216 배지 4 ml에 순수분리한 SH-1 균주를 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 하룻 동안 진탕배양한 후, 0.2% (w/v)의 agar가 첨가된 Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 삼각플라스크에서 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 3일 동안 진탕배양하였다.

배양시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성 측정

Marine broth 2216 배지 100 ml에 0.2% (w/v)의 agar를 첨가한 후 SH-1 균주를 접종하여 30°C, 250 rpm에서 진탕배양하였고, 12시간마다 일부 배양액을 수득하여 시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소의 활성을 측정하였다.

조효소액의 제조

배양액을 원심분리하여(3,000 \times g, 4°C, 15 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액 15 ml를 Snake Skin Dialysis Tubing (Thermo Scientific, USA)에 넣고 1 L 비커에 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)를 900 ml 첨가하고, 4°C인 냉장실에서 2시간마다 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)를 갈아주는 것을 2번 반복한 후 3번째에는 12시간 이상 투석을 시행하였다. 투석이 완료된 조효소액은 membrane filter (0.45 μ m, Milipore, USA)를 통과시킨 후에 4°C에서 냉장 보관하였다.

효소활성 측정

Agarase 활성은 DNS법을 이용하여 측정하였다. DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변형법[4]으로 환원당을 측정하는 방법이다. DNS solution은 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 g을 증류수 1 L에 녹여서 제조하였다. 1 ml의 효소 반응액에 3 ml의 DNS solution을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준적정곡선으로 D-galactose를 사용하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1 μ M의 galactose를 생산하는 한천분해 효소의 양을 1 unit (U)으로 나타내었다.

pH에 따른 한천분해 효소의 활성측정

pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 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. 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 모든 완충용액을 증탕 가열한 후 40°C를 유지하면서 완충용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

반응온도에 따른 한천분해 효소의 활성측정

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해효소의 활성을 비교하였다. 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 증탕 가열한 후 20–70°C의 온도별로 냉각하였다. 기질용액 1.0 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 열안정성 측정

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해효소의 활성을 비교하였다. 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 각 온도별로 30분 열처리한 후, 기질용액 1.0 ml를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 측정된 효소활성은 열처리전의 효소활성과 비교하였다.

한천가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

효소액을 이용한 agarose의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 조효소액과 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 50°C에서 0, 0.25, 0.5, 1.5, 6, 13시간 반응시킨 후, Silica Gel 60 TLC Plate (Merck,

Germany)로 분석을 수행하였다. *n*-Butanol/acetic acid/H₂O (2/1/1 (v/v/v))를 이용하여 전개시켰고, 10% (v/v) H₂SO₄로 가시화시켰다. 표준물질로는 D-galactose (Sigma) 및 neoagarooligosaccharides [15]를 사용하였다. TLC에서 나타난 가수분해산물의 농도를 계산하기 위하여 Image J 1.44 (Wayne Rasband, USA)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

한천분해균주의 분리 및 동정

경상남도 남해군 미조면 연안의 해수 시료를 Marine agar 2216 배지에 도말하여 한천 분해능이 우수한 균주를 선별하였다. 함몰이 일어난 부위의 균을 멸균된 백금이를 이용하여 Marine agar 2216 배지에 3차래 이상 streaking하여 균주를 순수분리하였다. 분리된 한천분해능 SH-1 균주의 16S rDNA 염기서열 분석결과 1,465 bp의 염기서열을 얻었고, BLAST 탐색으로 *Maribacter* sp. KMM 6377 및 *Maribacter* sp. w-11-2와 99%의 가장 높은 상동성을 나타냈으므로, 분리균주를 *Maribacter* 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. 1에 나타냈다.

시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성 측정

Marine broth 2216 배지 100 ml에 0.2% (w/v)의 agar를 첨가한 후 SH-1 균주를 접종하여 30°C, 250 rpm에서 진탕 배양하였을 때 나타나는 생육양상과 효소활성을 Fig. 2에 나타냈다. 시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성의 측정결과를 살펴보면, 72시간까지 균의 수가 증가하는 대수기

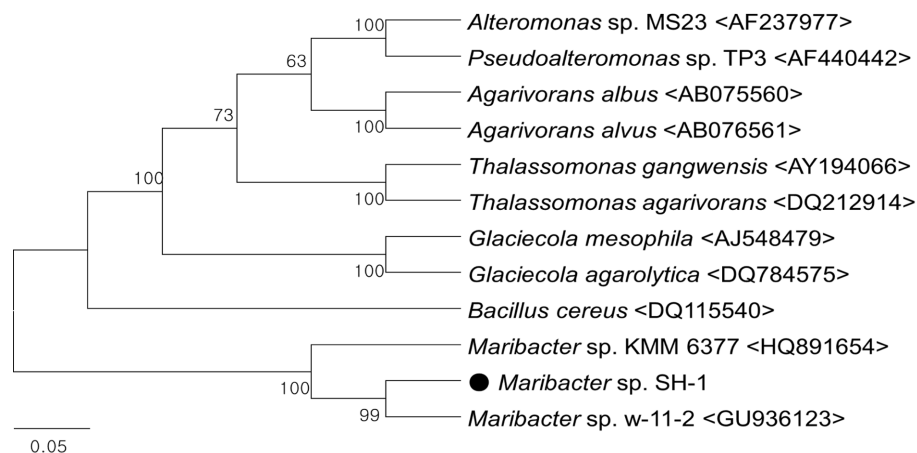


Fig. 1. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing isolated *Maribacter* sp. SH-1 strain with other bacteria. The numbers at the branch node are percentages of bootstrap values ($n = 1,000$) and numbers in parenthesis are numbers in GenBank.

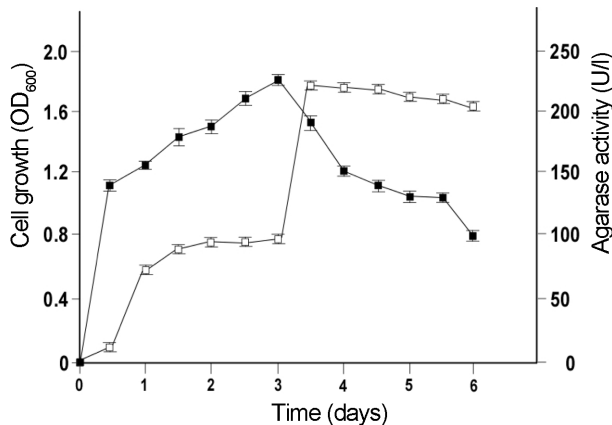


Fig. 2. Cell growth and agarase activity of *Maribacter* sp. SH-1. (■ agarase activity [units/l], □ cell growth [OD₆₀₀]).

로 나타났으며, 이 후 성장이 지체되었다. 배양 시간에 따른 배양액으로 외분비된 agarase의 활성도를 측정된 결과, 배양 12시간 이후부터 균 증식속도와 비례적으로 활성도가 증가하며 배양 72시간까지 최대의 활성을 보여 주었다. *Maribacter* sp. SH-1 균주의 한천분해효소는 성장의존성 산물로 확인되었고, 이후의 연구에서는 72시간까지 진탕배양하여 생성된 효소액을 활성 측정에 이용하였다.

pH에 따른 한천분해효소의 활성

각 pH에서의 한천분해효소의 활성을 Fig. 3에 나타냈다. 사용한 완충용액과 pH 중 최고의 활성을 나타내는 것은 pH 6.0의 20 mM Tris-HCl 완충용액으로 나타났다. 또한,

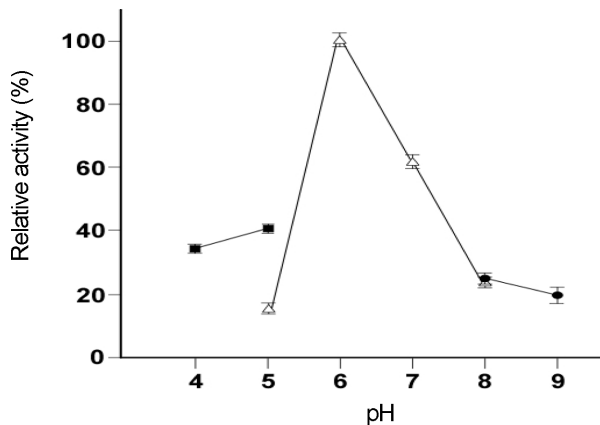


Fig. 3. Effect of pH on agarase activity. (■ 20 mM sodium acetate, pH 4.0–5.0; △ 20 mM Tris-HCl, pH 5.0–8.0; ● 20 mM GTA, pH 8.0–9.0). The reactions were carried out at 30°C in 1 ml of corresponding buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min. The values obtained at pH 6.0 were taken to be 100%. All data shown are mean values from at least three replicate experiments.

20 mM Tris-HCl 완충용액으로 활성을 측정하였을 때 pH 7.0에서 한천분해 상대활성이 pH 6.0에서의 최고활성에 비해 60% 이상이였다. 균주에 따른 한천분해효소의 활성에 있어서의 최적 pH는 *Pseudoalteromonas* sp. CY-24의 경우 pH 6.5이였고[20], *Microbulbifer* sp. SD-1의 경우 pH 6.0이었으며[11], *Bacillus cereus* ASK202의 경우 pH 7.8 [6], *Agarivorans albus* YKW-34 [5], *Glaciecola* sp. SL-12 [17]와 *Thalassomonas* sp. SL-5 [16] 및 *Sphingomonas paucimobili* AS-1 [10], 해양성 SH-1 균주[18]와 *Alteromonas macleodii* subsp. GNUM08120 [4]의 경우는 모두 pH 7.0으로 균주에 따른 한천분해효소의 다양한 최적 pH가 보고되어 있다.

온도에 따른 한천분해효소의 활성

최적 pH인 pH 6.0의 20 mM Tris-HCl 완충용액을 사용하였을 때 각 온도에서의 한천분해효소의 활성을 Fig. 4에 나타냈다. 본 효소는 50°C에서 최고활성을 보였으며 배양액에서 구한 활성은 231 U/l로 나타났다. 가장 높은 활성을 나타낸 50°C의 반응온도에서 나타난 효소활성을 100%로 하였을 때, 40°C에서 94%, 30°C에서 62%의 상대활성을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과로 *Maribacter* sp. SH-1가 생산하는 한천분해효소는 비교적 높은 온도인 50°C에서 가장 활성이 높았다. 균주에 따른 한천분해효소의 온도별 최적활성은 *Glaciecola* sp. SL-12 [17], *Agarivorans albus* YKW-34 [5]와 *Microbulbifer* sp. SD-1 [11]는 30°C에서, 해양성 SH-1 균주[18], *A. macleodii* subsp. GNUM08120 [4], *Pseudoalteromonas* sp. CY-24 [20], *Thalassomonas* sp. SL-5 [16]와 *Sphingomonas paucimobili* AS-1 [10]는

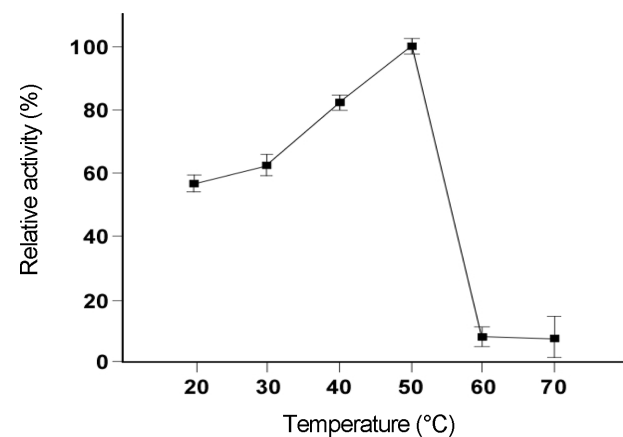


Fig. 4. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reactions were carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min. The values obtained at 50°C were taken to be 100%. The relative activities are the averages from three independent experiments.

40°C에서 나타났는데, 본 연구에서 분리한 *Maribacter* sp. SH-1 균주 유래의 한천분해효소는 이들보다는 5–15°C 정도 높은 온도에서 최적활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 고체한천을 가열하여 녹인 한천용액은 45°C 이하의 온도에서는 gel이 되는데[8], Bannikova 등[1]은 고온성세균인 *Thermoanaerobacter*와 *Caldoanaerobacter* 속 세균이 50°C 이상에서 한천분해활성이 우수한 효소를 생산한다고 보고하였다. 하지만 이들은 혐기성세균으로 다량의 효소를 혐기적으로 생산하는데 어려움이 있으며 한천분해유전자의 재조합 발현에 대한 보고도 아직 없다. 한편 무작위 돌연변이(random mutagenesis)와 부위특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 통해 한천분해효소의 최적온도와 열안정성을 상승시킨 보고도 있었다[9, 19].

본 연구의 *Maribacter* sp. SH-1 유래의 한천분해효소는 45°C 이상의 온도에서도 높은 활성을 나타내므로 기질인 한천이 sol 상태의 조건에서 분해반응을 수행할 수 있어 보다 효율적인 한천분해공정의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 또한, 한천분해활성의 강도에 있어서도 *Maribacter* sp. SH-1 유래 한천분해효소의 최고활성이 231 U/l로 *Thalassomonas* sp. SL-5 [16]의 363 U/l보다는 낮지만 *Glaciecola* sp. SL-12 [17]의 233 U/l와 비슷한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

한천분해효소의 열안정성

Maribacter sp. SH-1 유래 한천분해효소의 열안정성을 Fig. 5에 나타냈다. 20, 30, 40°C에서는 30분의 열처리를 하여도 열처리하지 않은 효소에 비해 90% 이상의 상대활성을

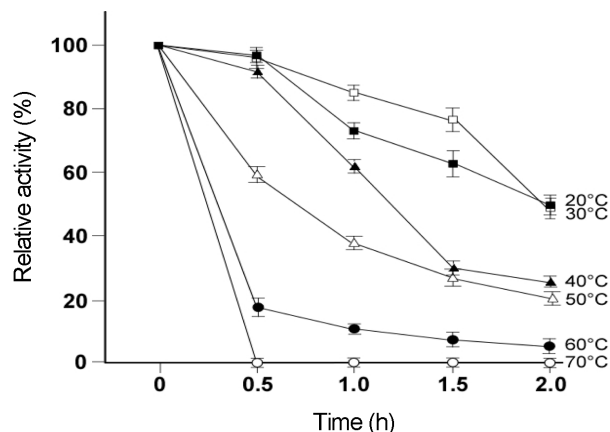


Fig. 5. Heat stability of agarase activity. The enzyme solutions were pre-incubated at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 h. The reactions were then carried out at 50°C in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of heat-treated enzyme solution for 30 min. The agarase activities were remained over 90% at 20, 30 and 40°C after 0.5 h exposure at that temperatures.

유지하였지만 50°C에서는 30분간 열처리를 하였을 때 열처리하지 않은 효소 활성에 비해 50% 이상의 상대활성을 보였다. 돌연변이법을 통해 열안정성을 향상시킨다면 산업적 활용가치를 더욱 높일 수 있을 것이다[9, 19].

한천가수분해산물의 TLC 분석

Maribacter sp. SH-1 균주를 3일간 배양하여 제조된 조효소액에 0.2% (w/v)의 agarose를 기질로 첨가하여 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 한천 혹은 agarose를 기질로 사용하면 β -agarase는 neoagarohexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose 등의 neoagarooligosaccharides를 생성할 수 있으며, α -agarase는 agaropentose 및 agarotriose 등의 agarooligosaccharides를 생성할 수 있다 [7]. *Maribacter* sp. SH-1 균주가 생산하는 한천분해효소의 가수분해산물을 TLC로 분석한 결과, 주로 neoagarotetraose (NA4) 및 neoagarohexaose (NA6)를 생산하고, neoagarobiose (NA2)도 일부 생산하는 것으로 나타났다. 시간에 따른 가수분해산물의 농도를 측정된 결과, 0.25시간의 반응에서 이미 NA2, NA4, NA6 등의 산물이 형성되었고 6시간째에 NA6 이상의 산물이 줄어드는 것으로 나타났지만 13시간째를 보면 다시 NA6 이상의 산물이 증가하였다(Fig. 6). 각 시간에서 생산된 가수분해산물의 합을 100%로 하여 NA2, NA4 등의 상대비율을 보면 가수분해산물은 비슷한 비율로 농도가 유지되

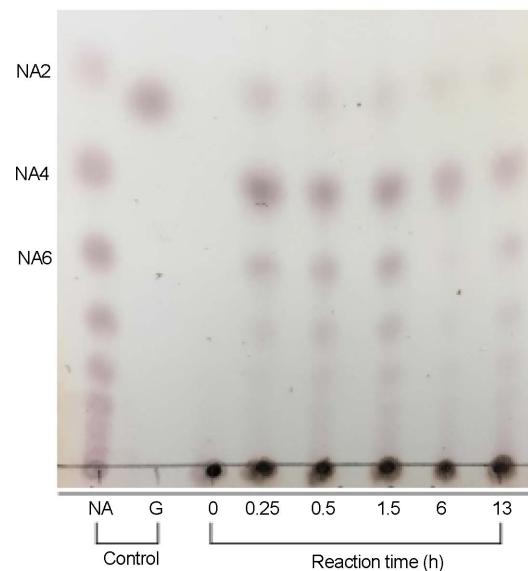


Fig. 6. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 50°C in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 0, 0.25, 0.5, 1.5, 6 and 13 h. The reaction mixtures were developed by TLC. (G, D-galactose; NA, neoagarooligosaccharides; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose).

었으며, 평균적으로 neoagrotetraose (52.2%) neoagrohexaose (34.8%), 및 neoagarobiose (13.0%) 순으로 생산되었다. 따라서, *Maribacter* sp. SH-1 균주의 한천분해효소는 일정한 비율로 neoagarooligosaccharides에 속하는 neoagarobiose, neoagarotetraose 및 neoagrohexaose를 생산하는 것으로 보아 본 효소가 β -agarase임을 알 수 있었다[18]. 본 연구의 결과들로 파악하면 *Maribacter* sp. SH-1 균주와 한천분해효소를 이용하여 보습 및 미백효과, 세균성장 억제, 전분노화 방지 및 대식세포 활성화 기능을 가진 소재의 개발과 이용이 가능할 것으로 판단된다[13, 15].

요 약

본 연구에서는 신규 해양성 한천분해균을 분리하고, 이 균주가 생성하는 한천분해효소의 특성을 조사하였다. 경상남도 남해군 미조면 연안에서 채취한 해수를 Marine agar 2216 배지에 도말하여 한천분해세균을 선별하였다. 선택된 한천분해균주는 16S rDNA 염기서열분석을 통해 *Maribacter* 속 세균과 99% 유사하여 *Maribacter* sp. SH-1으로 명명하였다. 세포외로 분비되는 agarase는 *Maribacter* sp. SH-1 균주 배양액에서 획득하였으며, 이를 이용하여 특성을 조사하였다. *Maribacter* sp. SH-1 균주의 한천분해효소는 20, 30, 40, 50 및 60°C에서 각각 56, 62, 94, 100, 8%의 상대활성을 나타냈으며, pH 5, 6, 7 및 8에서 각각 15, 100, 60, 21%의 상대활성을 나타냈다. 세포외 agarase는 50°C, pH 6 인 20 mM Tris-HCl buffer를 사용하는 조건에서 최대활성 (231 units/l)을 보였다. 한천이 sol 상태로 존재하는 50°C에서 최적활성을 보여 이 효소는 응용 가능성이 높다고 할 것이다. 효소 활성은 20, 30 및 40°C에서 30분 동안 열처리하였을 때 약 90% 이상의 상대활성을 보였다. TLC 분석 결과, *Maribacter* sp. SH-1 균주의 한천분해효소는 한천올리고당인 neoagrohexaose (34.8%), neoagarotetraose (52.2%) 및 neoagarobiose (13.0%)를 생성하는 것으로 보아 β -agarase로 확인되었다. 따라서 *Maribacter* sp. SH-1 균주와 이 균주가 생산하는 β -agarase는 보습효과, 미백효과, 세균성장 억제 혹은 전분노화 방지 등의 기능을 가지는 한천올리고당의 생산에 유용할 것으로 기대된다.

References

- Bannikova GE, Lopatin SA, Varlamov VP, Kuznetsov BB, Kozina IV, Miroshnichenko ML, et al. 2008. The thermophilic bacteria hydrolyzing agar: characterization of thermostable agarase. *J. Biol. Chem. Microbiol.* **44**: 366–369.
- Cha JA. 2009. Isolation and enzymatic properties of agarolytic bacteria. *M.S. Dissertation*. Chungnam National University, Dajeon, Korea.
- Cha JA, Kim YJ, Seo YB, Yoon MH. 2009. Isolation of an agarolytic bacteria, *Cellvibrio mixtus* SC-22 and the enzymatic properties. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**: 157–162.
- Chi WJ, Lim JH, Park DY, Kim MC, Kim CJ, Chang YK, et al. 2013. Isolation and characterization of a novel agar degrading bacterium, *Alteromonas macleodii* subsp. GNUM08120, from red macroalgae. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 8–16.
- Fu XT, Pan CH, Lin H, Kim SH. 2009. Gene cloning, expression, and characterization of a beta-agarase, agaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 257–264.
- Hong JH, Lee JJ, Choi HS, Hur SH, Kong JY. 2000. Antibacterial activity of agarooligosaccharides produced by β -agarase from *Bacillus cereus* ASK 202. *J. Fd. Hyg. Safety.* **15**: 277–281.
- Hou Y, Chen X, Chan Z, Zeng R. 2015. Expression and characterization of a thermostable and pH-stable β -agarase encoded by a new gene from *Flammeovirga pacifica* WPAGA1. *Process Biochem.* **50**: 1068–1075.
- Jang HJ, Lee DG, Lee SW, Jeon MJ, Chun WJ, Kwon KK, et al. 2011. Isolation of a marine-derived *Flammeovirga* sp. mbrc-1 strain and characterization of its agarase. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **26**: 552–556.
- Jang MK, Lee SW, Lee DG, Kim NY, Yu KH, Jang HJ, et al. 2010. Enhancement of the thermostability of a recombinant beta-agarase, AgaB, from *Zobellia galactanivorans* by random mutagenesis. *Biotechnol. Lett.* **32**: 943–949.
- Jung IS. 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.
- Kim DK, Jang YR, Kim KH, Lee MN, Kim AR, Jo EJ, et al. 2011. Isolation and culture properties of a thermophilic agarase-producing strain, *Microbulbifer* sp. SD-1. *Fish Aquat. Sci.* **14**: 186–191.
- Kim YJ. 2010. Properties of the agarase and its gene isolated from a marine bacterium, *Tamlana agarivorans*. *M.S. Dissertation*. Chungnam National University, Taejeon, Korea.
- Kim YN. 2011. Isolation and purification of new agarase from marine bacterium. *M.S. Dissertation*. Kyungsang National University, Jinju, Korea.
- Kim YN, Jeong YK, Kim MC, Kim SB, Chang YK, Chi WJ, et al. 2012. Isolation and identification of agarase-degrading bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. GNUM08122. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 1–9.
- Lee DG, Jang MK, Lee OH, Kim NY, Ju SA, Lee SH. 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.
- Lee DG, Kim NY, Jang MK, Lee OH, Lee SH. 2007. Isolation and characterization of a marine bacterium *Thalassomonas* sp. SL-5 producing β -agarase. *J. Life Sci.* **17**: 70–75.
- Lee DG, Lee OH, Jang JH, Jang MK, Yoo KH, Lee SH. 2008. Isolation and characterization of a marine derived bacterium *Glauciccola* sp. SL-12 producing β -agarase. *J. Life Sci.* **18**: 58–62.

18. Lee JH, Lee SY. 2014. Isolation and characterization of marine bacterial strain SH-1 producing agar-degrading enzymes. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 324–330.
19. Lee SW, Lee DG, Jang MK, Jeon MJ, Jang HJ, Lee SH. 2011. Improvement in the catalytic activity of β -agarase AgaA from *Zobellia galactanivorans* by site-directed mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 1116–1122.
20. Lu X, Chu T, Wu Q, Gu Y, Han F, Yu W. 2009. Cloning, expression and characterization of a new agarase-encoding gene from marine *Pseudoalteromonas* sp. *Biotechnol. Lett.* **31**: 1565–1570.
21. Song T, Cao Y, Wu H, Zhang W, Fei B, Qiao D, *et al.* 2014. Purification and characterization of a novel β -agarase of *Paenibacillus* sp. SSG-1 isolated from soil. *J. Biosc. Bioeng.* **118**: 125–129.
22. Suzuki H, Sawai Y, Suzuki T, Kawai K. 2003. Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosc. Bioeng.* **95**: 328–334.
23. Yang M, Mao X, Liu N, Qiu Y, Xue Y. 2014. Purification and characterization of two agarase from *Agarivorans albus* OAY02. *Process Biochem.* **49**: 905–912.