

Alteromonas sp. SH-1 균 유래의 α -agarase의 특성조사

이솔지¹, 신다영², 김재덕³, 이동근^{1,2}, 이상현^{1,2,3*}

Characterization of α -agarase from *Alteromonas* sp. SH-1

Sol-Ji Lee¹, Da-Young Shin², Jae-Deog Kim³, Dong-Geun Lee^{1,2}, and Sang-Hyeon Lee^{1,2,3*}

Received: 11 November 2015 / Revised: 7 April 2016 / Accepted: 13 June 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: A novel agar-degrading marine bacterium, SH-1 strain, was isolated from seashore of Namhae at Gyeongnam province, Korea. The SH-1 strain exhibited 98% similarity with *Alteromonas* species based on 16S rDNA sequencing and named as *Alteromonas* sp. SH-1. *Alteromonas* sp. SH-1 showed agarase activity of 348.3 U/L (1.67 U/mg protein). The molecular masses of the enzymes were predicted as about 85 kDa and 110 kDa by SDS-PAGE and zymogram. The enzymatic activity was optimal at 30°C and the relative agarase activity was decreased as temperature increase from 30°C and thus about 90% and 70% activities were shown at 40°C and 50°C, respectively. The optimum pH was 6.0 for agarase activity in 20 mM Tris-HCl buffer and activities were less than 70% and 85% activity at pH 5.0 and pH 7.0, respectively, compared with that at pH 6. Agarase activity has remained over 90% at 20°C after 1.5 hour exposure at this temperature. However, its activity was less than 60% at 30°C after 0.5 h exposure at this temperature. The enzymes produced agarooligosaccharides such as agaropentaose and agarotriose from agarose, indicating that the agarases are α -agarases. Thus, *Altero-*

monas sp. SH-1 and its agarases would be useful for the industrial production of agarooligosaccharides which are known as having anticancer and antioxidation activities.

Keywords: α -Agarase, agaropentaose, agarooligosaccharide, *Alteromonas* sp. SH-1, marine derived bacterium

1. INTRODUCTION

한천 (agar)은 galactose와 galactopyranose의 중합체로, 홍조류의 세포벽 구성성분인 점질성의 난소화성 복합다당류이다 [1,2]. 한천은 3,6-anhydro- α -L-galactopyranosyl-(1,3)-D-galactopyranose가 β -1,4 결합으로 연결된 heteropolymer 형태의 D, L-galactan인 agarose (70%)와 sulfate esters, pyruvate acetal과 methyl ethers 등에 의해 수식된 3,6-anhydro- α -L-galactose가 존재하는 agarpectin (30%)으로 구성되어 있다 [3-5]. 한천은 가공시켜 미생물 배양배지의 고형제로 사용되거나 순수한 agarose만을 분리정제하여 분자생물학적 연구에서 전기영동의 gel을 제조할 때에도 사용된다 [6,7]. 국내에서는 한천의 생산량이 수천 톤에 달하고 있어 풍부한 수산자원 중 하나이다. 하지만 대부분의 한천은 방치되고 있으며, 전체 생산량의 6.5% 정도만 단순가공 처리되어 값싼 원료로 사용된다.

현재까지 보고된 대부분의 한천분해효소는 30-45°C의 온도와 수소이온농도가 중성인 영역에서 높은 활성을 나타내며, α -agarase와 β -agarase의 2종류를 포함하고 있다 [7]. 한천 올리고당 (agarooligosaccharides)은 한천의 효소적 분해에 의해 생성되는 것으로 α -agarase는 agarooligosaccharides를 생산하고, β -agarase는 neoagarooligosaccharides를 생산한다고 알려져 있다. 한천올리고당은 미백, 보습, 항산화 및 항암 효

¹신라대학교 일반대학원 바이오과학과
¹Department of Bioscience, Graduate School, Silla University, Busan 617-736, Korea
Tel: +82-51-999-5624, Fax: +82-51-999-5628
e-mail:slee@silla.ac.kr

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

³신라대학교 일반대학원 그린화학융합공학과
³Department of Green-Chemistry Convergence Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

과 등 여러 가지 유용한 기능을 가지고 있다. 또한 탄소화성으로 비만, 변비, 당뇨병 치료 등에도 사용된다 [8,9].

따라서 한천분해효소를 생산하는 미생물과 한천분해효소에 대한 연구가 많이 진행되어 왔는데 *Saccharophagus degradans* 2-40 [10], *Acinetobacter* sp. AG LSL-1 [11], *Flammeovirga yayeyamensis* YT [12], *Streptomyces coelicolor* A3(2) [13], *Glaciecola* sp. SL-12 [14] 및 *Thalassomonas* sp. SL-5 [2] 등이 보고되어 있으며, 기존 한천분해효소의 인공적 진화 (artificial evolution)를 통한 효소활성의 개선 [15] 등이 보고되는 등 한천분해균주와 한천분해효소에 대한 많은 연구가 있다.

본 연구에서는 국내 연안의 해수로부터 한천 분해능이 뛰어난 해양미생물을 분리 및 동정하였고, 분리한 해양미생물이 생산하는 한천분해효소의 생화학적 특성을 조사하고 산업적 이용 가능성을 제시하고자 하였다.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. 한천분해균주의 분리 및 동정

경상남도 남해군 미조면 연안에서 채취한 해수의 해양미생물을 분리하기 위하여 증균용 배지로 사용되는 Marine agar 2216 (Difco, Detroit, USA) 배지에 도말하고, 30°C에서 배양하였다. 한천분해활성에 의해 Marine agar 2216 배지를 함몰시키는 SH-1 균주를 선별하였고 3차례 이상 순수분리하여 한천분해능을 확인하였다. 순수분리한 균주를 Marine broth 2216 배지 4 mL에 접종한 후 30°C, 250 rpm의 조건에서 하루 동안 배양한 뒤 원심분리 (3000×g, 4°C, 15 min)하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체는 Wizard Genomic DNA isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 genomic DNA를 획득하였고, 이를 PCR 반응의 주형으로 사용하여 16S rDNA 유전자 단편을 증폭하였다. PCR primer로는 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 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 균주들과의 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.

2.2. 분리 균주의 성장과 한천분해효소 활성 측정

0.2% agar가 첨가된 Marine broth 2216 배지 (pH 7.6) 50 mL에 균주를 접종하고 30°C, 250 rpm에서 6일간 배양하였다. 분리된 균주의 성장과 한천분해효소활성을 확인하기 위하여 12시간마다 일부 배양액을 채취하여 측정에 사용하였다. 성장양상은 600 nm의 파장에서 흡광도로 측정하였고 효소

활성은 아래의 '2.4. 효소활성측정'을 따랐다.

2.3. 조효소액의 제조

Marine broth 2216 배지 4 mL에 순수분리한 SH-1 균주를 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 1일간 배양하였다. 배양액은 0.2% agar가 첨가된 Marine broth 2216 배지 50 mL에 계대한 후 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 3.5일간 배양하였다. 배양 후 원심분리 (3000×g, 4°C, 15 min)하여 얻어진 상층액을 SnakeSkin Dialysis Tubing (Thermo Scientific, USA)에 넣은 후 900 mL의 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 이용하여 4°C에서 3회 투석을 수행하였다. 투석은 2시간마다 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 한번씩 교체하는 것을 2번 반복한 후 3회째에는 12시간 이상 시행하였다. 투석 후 제조된 조효소액은 membrane filter (0.45 μm, Millipore, USA)를 통과시킨 후 사용할 때까지 4°C에서 냉장보관하였다.

2.4. 효소활성 측정

한천분해효소의 활성은 DNS법을 이용하여 측정하였으며, DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변법으로 실시하였다 [16]. DNS 용액은 NaOH 13.2 g, 3,6-dinitrosalicylic acid 7.07 g, sodium sulfate 5.53 g, potassium tartrate (Rochelle salt) 204.00 g, phenol 5.07 g을 증류수 1 L에 녹여서 제조하였다. 1 mL의 조효소 반응액에 3 mL의 DNS 용액을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준적정곡선으로는 D-galactose를 사용하였고, 한천분해 효소의 활성은 1분당 1 μmol의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1 unit (U)으로 정의하였다. 조효소액에 함유되어 있는 총 단백질의 양은 Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 실시하였다.

2.5. 한천분해 효소의 최적 온도 측정

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해활성을 비교하였다. 표준기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 증탕가열한 후 온도별 (20~70°C)로 냉각하였다. 처리된 기질용액 1.0 mL에 조효소액 0.5 mL를 첨가하여 20~70°C의 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 한천분해효소의 활성을 측정하였다.

2.6. 한천분해효소의 최적 pH 측정

pH에 따른 한천분해효소의 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. 최종농도 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 세가지 완충용액을 증탕가열한 후 30°C까지 냉각하고 반응수조의 온도를 유지하면서 완충용액 1.0 mL에 조효소액 0.5 mL를 첨가하여 30분간 반응시킨

후 한천분해효소의 활성을 측정하였다.

2.7. 한천분해효소의 열안정성 측정

한천분해효소의 열안정성을 측정하기 위하여 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 조효소액 0.5 mL를 첨가하여 각 온도 (20~70°C)에서 각각 0.5, 1, 1.5, 2시간동안 열처리한 후, 기질용액 1 mL를 첨가하여 30분간 30°C에서 반응시켰다. 측정된 한천분해효소의 열안정성은 열처리하지 않은 한천분해효소의 활성과 비교하였다.

2.8. 한천분해효소의 Zymogram

한천분해효소를 확인하기 위하여 SDS를 첨가하지 않은 10%의 polyacrylamide 겔에 0.1% (w/v)의 agarose (LMP, Promega, USA)를 첨가하여 전기영동을 수행하였다 [17]. 전기영동은 조효소액 10 μ L에 SDS가 첨가되지 않은 sample 완충용액 5 μ L를 첨가하여 0.1% (w/v) SDS를 함유한 running 완충용액에서 실시하였다. 전기영동이 완료된 후 겔을 반으로 나누어 단백질 밴드 부분을 GelCode Blue Stain Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 가시화하였으며, zymogram 분석을 위한 겔은 0.1% (v/v) Triton X-100 (USB, USA) 및 증류수로 1시간씩 세척하여 SDS를 제거한 후 4°C에서 24시간 반응시켰고 루골용액 (Lugol's solution)을 이용하여 한천이 분해된 위치를 확인하였다.

2.9. 한천가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

조효소액을 이용하여 agarose의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 조효소액과 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 30°C에서 0, 0.25, 0.5, 1, 6, 24시간 반응시킨 후, Silica Gel 60 TLC Plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 행하였다. 전개용매로 n-Butanol/acetic acid/H₂O (2/1/1 (v/v/v))를 사용하였

고, 10% (v/v) H₂SO₄로 가시화시켰다. 표준물질로는 neoagarooligosaccharides [9]를 사용하였다. 한천분해효소에 의해 생산되는 가수분해산물의 농도는 Image J 1.44o (Wayne Rasband, Bethesda, USA) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 한천분해균주의 분리 및 동정

Marine agar 2216 배지에서 높은 활성을 보이는 것으로 분리된 한천분해균 SH-1 균주의 16S rDNA 염기서열 분석결과 1,465 bp의 염기서열을 얻었고, NCBI의 BLAST 탐색으로 *Alteromonas* sp. Ant82 및 *Alteromonas* sp. YD72의 16S rDNA와 98%의 높은 상동성을 나타냈으므로, 분리균주를 *Alteromonas* 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. 한천분해활성을 보이는 *Alteromonas* 속 균주에 대한 보고는 칠레 [18], 중국 [19] 등에서 보고되고 있다.

3.2. 균주의 성장과 한천분해효소의 활성 측정

균주의 성장에 따른 한천분해효소 전체의 활성을 Fig. 2(a)에 나타냈다. 접종 후 흡광도가 증가하여 3.5일까지 대수기로 확인되었으며, 이후 점점 감소되는 성장곡선을 나타냈다. 또한, 배양액 1 L당 한천분해효소의 활성은 30°C에서 3.5일 동안 배양했을 때 348.3 U/L로 최고치를 나타내었다. 조효소액을 BCA Kit (Thermo Scientific, USA)를 이용하여 단백질을 정량한 결과 208 mg/L로 단백질 1 mg 당 한천분해효소의 활성은 1.67 U/mg로 나타났다. 따라서 이후 연구에서는 최고 활성 (348.3 U/L, 1.67 U/mg)을 보이는 3.5일까지 배양한 배양액을 이용하여 효소활성을 측정하였다.

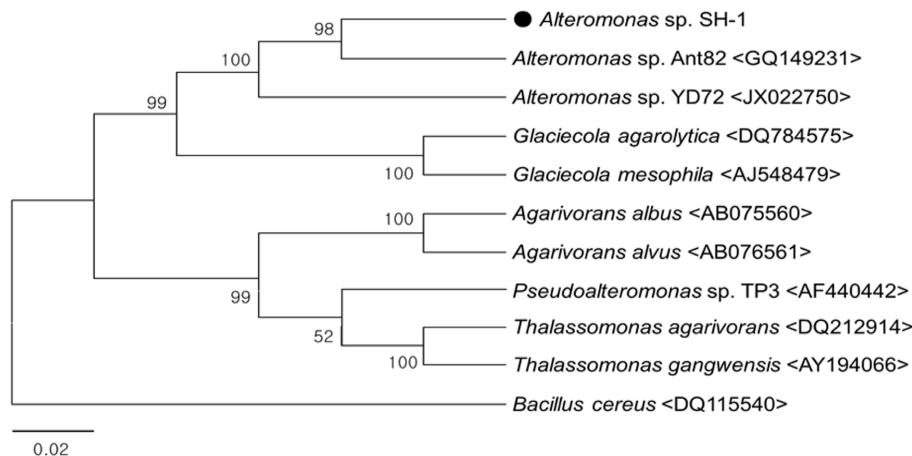


Fig. 1. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing isolated *Alteromonas* sp. SH-1 strain with other bacteria. The numbers at the branch node are percentages of bootstrap values (n=1,000) and numbers in parenthesis are numbers in GenBank.

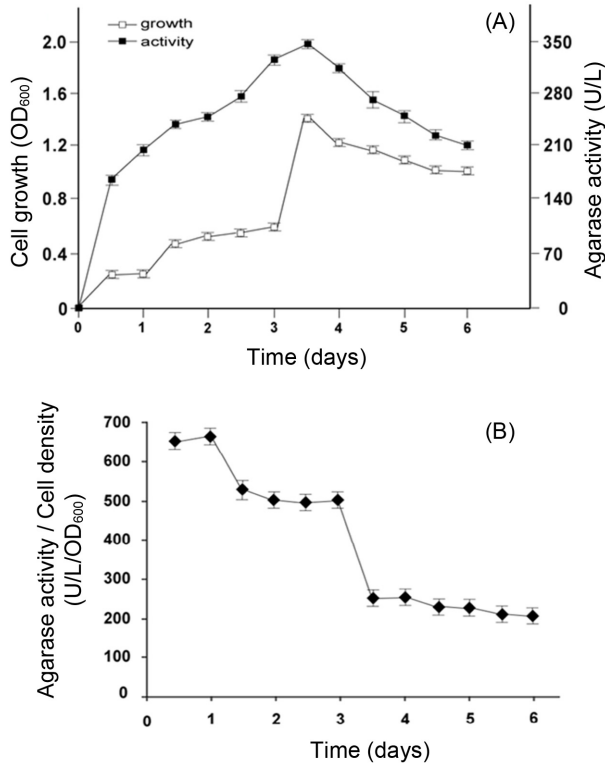


Fig. 2. (A) Cell growth and total agarase activity of *Alteromonas* sp. SH-1 (total agarase activity [units/L], cell growth [OD₆₀₀]). (B) Agarase activity per cell density [units/L/OD₆₀₀].

그리고 세포당 효소활성을 확인하기 위하여 한천분해효소 전체의 활성을 생장곡선의 흡광도로 나누어 Fig. 2(b)에 나타냈다. 그 결과 1일에서 가장 크게 나타났으며 시간이 지남에 따라 점차 감소하였다.

3.3. 한천분해효소의 최적 온도 측정

각 온도에서의 한천분해효소의 상대활성을 Fig. 3에 나타냈다. 가장 높은 활성을 나타낸 30°C의 반응온도에서 나타난 효소활성을 100%로 하였을 때, 상대활성이 40°C에서는 약 90%, 20과 50°C에서는 약 70%를 나타내었고, 나머지 온도에서도 60% 이상의 상대활성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 본 연구와 동일한 *Alteromonas* 속 세균의 한천분해효소의 최적활성에 필요한 온도는 35°C [19]와 40°C [16] 등이 보고되어 있는데 본 연구는 30°C에서 최적활성을 보여 차이를 보였다. *Alteromonas* 속 세균이 아닌 균주에 따른 온도별 최적활성은 *Saccharophagus degradans* 2-40 [10]이 30°C로 본 연구에서 분리한 *Alteromonas* sp. SH-1 균주와 동일하였고, *Acinetobacter* sp. AG LSL-1 [11], *Flammeovirga yayeyamensis* YT [12]와 *Streptomyces coelicolor* A3(2) [13]는 40°C로 본 연구에서 분리한 *Alteromonas* sp. SH-1 균주 유래의 한천분해효소보다 높은 온도에서 최적활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한, 배양액 1 L당 한천분해효소의 활성을 보면 본 연구의

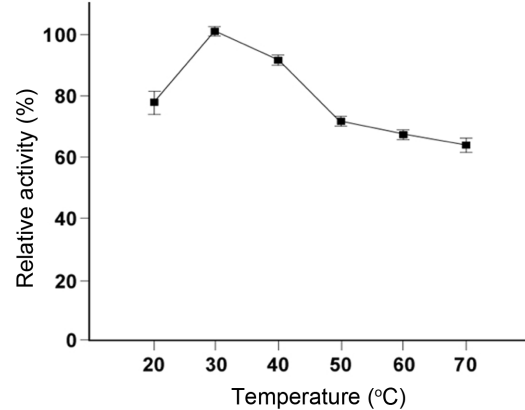


Fig. 3. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reactions were carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C in 1.0 mL of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 mL of enzyme solution for 30 min.

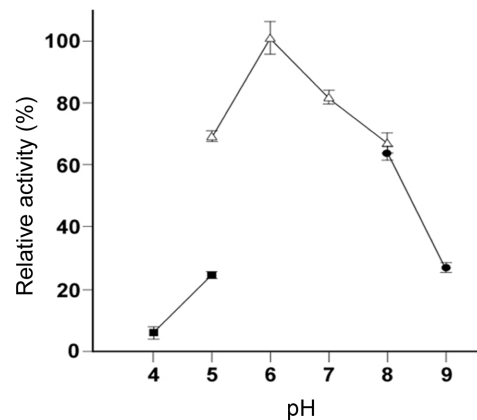


Fig. 4. Effect of pH on agarase activity. The reactions were carried out at 30°C in 1.0 mL of corresponding buffer (■, 20 mM sodium acetate, pH 4.0-5.0; △, 20 mM Tris-HCl, pH 5.0-8.0; ◆, 20 mM GTA, pH 8.0-9.0) containing 0.2% agar and 0.5 mL of enzyme solution for 30 min.

Alteromonas sp. SH-1는 348.3 U/L로 최고치를 나타내어 *Glaciicola* sp. SL-12 [14]의 233 U/L보다는 1.5배 정도 높았으며 *Thalassomonas* sp. SL-5 [2]의 363 U/L와 유사한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

3.4. 한천분해효소의 최적 pH 측정

한천분해효소가 각 pH에서 보이는 상대활성을 Fig. 4에 나타냈다. 사용한 완충용액과 pH 중에서 최고의 한천분해 활성을 나타내는 것은 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 pH 6.0으로 나타났다. 가장 높은 활성을 나타낸 pH 6.0에서 나타난 효소활성을 100%로 하였을 때 한천분해 상대활성이 pH 7.0에서 80% 이상이고 pH 5.0와 8.0에서 60% 이상 유지되었으므로,

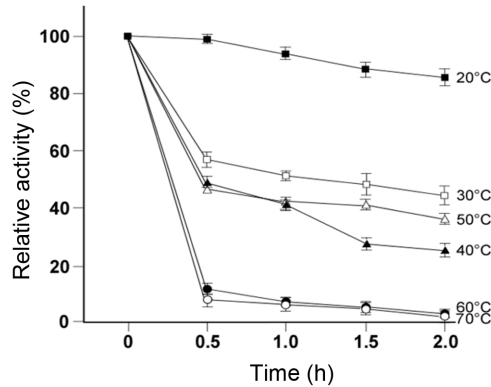


Fig. 5. Heat stability of agarase activity. The enzyme solutions were pre-incubated at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 h. The reactions were then carried out at 30°C in 1.0 mL of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 mL of heat-treated enzyme solution for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

약산성과 약염기성 사이의 비교적 넓은 범위에서 높은 활성을 보였다. 본 연구와 동일한 *Alteromonas* 속 세균의 한천분해효소의 최적활성에 필요한 pH는 7.0 [16,19] 그리고 6.5 [18]가 보고되었다. 최적온도와 최적 pH에서 차이를 보여 *Alteromonas* 속 세균이 다양한 한천분해효소를 생산할 가능성을 내포하는 것으로 판단되었다. *Alteromonas* 속 이외의 균주가 생산하는 한천분해효소의 활성에 있어서의 최적 pH가 6.0인 경우는 *Acinetobacter* sp. AG LSL-1 [11], pH 7.0인 경우는 *Saccharophagus degradans* 2-40 [10]와 *Streptomyces coelicolor* A3(2) [13]이고, *Flammeovirga yayeyamensis* YT [12]는 pH 8.0에서 최적활성이 보고되었다.

3.5. 한천분해효소의 열안정성 측정

Alteromonas sp. SH-1이 생산하는 한천분해효소의 열안정성을 Fig. 5에 나타냈다. 40 및 50°C에서는 1시간의 열처리를 행하였을 때 약 40%의 상대활성을 유지하는 것으로 보였지만, 60°C 이상의 온도에서는 0.5시간의 열처리를 하였을 때 활성을 거의 잃어버리는 것으로 나타났다. 따라서 *Alteromonas* sp. SH-1이 생산하는 한천분해효소는 약한 내열성을 가지고 있는 것으로 판단할 수 있었다.

3.6. 한천분해효소의 Zymogram

Alteromonas sp. SH-1 유래의 단백질 밴드와 한천분해효소를 생산하는 단백질을 Fig. 6에 나타냈다. *Alteromonas* sp. SH-1은 약 85 kDa 및 110 kDa의 분자량을 나타내는 2개의 한천분해효소를 생산하는 것으로 확인되었다. 본 연구와 유사한 크기의 agarase를 보고한 사례들이 있으며 [20,21], 85 kDa 이상의 크기를 가지는 agarase는 α -agarase가 있다 [22].

3.7. 한천가수분해산물의 TLC 분석

Alteromonas sp. SH-1 균주를 3.5일간 배양하여 제조된 조효

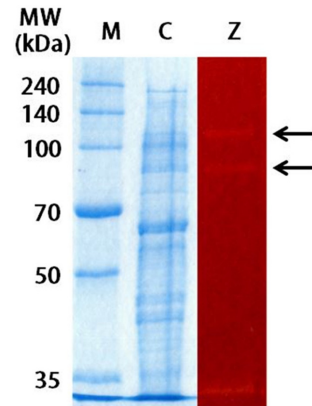


Fig. 6. SDS-PAGE and zymogram analysis of agarase. The molecular masses of the enzymes were 85 kDa and 110 kDa. (protein mass marker; lane M, cell free extract of agarase; lane C, zymogram analysis of agarase; lane Z).

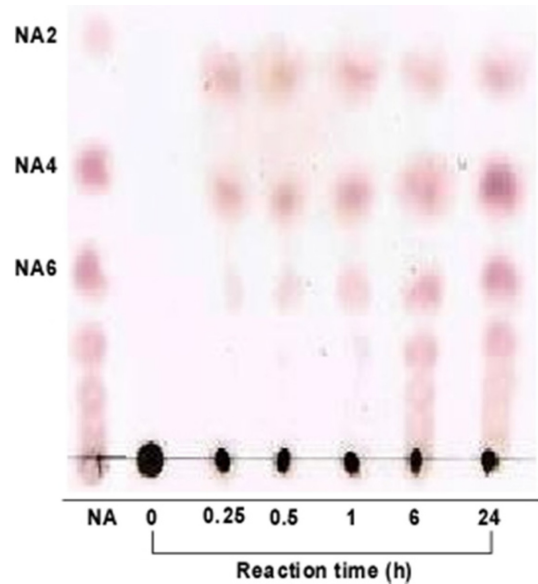


Fig. 7. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 30°C in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 mL of enzyme solution for 0, 0.25, 0.5, 1, 6 and 24 h. The reaction mixtures were developed by TLC. (NA, neoagarooligosaccharides;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

소액에 agarose를 기질로 첨가하여 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 7에 나타냈다. 현재 한천분해효소는 α -agarase와 β -agarase 두 가지만 존재한다고 알려져 있어 β -agarase의 산물인 neoagarooligosaccharides를 통해 한천분해효소의 산물을 추정하고 한천분해효소가 α -와 β -agarase 중 어디에 속하는지 파악하였다 [20]. *Alteromonas* sp. SH-1 균주가 생산하는 한천분해효소의 분해산물을 TLC로 분석한 결과

를 보면, agaropentaose 및 agarotriose 그리고 agarheptaose로 추정되는 agarooligosaccharides를 생산하는 것으로 보아 이 균주가 생산하는 효소들은 α -agarase로 확인되었다 [20].

각각의 반응시간에서 나타난 반응산물의 함을 100%로 하여 TLC로 분석한 결과, 0.25시간부터 24시간까지 분해산물인 agarheptaose : agaropentaose : agarotriose의 농도는 비슷하게 유지되었으며, 평균적으로 각각 21.2%, 50% 및 28.8%로 생산되는 것을 확인하였다. Agarose를 기질로 사용할 경우 β -agarase는 neoagarhexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose를 생성하고, α -agarase는 agaropentose 및 agarotriose를 생성한다 [1].

현재까지의 보고에 따르면 *Alteromonas* 속의 한천분해균주는 종에 따라 α -agarase [6] 또는 β -agarase [4,17,23]를 생산한다고 알려져 있으나 α -agarase를 생산하는 *Alteromonas* 속 균주는 *Alteromonas agarlyticus* strain GJ1B [6]와 *Alteromonas* sp. GNUM-1 [17] 등만 보고되어 있다. *Alteromonas* 속 세균이 생산하는 α -agarase의 분자량은 GJ1B 균주가 180 kDa [6], GNUM-1 균주가 30 kDa [17]으로 보고되고 있고 다른 보고는 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서 보고하는 약 85 kDa 및 110 kDa의 분자량을 나타내는 (Fig. 6) 2개의 α -agarase는 신규성이 높다고 할 것이다.

본 연구에서 획득한 *Alteromonas* sp. SH-1 균주와 α -agarase 들은 다른 한천분해효소처럼 배양조건 최적화 및 해당 유전자의 cloning을 통한 과다발현으로 기능성 한천 올리고당의 산업적 생산에 이용이 가능할 것으로 기대된다.

4. CONCLUSION

경상남도 남해군 미조면 연안으로부터 채취한 해수를 이용하여 한천분해활성을 보이는 해양성 세균을 분리하였다. 선택된 한천분해균주는 16S rDNA 염기서열분석을 통해 *Alteromonas*의 16S rDNA와 약 98% 유사한 것으로 확인되었으며, *Alteromonas* sp. SH-1으로 명명하였다. *Alteromonas* sp. SH-1 균주가 생성하는 한천분해효소는 30°C와 pH 6.0에서 최대활성을 나타내었으며, 한천분해 강도는 348.3 U/L (1.67 U/mg protein)로 나타났다. 한천분해효소는 SDS-PAGE 및 zymogram을 통해 분자량이 85 kDa 및 110 kDa임을 확인하였다. 또한 30°C에서 1.5시간 동안 열처리하였을 때 약 50% 이상의 상대활성을 보였으며, 40°C와 50°C에서도 1시간 동안 열처리하였을 때 약 40% 이상의 상대활성을 보였으므로 약한 내열성을 가지는 것으로 사료된다. TLC 분석 결과, *Alteromonas* sp. SH-1 균주가 생성하는 한천분해효소는 agarose를 분해하여 항산화 및 항암효과를 가지는 기능성 한천올리고당인 agaropentaose와 agarotriose를 생성하는 것으로 보아 α -agarase로 확인되었다. 따라서 *Alteromonas* sp. SH-1 균주와 이 균주가 생산하는 α -agarase는 산업적으로 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Jang, H. J., D. G. Lee, S. W. Lee, M. J. Jeon, W. J. Chun, K. K. Kwon, H. S. Lee, and S. H. Lee (2011) Isolation of a marine-derived *Flammeovirga* sp. mbrc-1 strain and characterization of its agarase. *KSBB J.* 26: 552-556.
- Lee, D. G., N. Y. Kim, M. K. Jang, O. H. Lee, and S. H. Lee (2007) Isolation and characterization of a marine bacterium *Thalassomonas* sp. SL-5 producing β -agarase. *J. Life Sci.* 17: 70-75.
- Hong, J. H., J. J. Lee, S. H. Hur, H. S. Choi, and J. Y. Kong (2001) Effect of agarooligosaccharides on the growth of intestinal bacteria. *J. Fd. Hyg. Safety* 16: 11-15.
- Seo, Y. B., Y. Lu, W. J. Chi, H. R. Pack, K. J. Jeong, S. K. Hong, and Y. K. Chang (2014) Heterologous expression of a newly screened β -agarase from *Alteromonas* sp. GNUM1 in *Escherichia coli* and its application for agarose degradation. *Process Biochem.* 49: 430-436.
- Yang, M., X. Mao, N. Liu, Y. Qiu, and C. Xue (2014) Purification and characterization of two agarases from *Agarivorans albus* OAY 02. *Process Biochem.* 49: 905-912.
- Hassairi, I., R. Ben Amar, M. Nonus, and B. B. Gupta (2001) Production and separation of α -agarase from *Alteromonas agarlyticus* strain GJ1B. *Biores. Technol.* 79: 47-51.
- Kim, Y. J. (2010) *Properties of the agarase and its gene isolated from a marine bacterium, Tamiana agarivorans*. M.S. dissertation, University of Chungnam, Taejeon, Korea.
- Kim, Y. N. (2011) *Isolation and purification of new agarase from marine bacterium*. M.S. dissertation, University of Kyungang, Jinju, Korea.
- Lee, D. G., M. K. Jang, O. H. Lee, N. Y. Kim, S. A. Ju, and S. H. Lee (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.
- Kim, H. T., S. Lee, D. Lee, H. S. Kim, W. G. Bang, K. H. Kim, and I. G. Choi (2010) Overexpression and molecular characterization of Aga50D from *Saccharophagus degradans* 2-40: An exo-type β -agarase producing neoagarobiose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86: 227-234.
- Lakshmikanth, M., S. Manohar, Y. Souche, and J. Lalitha (2009) Extracellular β -agarase LSL-1 producing neoagarobiose from a newly isolated agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. *Process Biochem.* 44: 999-1003.
- Yang, J. I., L. C. Chen, Y. Y. Shih, C. Hsieh, C. Y. Chen, W. M. Chen, and C. C. Chen (2011) Cloning and characterization of β -agarase AgaYT from *Flammeovirga yaeyamensis* strain YT. *J. Biosci. Bioeng.* 112: 225-232.
- Temujin, U., W. J. Chi, Y. K. Chang, and S. K. Hong (2012) Identification and biochemical characterization of Sco3487 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), an exo- and endo-type β -agarase-producing neoagarobiose. *J. Bacteriol.* 194: 142-149.
- Lee, D. G., O. H. Lee, H. J. Jang, M. K. Jang, K. H. Yoo, and S. H. Lee (2008) Isolation and characterization of a marine derived bacterium *Glaciecola* sp. SL-12 producing β -agarase. *J. Life Sci.* 18: 58-62.

15. Jang, M. K., S. W. Lee, D. G. Lee, N. Y. Kim, K. H. Yu, H. J. Jang, S. Kim, A. Kim, and S. H. Lee (2010) Enhancement of the thermostability of a recombinant β -agarase, AgaB, from *Zobellia galactanivorans* by random mutagenesis. *Biotechnol. Lett.* 32: 943-949.
16. Chi, W. J., J. H. Lim, D. Y. Park, M. C. Kim, C. J. Kim, Y. K. Chang, and S. K. Hong (2013) Isolation and characterization of a novel agar degrading bacterium *Alteromonas macleodii* subsp. Gnum08120, from red macroalgae. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 41: 8-16.
17. Kim, J. H., and S. K. Hong (2012) Isolation and characterization of an agarase-producing bacterial strain, *Alteromonas* sp. GNUM-1, from the west Sea, Korea. *J. Microbiol. Biotech.* 22: 1621-1628.
18. Leon, O., L. Quintana, G. Peruzzo and J. C. Slebe (1992) Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1. *Microbiol.* 58: 4060-4063.
19. Wang, J., H. Mou, X. Jiang, and H. Guan (2006) Characterization of a novel β -agarase from marine *Alteromonas* sp. SY37-12 and its degrading products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 833-839.
20. Ohta, Y., Y. Hatada, M. Miyazaki, Y. Nogi, S. Ito, and K. Horikoshi (2005) Purification and characterization of a novel from a *Thalassomonas* sp. *Curr. Microbiol.* 50: 212-216.
21. Fu, X. T. and S. M. Kim (2010) Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar. Drugs* 8: 200-218.
22. Kim, J. H., Y. H. Kim., S. K. Kim, B. W. Kim, and S. W. Nam (2011) Properties and Industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39: 189-199.
23. Kohtaro, K., M. Masuda, Y. Iwasaki, H. Nakagawa, R. Kobayashi, and S. Usami (1999) Purification and characterization of a novel β -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1. *J. Biosci. Bioengi.* 87: 436-441.