

한천분해 미생물 *Vibrio* sp. GNUM08123의 동정 및 agarase 생산의 발효적 특성

지원재¹, 김윤희², 김종희³, 홍순광^{2*}

¹국립생물자원관 유용자원분석과

²명지대학교 생명과학정보학부

³서일대학교 식품영양과

Received: July 24, 2017 / Revised: August 24, 2017 / Accepted: August 24, 2017

Identification and Characterization of Agar-degrading *Vibrio* sp. GNUM08123 Isolated from Marine Red Macroalgae

Won-Jae Chi¹, Yoon Hee Kim², Jong-Hee Kim³, and Soon-Kwang Hong^{2*}

¹Biological and Genetic Resource Assessment Division, National Institute of Biological Resource, Incheon 22689, Republic of Korea

²Department of Biological Science, Myongji University, Yongin 17058, Republic of Korea

³Department of Food and Nutrition, Seoil University, Seoul 02192, Republic of Korea

An agar-degrading bacterium, designated as the GNUM08123 strain, was isolated from samples of red algae collected from the Yongil Bay near East Sea, Korea. The isolated GNUM08123 strain was gram-negative, aerobic, motile, and beige-pigmented, with C_{16:0} (25.9%) and summed feature 3 (comprising C_{16:1}ω7c/iso-C_{15:0}2-OH, 34.4%) as its major cellular fatty acids. A similarity search based on the 16S rRNA gene sequence revealed that it belonged to class Gammaproteobacteria and shared 97.7% similarity with the type strain *Vibrio chagasii* R-3712^T. The DNA G+C content of strain GNUM08123^T was 46.9 mol%. The major isoprenoid quinone was ubiquinone-8. The results of DNA-DNA relatedness and 16S rRNA sequence similarity analyses, in addition to its phenotypic and chemotaxonomic characteristics, suggest that strain GNUM08123 is a novel species within genus *Vibrio*, designated as *Vibrio* sp. GNUM08123. Agarase production by strain GNUM08123 was induced by agar and sucrose, but was repressed probably owing to carbon catabolite repression by glucose and maltose.

Keywords: Agarase, *Vibrio* sp. GNUM08123, DSM25249, KCTC23757

서론

Vibrio 속은 지표수에 가장 흔하게 존재하는 미생물 중 하나이며 다양한 생태계에서 활동하고 있다. 잘 알려진 바와 같이 *Vibrio fischeri* 등은 생체발광(bioluminescence)을 하며 해파리나 오징어 등과 유익한 공생관계를 유지하기도 하지만, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* 등은 사람을 포함한 숙주에 심각한 질병을 일으키기도 한다. 또한 *Vibrio* 속 미생물은 다양한 환경에 적응

하여 주위에 존재하는 셀룰로오스, 한천 등과 같은 난분해성 고분자물질을 분해하여 이용할 수 있는 능력을 갖고 있다.

*Vibrio agarivorans*는 홍조류를 분해 할 수 있는 미생물로 보고된 최초의 *Vibrio* 속 해양미생물이다[1]. 한천(agar)은 홍조류 세포벽의 주요한 구성 성분으로서 3-O-linked β-D-galactopyranose (G)와 4-O-linked α-L-galactopyranose (L)의 heteropolymer이다. 이 중, L이 α-L-galactopyranose-6-sulfate (L6S) 단위체로 구성되어 있는 형태를 포피란(porphyrin)이라고 하며 주로 김과 같은 해조류에 분포한다[2-4]. 일반적으로 알고 있는 한천의 주요 성분은 아가로오스(agarose)로 불리며, 이는 L이 무수갈락토오스인 3,6-anhydro-α-L-galactopyranose (LA)로 치환된 헤테로폴리머이며, 주로 우뚝가사리, 꼬시래기 등 해조류의 주요성분이다. 결과적으로, 아가로오스는 agarobiose (G-LA) 단위체가 반복되는 구조이

*Corresponding author

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

E-mail: skhong@mju.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

며, 포피란은 porphyriose (G-L6S) 단위체의 반복 구조이다 [3, 4]. 그러나, 한천은 한가지의 단위체만으로 구성된 것이 아니고 agarobiose와 porphyriose의 혼성 구조물이며 그 비율은 홍조류에 따라 매우 다르게 분포하고, 때로는 단위체의 L6S가 sulfoxyl, methoxyl, pyruvate 등의 잔기로 수식되기도 한다[3].

한천은 오랫동안 식품첨가물[5], 화장품 보습제[6], 미생물 배양용 고체배지의 겔화용 제제 등으로 사용되어 왔으며, 최근 제3세대 바이오메스로도 주목을 받고 있다. 또한 한천을 분해하여 제조한 한천올리고당은 항산화 효과, 항염증 효과, 항암 효과, 항비만 및 항당뇨 효과 등이 있는 것으로 보고되어 한천의 산업적 이용이 가속화 되고 있다[7-10]. 한천 바이오매스의 산업적 이용을 위해서는 한천을 효율적으로 분해하여 저분자화 할 수 있는 기술이 필수적이며, 이를 위해서는 탁월한 한천분해 능력을 갖고 있는 미생물의 탐색이 중요하다. 본 논문에서는, 아가레이즈(agarase) 활성을 갖고 한천을 유일 탄소원으로 이용하여 생장이 가능한 *Vibrio* 속에 속하는 신균주(GNUM08123)의 동정 및 이 균주가 생산하는 아가레이즈 생산 특성에 관하여 기술하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 확보

홍조류 *Callophyllis crispate* 표본을 대한민국 동해 영일만 근처에서 채취하였다. 채취한 샘플은 원심분리용 튜브(50 ml)에 넣어 멸균수로 씻은 후, 멸균 한 2.0% NaCl (w/v) 용액 10 ml를 첨가하였다. 튜브를 충분히 vortex로 섞은 후, 1,200 ×g에서 30초 동안 원심분리하였다. 상등액만을 취하여 멸균수에 10⁻¹-10⁻⁵으로 희석한 후, 200 µl를 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; per liter; pH 7.2)에 도말하였다. 도말한 평판고체배지는 28°C에서 1일간 배양한 후, Lugol's Iodine 용액(0.05 M Iodine in 0.12 M KI)으로 염색하여 colony 주변에 아가분해활성을 나타내 투명하게 보이는 colony 만을 선별하였다. 이 중 최종적으로 활성이 우수한 균주 GNUM08123을 선택하여 본 연구에 사용하였다. 비교에 사용한 대조 균주 *Vibrio chagasii* R-3712^T와 *Vibrio fortis* LMG21557^T는 The Leibniz Institute DSMZ (German)에서 구입하였다.

균주의 형태적·생리적 특성 분석

형태적 분석을 위해 GNUM08123 균주를 ASW-YP 평판고체배지에 도말하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 세포 형태, 크기 및 운동성은 위상차 현미경(BX51 microscope,

Olympus, USA)으로 관찰하였다. 그램 염색은 gram stain kit (BD Diagnostics, USA)를 사용하여 제조자의 사용 지침에 따라 실시하였다. Flagella는 세포를 1% (w/v) phosphotungstic acid로 염색(negative staining)한 후 투과전자현미경(JEM1010, JEOL, Japan)으로 분석하였다.

균주의 생리적 특성 분석에는 ASW-YP 액체배지를 사용하였다. GNUM08123 균주 생장에 미치는 배양온도의 영향은 배양온도 4°C, 15°C, 25°C, 37°C, 40°C, 45°C에서 분석하였고, 배지 pH의 영향은 pH 4에서 pH 11까지 pH 1의 간격으로 분석하였으며, NaCl 요구도는 0-20% NaCl (w/v) 범위에서 조사하였다.

GNUM08123 균주의 탄소 이용, 효소 생산능력 등의 생리화학적 분석은 API 20NE, 50CH, API ZYM strip (bioMérieux, France)을 사용하여 분석하였으며, 제조자의 실험지침에 따라 분석을 수행하였다. 단 미생물 현탁액은 2% NaCl (w/v) 용액을 사용하여 제조하였다.

GNUM08123의 항생제에 대한 감수성 시험은 GNUM08123 균주를 도말한 ASW-YP 평판고체배지위에서 paper discs assay 방법으로 수행하였다. 이때 사용한 항생제는 thioestrepton (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml), neomycin (30 µg/ml), ampicillin (50 µg/ml), apramycin (50 µg/ml), nalidixic acid (25 µg/ml), chloramphenicol (25 µg/ml) 등이다. 30 µl의 각 항생제를 포함한 항생제 감수성 시험용 종이디스크를 도말한 플레이트에 올려 놓고, 28°C에서 24시간 배양한 후 종이디스크 주위에 생기는 투명한 환을 관찰하여 항생제에 대한 성장저해 감수성 여부를 판정하였다.

16S rRNA 유전자 서열 해석 및 계통수 제작

GNUM08123 균주를 ASW-YP 액체배지에 접종하여 28°C에서 48시간 진탕배양하였다. 이로부터 회수한 균체로부터 유전체 DNA를 Genomic DNA extraction kit (Promega Co., USA)를 사용하여 추출하였다. 유전체 DNA를 주형 DNA로 사용하여 16S rRNA 유전자를 PCR 방법으로 증폭하였으며, 프라이머는 bacterial universal primers (27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R; 5'-TACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다[11]. 증폭한 DNA 단편을 pGEM-T easy 벡터(Promega Co.)에 클로닝하고, Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)로 염기서열을 분석하였다. 계통수(phylogenetic tree) 제작을 위해 필요한 GNUM08123과 유사한 type 균주들의 16S rRNA 유전자 정보는 EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org>)로부터 확보하였다[12]. 확보된 염기서열들 간의 Multiple alignment는 ClustalW program [13]을 사용하였고, 5'과 3'-말단의 gap은 BioEdit program [14]으로 편집하였다. 염기서열 사이의 진화적 거리

(evolutionary distance matrix)는 Kimura's two-parameter evolutionary model [15]에 의해 계산하였고, 계통수는 MEGA6 프로그램[16]의 Neighbor-joining (NJ) 알고리즘을 이용하여 제작 하였다. 신뢰도(bootstrap value)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 계산하였다.

균주의 화학적 분류 특성

GNUM08123 균주를 ASW-YP 평판고체배지에 도말 한 후 28°C에서 48시간 배양하여 사용하였다. 주요 respiratory quinones은 역상 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 사용하여 분석하였다[17]. 균체의 지방산은 에틸 에스터화[18]시킨 fatty acid methyl esters (FAME) 혼합물을 Microbial Identification system (MIDI)의 지침에 따라 가스크로마토그래피(GC) 분석법으로 분석하였다[19]. 유전체 DNA의 G+C 농도는 역상-HPLC를 이용하였다[20].

DNA-DNA hybridization

GNUM08123 균주의 16S rRNA 유전자 서열에 근거하여 이와 유전학적으로 가장 유사할 것으로 판단되는 *V. chagasii* R-3712^T 표준 균주를 양성대조균으로 선정하였다. 두 균주를 Marine Agar 2216 (Becton, Dickinson and Company, USA) 평판고체배지에 배양하고, 각 균체로부터 Genomic DNA Extraction Kit (Promega Co.)를 이용하여 유전체 DNA를 준비하였다. 음성 대조균은 *Staphylococcus aureus* KCCM41331를 사용하였으며, Nutrient Agar (NA) 평판고체배지에 배양하여 동일한 방법으로 유전체 DNA를 준비하였다. Probe DNA의 준비 및 hybridization 반응은 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Germany)를 이용하였고, 실험은 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 실험 결과 얻은 hybridization 시그널은 Quantity One 프로그램 (Bio-rad, USA)을 사용하여 정량 하였고, GNUM08123 균주 사이의 hybridization 시그널을 100%로 간주하여 계산하였다.

아가레이즈 활성 측정

모든 실험은 특별한 언급이 없는 한 4°C에서 실시하였다. 아가레이즈 활성은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여[21], 아가레이즈 활성에 의해 증가하는 환원당의 양을 측정하였다. 효소액 샘플 100 µl를 0.2% 아가로오스를 녹인 3.9 ml 반응완충액(20 mM Tris-Cl, pH 8.0)과 혼합 후 40°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 4 ml의 DNS 용액(중류수에 NaOH 25 g, DNS 6.5 g, Glycerol 45 ml를 녹여 최종 1 L 제조)을 넣고 100°C에서 5분간 가열하였고, 상온에서 충분히 식힌 후 분광광도계(Genesys 8, Spectronic Unicam Inc, France)로 아가레이즈에 의해 방출된 환원당의 양을

540 nm에서 측정하였다. 배양액 자체도 540 nm에서 흡광도(OD; optical density)를 나타냄으로, 반응 후 흡광도(OD₅₄₀)에서 열처리로 불활성화 한 효소 반응액의 흡광도(OD₅₄₀)를 뺀 값을 순수한 효소활성도로 계산하였다.

탄소원에 따른 GNUM08123 균주의 아가레이즈 생산 특성

GNUM08123의 발효 및 아가레이즈 생산 연구는 기본적으로 ASW-YP 액체 배지에 균주를 접종하여 28°C에서 72시간 동안 진탕 배양하여 수행하였다. 일정한 시간 간격으로 배양액 1 ml씩을 채취하여 600 nm에서의 흡광도(OD₆₀₀)를 측정하여 균체의 생장곡선을 작성하였다. 또한 샘플을 16,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하여 DNS 방법으로 아가레이즈 활성을 측정하였다. GNUM08123 균주로부터 균체 생장 및 아가레이즈 생산성을 증대시키기 위해, ASW-YP 배지의 탄소원을 조정하는 시험을 실시하였다. ASW-YP 본래 조성에 5종류의 탄소원(아가, 설탕, 포도당, 맥아당)을 최종 0.1%가 되도록 각각 첨가하여, 상기와 동일한 방법으로 균주 생장 및 아가레이즈 생산을 측정, 비교하였다.

결과 및 고찰

GNUM08123 균주의 형태학적 특성

GNUM08123은 그람-음성, 호기성 박테리아이다. 콜로니는 베이지 색을 띠고 둥글며 볼록한 형태의 부드러운 표면을 형성하였다. 세포크기는 ASW-YP 또는 Marine Agar 2216 평판고체배지에서 28°C로 배양했을 때, 넓이 0.5–0.7 µm, 길이 1.6–1.8 µm이다. 전자현미경으로 관찰했을 때, 한

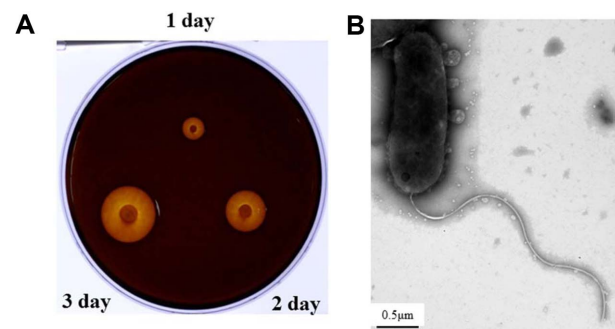


Fig. 1. Phenotypic characteristics of the GNUM08123 strain. (A) Detection of agarolytic activity on an agar plate. The strain was cultured on an ASW-YP agar plate and was incubated at 28°C, and the plate was stained with Lugol's Iodine to detect the product degraded by agarase. (B) Transmission electron microscopy (TEM). The strain was grown on an ASW-YP plate at 28°C for 2 days and was negatively stained for TEM analysis. The polar flagellum is indicated by the arrow. Bar, 0.5 µm.

개의 극성 편모를 갖는다(Fig. 1).

GNUM08123 균주의 계통수 분석

GNUM08123 균주의 16S rRNA 유전자 서열은 *V. chagasii* R-3712^T (97.7%), *V. fortis* LMG21557^T (96.6%), *Vibrio jasicida* TCFB 0772^T (96.6%), *Vibrio sagamiensis* LC2-047^T (96.6%), *Vibrio hyugaensis* 090810a^T (96.6%), *Vibrio diabolicus* HE800^T (96.5%), *Vibrio splendidus* ATCC33125^T (96.3%)와 가장 높은 유사성을 보였다. 16S rRNA 유전자 서열에 기초하여 작성한 NJ 계통수 해석 결과, GNUM08123은 유전적으로 가장 가까운 *V. chagasii* R-3712^T를 비롯한 다른 종과 구분되는 라인을 형성하였다(Fig. 2). 이러한 결과는 GNUM08123가 *Vibrio* 속에서 보고되었던 표준 균주와는 다른 새로운 종일 것임을 시사하였다.

GNUM08123 균주의 생리화학적 특성

GNUM08123 균주는 성장 온도 범위는 온도 15–40°C, pH 4.0–9.0, 0.5–7.0% NaCl (w/v) 범위에서 성장할 수 있으며, 최적 성장 환경은 25–30°C, pH 7.0–8.0, 2.0–4.0% NaCl (w/v) 범

위이다. 또한, 이 균주는 chloramphenicol에는 감수성을 보이지만 kanamycin, neomycin, ampicillin, apramycin, nalidixic acid, thiostrepton에는 저항성을 나타냈다.

GNUM08123의 주요한 isoprenoid quinone은 ubiquinone-8 (Q-8)인데 이는, *Vibrio* 속에 속하는 많은 박테리아에서의 보고와 일치한다(Table 1). GNUM-3의 유전체 G+C 함량은 46.9 mol%로 일반적으로 보고되는 *Vibrio*속의 G+C 함량 범위(38–51 mol%)에 속하며, 계통발생적 유연관계가 가장 높은 *V. chagasii* R-3712^T [22] 보다는 2.3%, *V. fortis* LMG21557^T [23] 보다는 1.3%가 높았다. 주요한 세포 지방산(≥5%)은 summed feature 3 (34.4%, comprising C_{16:1} ω7c/iso-C_{15:0} 2-OH), C_{16:0} (25.9%), C_{18:1} ω7c (8.4%), C_{14:0} (5.9%)이다.

GNUM08123는 계통학적으로 가장 가까운 *V. chagasii* R-3712^T와 비교했을 때, 성장 온도, melibiose 또는 mannitol 발효 능력 등에서 차이를 보였다(Table 1). 또한, GNUM08123는 indole, esterase (C4), lipase (C14), leucine arylamidase, glucosaminidase, nitrate reductase, urease 등의 대사 및 효소 활성에서도 *V. chagasii* R-3712^T와 다르게 나타났다. 이에 두 균주 사이의 유전학적 분석을 수행하였다.

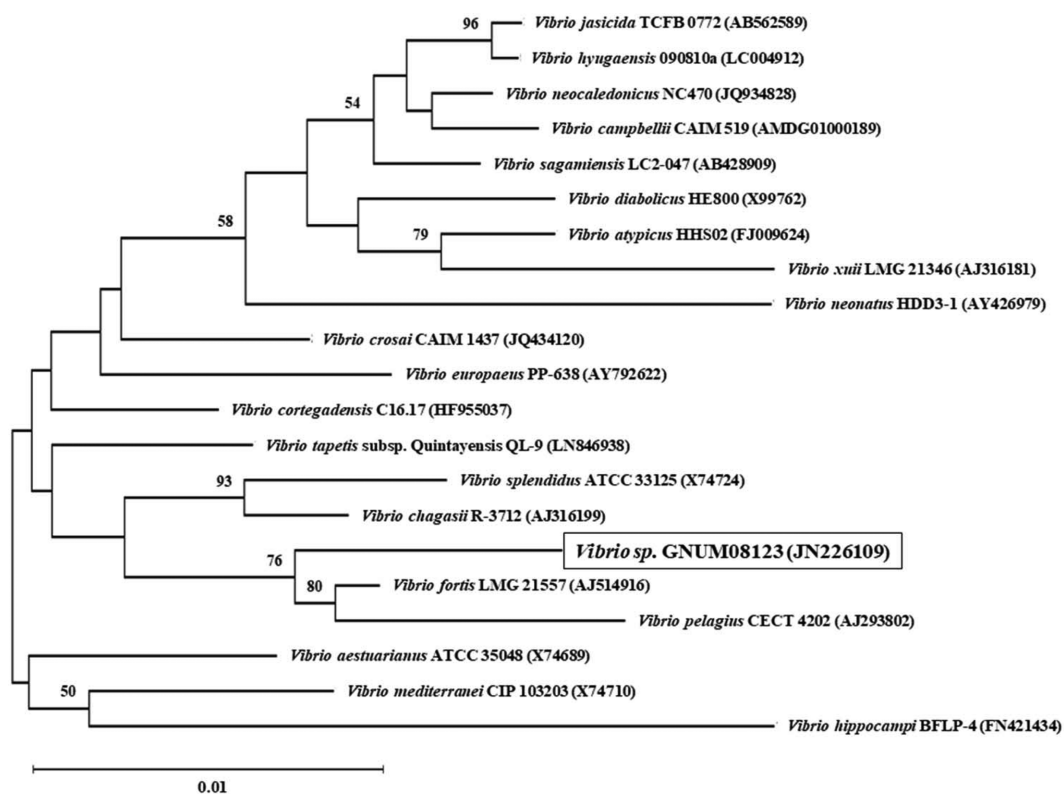


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationships between the GNUM08123 strain and its related *Vibrio* species. The bootstrap values (>50%) based on 1,000 replicates are shown at the branch points. The nucleotide sequence accession numbers are given in parentheses. Bar, 0.01% estimated sequence divergence.

Table 1. Phenotypic and chemotaxonomic characteristics that differentiate strain GNUM08123^T from *Vibrio* species.

Strain: 1, strain GNUM08123^T; 2, *V. chagasii* R-3712^T [22]; 3, *V. fortis* LMG21557^T [23]. Symbols: +, Positive; -, negative.

Characteristics	1	2	3
Motility	+*	+*	-
DNA G+C content (mol%)	46.92*	44.6	45.6
Growth at:			
9% NaCl	-*	-*	-
4 °C	-*	+*	-
40 °C	+*	-*	-
Enzyme activity:			
Agarase	+*	-*	-*
Alkaline phosphatase	+*	+*	-
Indole production	-*	+*	+
Esterase (C4)	-*	+*	-
Lipase (C14)	+*	-*	-
Leucine arylamidase	+*	-*	-
Acid phosphatase	-*	-*	-
β-Galactosidase	-*	-*	+
N-acetyl-β-glucosaminidase	+*	-*	-
Nitrate reductase	+*	-*	+
Urease	+*	-*	+
Fermentation of:			
D-glucose	+	+	+
D-maltose	+	+*	+*
D-galactose	+*	+*	+
D-mannose	-*	-*	+
Mannitol	+*	-*	+
Amygdaline	-*	-*	+
Melibiose	+*	-*	+
Sucrose	+*	+*	+
Utilization of:			
D-mannose	-*	-*	+
Mannitol	+*	-*	+

*Data from this study.

DNA-DNA hybridization 분석

GNUM08123 균주와 *V. chagasii* R-3712^T 균주사이의 DNA hybridization을 통한 DNA 연관성은 58.6%였다. 일반적으로 두 균주 사이의 DNA hybridization을 통한 DNA 연관성이 70% 이하 또는 16S rRNA 유전자 서열 유사성이 97% 이하이면 두 개체는 서로 다른 종(species)으로 인정한다[24,25]. 이와 같은 사실을 감안할 때, GNUM08123는 *V. chagasii* R-3712^T와는 구별되는 새로운 종으로 판단된다. 결론적으로, 16S rRNA 유전자 서열의 유사성과 염색체 DNA

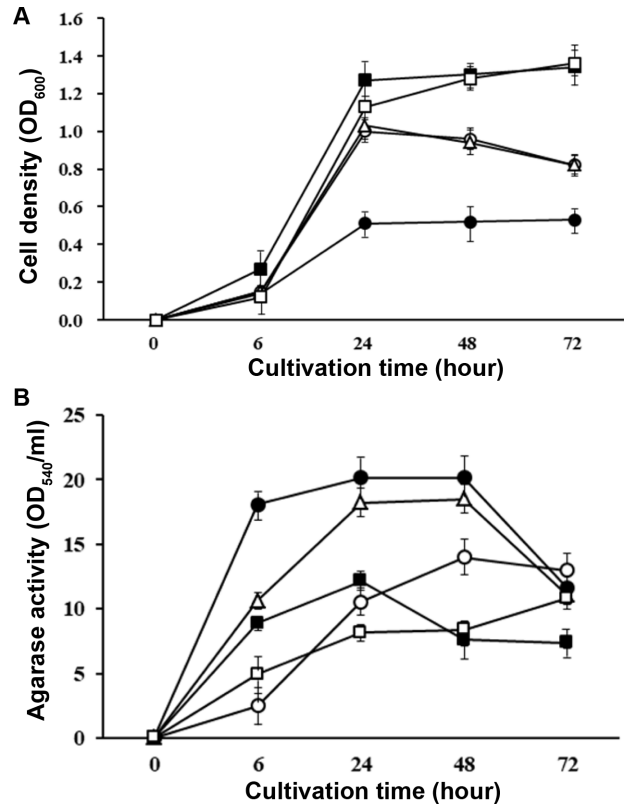


Fig. 3. Cell growth (A) and agarase production (B) of the GNUM08123 strain in ASW-YP broth containing various carbon sources (0.1%) depending on the cultivation time. The optical density (OD₆₀₀) was measured at 600 nm to plot the growth curve. Agarase activity was measured using the colorimetric method (OD₅₄₀) employing 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) solution. All data shown are mean values from at least three replicate experiments. ●—●, ASW-YP; ○—○, agar; ■—■, glucose; □—□, maltose; △—△, sucrose.

의 연관성, 많은 생리화학적 특징에서의 차이점들을 고려할 때, GNUM08123 균주는 계통학적으로 가장 가까운 *V. chagasii* R-3712^T와는 구별되는 신종으로 결론하였다.

세포생장 및 아가레이즈 생산 특성

GNUM08123 균주의 생장은 탄소원으로 포도당 또는 맥아당이 제공되었을 때 대조군(ASW-YP 배지)의 생장에 비해 약 2.6배 생장이 증가되었고, 아가 또는 설탕이 제공되었을 때에는 약 2배의 세포 생장 증가가 관찰되었다(Fig. 3A). GNUM08123 균주가 세포외부로 생산하는 아가레이즈는 한 천만 제공된 배지에서 가장 높은 활성(대조군의 1.4배)이 관찰되었는데, 균주 생장곡선의 대수증식기에 진입하는 시기에 생산되어 정체가까지 안정적으로 생산되었다(Fig. 4B).

또한 설탕이 탄소원으로 제공된 배지에서도 아가레이즈 활성이 대조군에 비해 약 1.2배 증가하였다. 그러나, 포도당 및 맥아당이 탄소원으로 제공된 배지에서는 대조군에 비해 아가레이즈 활성이 현저히 낮게 관찰되었다. 이는 포도당 및 맥아당이 다른 당에 비해 빨리 대사됨으로써 균주의 빠른 생장을 유도하였지만, 아가레이즈 생산에는 carbon catabolite repression (CCR)을 유도했을 것으로 판단된다. 일반적으로 CCR은 포도당 등과 같은 빨리 대사되는 탄소원의 존재 시 여러 가지 대사에 관련된 유전자의 발현이 억제되는 현상을 일컫는다. 그러나 배양시간이 72시간을 경과하면(정체기의 후반) 대부분의 당이 소모되어 CCR 현상이 사라지면서, 아가레이즈 활성도 비슷하게 나타나는 것으로 사료된다.

이러한 CCR 현상은 산업적으로 유용한 효소, 항생제, 생리활성물질 등의 생산에서 자주 보고되며, cAMP, glucose kinase, sugar phosphotransporter 등에 의해서 매개되는 것으로 보고되어 있다[26]. 한천대사경로에 관련된 CCR 연구는 *Streptomyces coelicolor*가 유일하며, 세포외부로 생산하는 두 종의 β -아가레이즈(DagA 및 DagB) 및 한천의 최종 분해물인 갈락토오스의 대사 관련 유전자 클러스터는 모두 포도당에 의해서 전사레벨에서 유전자 발현이 억제 된다[27]. 따라서, 이와 같은 CCR 현상이 GNUM08123 세포내에서도 나타났을 것으로 예상된다.

본 연구진은 최근, 제주도 연안 해양에서 분리한 한천분해 미생물 *Vibrio* sp. S4가 생산하는 내열성 아가레이즈에 대해 보고한 바 있다[28]. 이 균주는 한천을 첨가하지 않은 배양액에서의 아가레이즈 생산은 미약했으나, 0.1% 한천을 첨가한 액체배지에서는 72시간에 세포농도와 아가레이즈 활성이 최대치를 보였으며, 아가레이즈 활성은 한천을 첨가하지 않은 대조군의 25배나 증가하였다. 이러한 사실은 두 *Vibrio* 균주(GNUM08123과 S4균주)에서의 아가레이즈 유전자 발현이 한천에 의해 공통적으로 유도되며, 유도되는 정도는 균주 마다 차이가 크다는 사실을 시사하고 있다.

결론

GNUM08123 균주는 아가레이즈 생산 균주로서 대한민국 동해안 영일만 해안가에 서식하는 홍조류로부터 분리되었다. GNUM08123은 그램-음성, 호기성 박테리아로 베이지색소를 내며, C_{16:0} (25.9%)와 summed feature 3 (C_{16:1}ω7c/iso-C_{15:0}-2-OH, 34.4%)가 주요한 세포지방산 성분이다. 16S rRNA 유전자 서열 분석에 의하면, GNUM08123은 *Gammaproteobacteria*에 속하며, *V. chagasii* R-3712^T와 97.7%의 가장 높은 유사성을 갖는다. GNUM08123의 DNA G+C 함량은 46.9 mol%이며, 주요한 isoprenoid quinone은 ubiquinone-8이다. DNA-DNA hybridization 결과 및 16S rRNA 유전자

서열 유사성, 형태학적·생리화학적 특성 등에 기초하여, GNUM08123은 가장 근접한 표준균주인 *V. chagasii* R-3712^T와는 구분되는 *Vibrio*속의 신종으로 판단되며, *Vibrio* sp. GNUM08123으로 명명하였다. GNUM08123에 의한 아가레이즈 생산은 아가와 설탕에 의해서는 유도되지만 포도당과 맥아당에 의해서는 억제되는데, 이는 CCR에 의한 것으로 판단된다.

Strain deposition and GenBank accession number

The type strain GNUM08123^T (=DSM25249^T=KCTC23757^T) was isolated from red algae, *Callophyllis crispate*, collected from Yongil Bay near the East Sea of Korea.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of strain GNUM08123^T is JN226109.

Acknowledgments

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

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Macián MC, Ludwig W, Schleifer KH, Pujalte MJ, Garay E. 2001. *Vibrio agarivorans* sp. nov, a novel agarolytic marine bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2031-2036.
- Usov AI. 1998. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. *Food Hydrocolloid.* **12**: 301-308.
- Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**: 908-912.
- Chi WJ, Chang YK, Hong SK. 2012. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 917-930.
- Giordano A, Andreotti G, Tramice A, Trincone A. 2006. Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnol. J.* **1**: 511-530.
- Kobayashi R, Takisada M, Suzuki T, Kirimura K, Usami S. 1997. Ncoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 162-163.
- Chen HM, Zheng L, Yan XJ. 2005. The preparation and bioactivity research of agaro-oligosaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* **43**: 29-36.

8. Enoki T, Okuda S, Kudo Y, Takashima F, Sagawa H, Kato I. 2010. Oligosaccharides from agar inhibit pro-inflammatory mediator release by inducing heme oxygenase 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 766-770.
9. Ji J, Wang LC, Wu H, Luan HM. 2011. Bio-function summary of marine oligosaccharides. *Int. J. Biol.* **3**: 74-86.
10. Hong SJ, Lee JH, Kim EJ, Yang HJ, Park JS, Hong SK. 2017. Anti-obesity and anti-diabetic effect of neoagarooligosaccharides on high-fat diet-induced obesity in mice. *Mar. Drugs* **15**: 90.
11. Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* **55**: 541-555.
12. Chun J, Lee JH, Jung YY, Kim MJ, Kim SI, Kim BK, Lim YW. 2007. ExTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2259-2261.
13. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
14. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
15. Kimura M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
16. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.
17. Komagata K, Suzuki K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematic. *Methods Microbiol.* **19**: 161-207.
18. Miller L, Berger T. 1985. *Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acids*. Hewlett-Packard Application note 228-241. Hewlett-Packard Co, Avondale, Pa.
19. Sasser M. 1990. *Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids*. MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
20. 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.
21. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
22. Thompson FL, Thompson CC, Li Y, Gomez-Gil B, Vandenberghe J, Hoste B, et al. 2003. *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 753-759.
23. Thompson FL, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Gullian M, Swings J. 2003. *Vibrio fortis* sp. nov. and *Vibrio hepatarius* sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1495-1501.
24. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, et al. 1987. Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.
25. Stackebrandt E, Goebel BM. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
26. Miyazono K, Tabei N, Morita S, Ohnishi Y, Horinouchi S, Tanokura M. 2012. Substrate recognition mechanism and substrate-dependent conformational changes of an ROK family glucokinase from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **194**: 607-616.
27. Romero-Rodríguez A, Ruiz-Villafán B, Tierrafría VH, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. 2016. Carbon catabolite regulation of secondary metabolite formation and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **180**: 1152-1166.
28. Lee CR, Chi WJ, Bae CH, Hong SK. 2015. Identification of a new agar-hydrolyzing bacterium *Vibrio* sp. S4 from the seawater of Jeju island and the biochemical characterization of thermo-stable agarose. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 314-321.