

Isolation of *Agarivorans* sp. KC-1 and Characterization of Its Thermotolerant β -Agarase

Kyung-Cheol Min¹, Chang-Eun Lee², Dong-Geun Lee¹ and Sang-Hyeon Lee^{1,2*}

¹Major in Pharmaceutical Engineering, Division of Bioindustry, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Department of Green-Chemistry Convergence Engineering, Graduate School, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received July 20, 2017 / Revised February 28, 2018 / Accepted March 26, 2018

This article reports an agar-degrading marine bacterium and characterizes its agarase. The agar-degrading marine bacterium, KC-1, was isolated from seawater on the shores of Sacheon, in Gyeongnam province, Korea, using Marine Broth 2216 agar medium. To identify the agar-degrading bacterium as *Agarivorans* sp. KC-1, phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequence was used. An extracellular agarase was prepared from a culture medium of *Agarivorans* sp. KC-1, and used for the characterization of enzyme. The relative activities at 20, 30, 40, 50, 60, and 70°C were 65, 91, 96, 100, 77, and 35%, respectively. The relative activities at pH 5, 6, 7, and 8 were 93, 100, 87, and 82%, respectively. The extracellular agarase showed maximum activity (254 units/l) at pH 6.0 and 50°C in 20 mM of Tris-HCl buffer. The agarase activity was maintained at 90% or more until 2 hr exposure at 20°C, 30°C and 40°C, but it was found that the activity decreased sharply from 60°C. A zymogram analysis showed that *Agarivorans* sp. KC-1 produced 3 agar-degrading enzymes that had molecular weights of 130, 80, and 69 kDa. A thin layer chromatography analysis suggested that *Agarivorans* sp. KC-1 produced extracellular β -agarases as it hydrolyzed agarose to produce neoagarooligosaccharides, including neoagarohexaose (21.6%), neoagarotetraose (32.2%), and neoagarobiose (46.2%). These results suggest that *Agarivorans* sp. KC-1 and its thermotolerant β -agarase would be useful for the production of neoagarooligosaccharides that inhibit bacterial growth and delay starch degradation.

Key words : *Agarivorans* sp. KC-1, β -agarase, marine bacterium, neoagarooligosaccharides, zymogram

서 론

한천 (Agar)은 우뚝가사리나 지누아리 등과 같은 홍조류의 세포벽에 존재하는 다당류이다. 한천의 구성성분은 주로 agarose와 agaropection으로 되어 있으며, 식품 산업의 안정제, 농축제 등으로 광범위하게 사용되어왔다[3, 6]. 또한, 한천은 난소화성 다당류로서 다이어트 식품의 원료로도 사용되고 있고, 변비, 당뇨병, 비만 치료에도 사용되며, 가공된 한천은 분자생물학 실험이나 미생물 배지에 널리 사용되고 있다[4, 14]. 3면이 바다로 둘러싸여 있는 우리나라는 남해안과 제주도에서 한천이 대량으로 생산되고 있지만 약 6.5% 정도만 가공형태로 사용되고 있고, 나머지는 대부분 방치되고 있다[6, 12]. Agarose는 1→3결합으로 연결된 β -D-galactose의 복합체이고, agaropection은 1→4결합으로 연결된 3,6-anhydro- α -L-galactose의 복합체이다[1, 2]. Agarase는 agarose를 분해하는 효

소이며, α -agarase와 β -agarase로 구별된다. Neoagarooligosaccharides는 β -agarase를 이용한 한천의 분해산물이며 보습 효과, 대식세포 활성화, 세균성장 억제, 미백효과 그리고 전분 노화 방지 등의 많은 유용한 기능이 있다[10]. α -Agarase는 agarooligosaccharides를 생산하는데 이는 항암 활성화와 항산화 효과를 가지고 있다[8]. 일반적으로 기질이 gel 상태보다는 sol 상태에서 효소의 반응이 원활하며, 한천은 40°C 이하의 온도에서는 젤(gel) 상태로 존재하므로 40°C 이상의 온도에서 반응성과 안정성이 있는 한천분해효소를 개발해야 할 필요가 있다[18]. 현재까지 agarase를 생산하는 균주들은 많이 보고가 되어있으며, β -agarase가 α -agarase 보다 더 많이 보고가 되어 있다[1]. 우리나라에서 보고된 균주들은 *Marinomonas* 속[6], *Flammeovirga* 속[4], *Maribacter* 속[8], *Simidiua* 속[13], *Thalassomonas* 속[10], *Agarivorans* 속[5], *Cellovibrio* 속[1], *Cytophaga* 속[3] 등이다. 이에 본 연구에서는 국내 남해안의 해수로부터 40°C 이상의 고온에서 한천을 분해할 수 있는 능력을 가진 해양미생물을 분리 및 동정하였고, 이 미생물이 생산하는 한천분해효소의 산업적 이용 가능성을 조사하고 생화학적 특성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

한천분해 균주의 분리 및 동정

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5628

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.

경상남도 사천시 남일대해수욕장에서 한천분해활성을 가지는 세균의 분리를 위한 시료를 채취하였으며, Marine broth 2216 (Difco, Detroit, USA) 배지에 1.5% 한천을 첨가한 Marine agar 2216 배지에 시료액을 도말한 후 27°C에서 배양하면서 한천분해활성으로 Marine agar 2216 배지를 함몰시키는 KC-1 균주를 3차례 이상 순수분리하여 선별하였다. 순수분리된 균체로부터 Wizard Genomic DNA Isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 genomic DNA를 획득하고, 16S rDNA 유전자 단편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. PCR primer로는 1492R (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 와 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 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 method와 Bootstrap method (n=1,000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

한천분해 균주의 배양

Marine broth 2216 4 ml에 순수분리한 KC-1 균주를 접종한 후 27°C, 250 rpm에서 하루 동안 진탕배양한 후, 0.2%(w/v) agar가 첨가된 Marine broth 2216 배지 50 ml에 배양액을 접종하고 27°C, 250 rpm에서 7일 동안 진탕배양하였다.

배양시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성 측정

순수분리한 KC-1 균주를 진탕배양하면서 24시간마다 일부 배양액을 채취하여 배양시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소의 활성을 측정하였다.

조효소액의 제조

배양액을 원심분리하여(3,000×g, 4°C, 30 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액 15 ml를 Snake Skin Dialysis Tubing (Thermo Scientific, USA)에 넣고 1,000 ml 비커에 20 mM Tris-HCl (pH 7.0)를 900 ml 첨가하고, 4°C의 냉장실에 2시간 정치하는 것을 2번 반복한 후 세번째에는 12시간 이상 투석을 시행하였다. 투석이 완료된 조효소액은 membrane filter (0.45 µm, Milipore, USA)를 통과시킨 후에 4°C에서 냉장 보관하였다.

효소활성 측정

Agarase 활성은 DNS법을 이용하여 측정하였다. DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변형법으로 환원당을 측정하는 방법이다[2]. DNS solution은 NaOH 13.2 g, 3,6-dinitrosalicylic acid 7.07 g, sodium sulfate 5.53 g, potassium tar-

trate (Rochelle salt) 204 g, phenol 5.07 g을 증류수 1,000 ml에 녹여서 제조하였다. 최종농도 0.2%(w/v)의 agarose가 포함된 완충용액을 중탕 가열한 후 반응온도까지 냉각하고 반응수조를 이용하여 온도를 유지하면서 기질용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 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 µM의 galactose를 생산하는 한천분해 효소의 양을 1 unit (U)으로 나타내었다.

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 중탕 가열한 후 20-70°C의 온도별로 냉각한 후 효소활성을 측정하였다.

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. 각 완충용액에 최종농도 0.2%(w/v)의 agarose를 첨가하고 50°C에서 효소활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 열안정성 측정

조효소액을 이용하여 온도별 노출시간에 따른 한천분해효소의 잔존활성을 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 0.5, 1.0, 1.5, 2.0시간 열처리한 후, 50°C에서 효소활성을 측정하였다. 측정된 효소활성은 열처리전의 효소활성과 비교하였다.

한천분해효소의 Zymogram

한천분해효소의 분자량을 확인하기 위하여 10% polyacrylamide 겔에 SDS를 첨가하지 않고 0.1%(w/v)의 agarose (LMP, Promega, USA)를 첨가하여 전기영동을 시행하였다[14]. Zymogram에 사용된 세포추출물은 균주 배양액 4 ml을 원심분리(14,000×g, 4°C, 5 min)하여 상층액을 제거하고 여기에 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충용액 1 ml를 첨가하여 현탁한 후, Sonicator (Sonic, USA)를 이용하여 세포벽을 파쇄하고 원심분리(14,000×g, 4°C, 5 min)하여 상층액을 따로 모아 제조하였다. 세포추출물 10 µl에 SDS가 첨가되지 않은 시료 완충용액 5 µl를 첨가하여 0.1%(w/v) SDS를 함유한 running 완충용

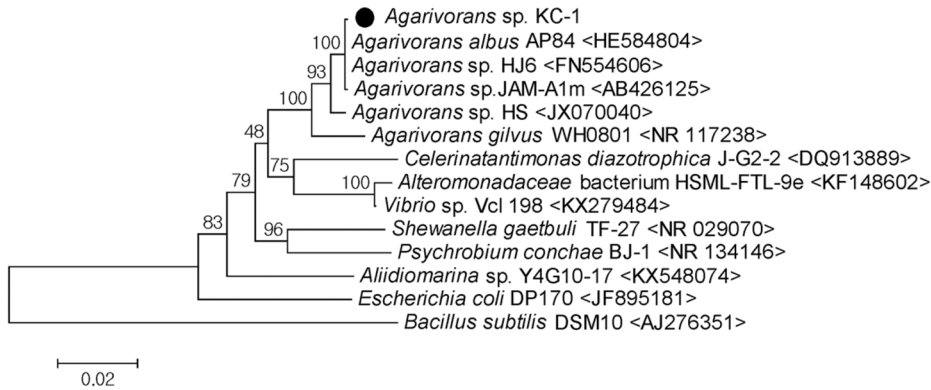


Fig. 1. Neighbor-Joining Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing isolated *Agarivorans* sp. KC-1 strain with other bacteria. The numbers at the branch node are percentages of bootstrap values (n=1,000) and numbers in parenthesis are numbers in GenBank.

액에서 실시하였다. 전기영동이 완료된 후 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.

한천가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

조효소액을 이용한 agarose의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 조효소액과 0.2%(w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 50°C에서 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 60 분 반응시킨 후, Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, 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 neo-agarooligosaccharides [14]를 사용하였다. TLC에서 나타난 가수분해산물의 농도비율을 계산하기 위하여 Image J 1.44o (Wayne Rasband, Bethesda, USA)프로그램을 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

한천분해균주의 분리 및 동정

경상남도 사천시 남일대해수욕장의 해수 시료를 Marine agar 2216 배지에 도말하여 한천 분해능이 우수한 균주를 선별하였다. 분리된 한천분해능 KC-1 균주의 16S rDNA 염기서열 분석결과 1,437 bp의 염기서열을 얻었고, BLAST 탐색으로 *Agarivorans albus* AP84 및 *Agarivorans* sp. HJ-6와 99%의 가장 높은 유사성을 나타냈으므로, 분리균주를 *Agarivorans* sp. KC-1으로 명명하였다. 본 연구와 Genbank에서 획득한 16S rDNA 염기서열을 bootstrap method (n=1,000)와 Neighbor-joining method 로 분석하여 알아낸 본 연구 균주의 계통분류학적 위치를 Fig. 1에 나타냈다.

시간에 따른 한천분해 균주의 효소활성과 성장 측정

Marine broth 배지 50 ml에 0.2%(w/v) agar 를 첨가한 후 *Agarivorans* sp. KC-1 균주를 접종하여 27°C, 250 rpm에서 진탕배양하였을 때 나타나는 효소활성과 성장곡선을 Fig. 2에 나타냈다. 시간에 따른 한천분해 균주의 효소활성과 성장곡선의 측정결과를 살펴보면, 1일차에서 성장기가 끝나고, 이후 지체기가 시작되었음을 알 수 있었다. 효소활성은 2~4일 까지 최고활성을 보이고, 이후 감소하였다. 이후부터 *Agarivorans* sp. KC-1 균주의 한천분해효소는 진탕배양 시작 이후 2일까지 배양한 조효소액을 이용하였다.

한천분해효소의 온도별 활성

각 온도별 *Agarivorans* sp. KC-1 유래 한천분해효소의 활성은 Fig. 3에 나타냈다. 실험에 사용된 효소는 50°C에서 최대활성을 보였고, 50°C에서의 활성을 100%로 하였을 때, 상대활성이 40°C에선 약 95%, 30°C에서 약 90%를 나타내었고, 20과 60°C에서 60% 이상의 활성을 보였다. 다른 균주들의 한천분해효소의 최적온도를 보면 *Simidiua* sp. SH-1 [13], *Pseudoalter-*

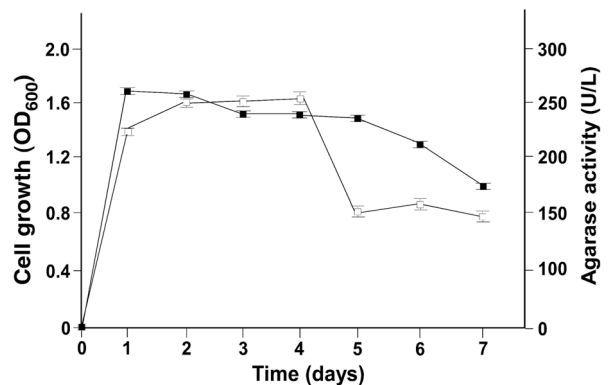


Fig. 2. Cell growth and agarase activity of *Agarivorans* sp. KC-1 with culture time. (□ agarase activity [units/L], ■ cell growth [OD₆₀₀]).

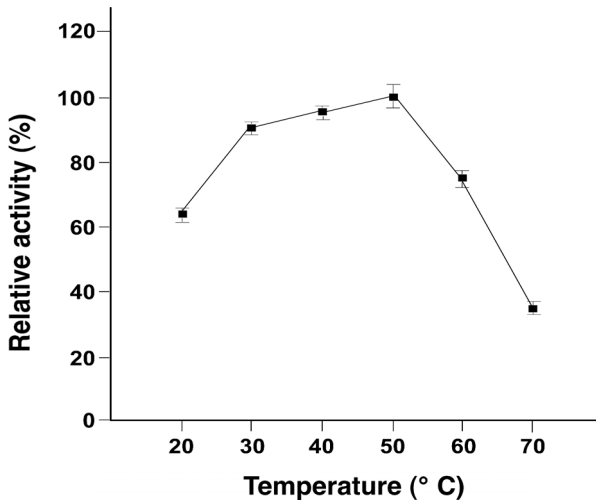


Fig. 3. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reactions were carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C in 1,000 µl of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agarose and 500 µl of raw enzyme solution for 30 min.

omonas sp. JYBLC [17], 와 *Thalassomonas* sp. SL-5 [10]는 각각 30, 35 및 40°C의 최적온도를 나타내어 본 연구에 사용된 *Agarivorans* sp. KC-1 보다 낮은 최적온도를 보였으며, *Maribacter* sp. SH-1 [8]은 50°C로 동일한 최적온도를 보였다. 한천 분해효소의 11 당 활성을 보면 본 연구에 사용된 *Agarivorans* sp. KC-1 는 254.7 U/1로 최대치를 나타내고, *Glaciecola* sp. SL-12 [11]의 233 U/1와 비슷한 활성을 나타내었다. 일반적으로 기질로 사용되는 한천은 40°C 이상의 온도에서 겔(gel)상태가 아닌 졸(sol)상태로 존재하고, 졸 상태에서 일반적으로 효소가 더 높은 활성을 나타낸다는 보고들이 있다[9, 15]. 따라서 본 연구의 균주가 생산하는 한천분해효소는 50°C의 최적온도를 보여 유용하게 사용할 수 있을 것이다.

최적온도에서의 pH별 한천분해효소의 활성

pH별 *Agarivorans* sp. KC-1 유래 한천분해효소의 활성은 Fig. 4에 나타냈다. pH 5~8 사이에서 높은 활성을 보였으며, 최적인 pH 6.0에서의 활성을 100%로 하였을 때, 5, 7, 8에서도 80% 이상의 활성을 보였다. pH 5.0에선 20 mM Sodium acetate 와 20 mM Tris-HCl 두 완충용액이 비슷한 활성을 보였고, pH 8.0에선 20 mM Tris-HCl 그리고 20 mM GTA 두 완충용액이 활성에서 차이를 보였다. 다른 한천분해효소의 최적 pH는 *Agarivorans* sp. JA-1 [18]은 pH 8.0로 염기성을 보였고, *Alteromonas* sp. SH-1 [14]과 *Maribacter* sp. SH-1 [8]에선 pH 6.0이며, *Simiduia* sp. SH-1 [13]에선 pH 7.0으로 중성을 보임으로써 다양한 최적 pH가 보고되어 있다.

한천분해효소의 열안정성

Agarivorans sp. KC-1 유래 한천분해효소의 열안정성을 Fig.

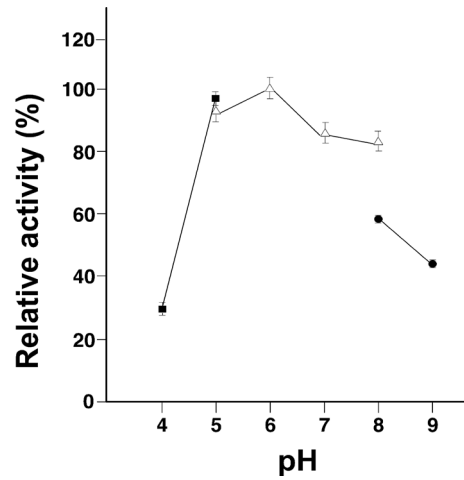


Fig. 4. Effect of pH on agarase activity. The reactions were carried out at 50°C in 1,000 µl of corresponding buffer containing 0.2% agarose and 500 µl of raw enzyme solution for 30 min. (■ 20 mM sodium acetate, pH 4.0-5.0; △ 20 mM Tris-HCl, pH 5.0-8.0; ● 20 mM GTA, pH 8.0-9.0).

5에 나타냈다. 최적온도와 최적 pH에서 열 처리를 하지 않은 효소의 활성을 100%로 간주하였을 때, 20, 30, 40°C는 해당 온도에 2시간 노출되어도 90% 이상의 잔존활성을 보였다. 50°C에서는 노출시간에 따라 활성이 감소되는 것을 볼 수 있었고, 2시간 노출되었을 때 67%의 잔존활성을 보였다. 60°C와 70°C의 열처리에서는 0.5시간부터 급격한 활성의 감소를 보였다. 60°C에서는 2시간, 70°C에서는 1시간 이후부터 활성의 완전한 소실을 보였다. 따라서 본 균주 *Agarivorans* sp. KC-1의 한천분해효소는 50°C까지의 열처리에서는 내열성을 가지고 있다고 확인할 수 있었다.

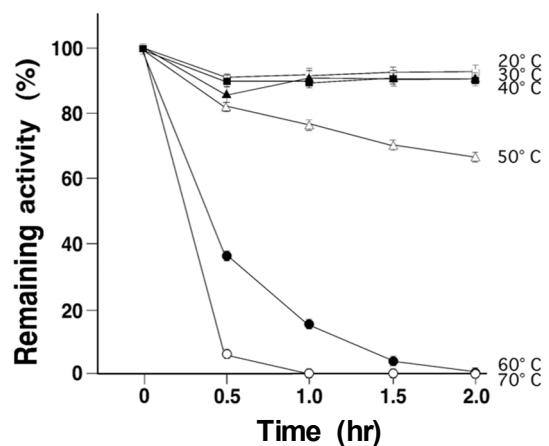


Fig. 5. Remaining activities of agarase after heat treatment. The raw enzyme solutions were pre-incubated at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reactions were then carried out at 50°C in 1,000 µl of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agarose and 500 µl of heat-treated raw enzyme solution for 30 min.

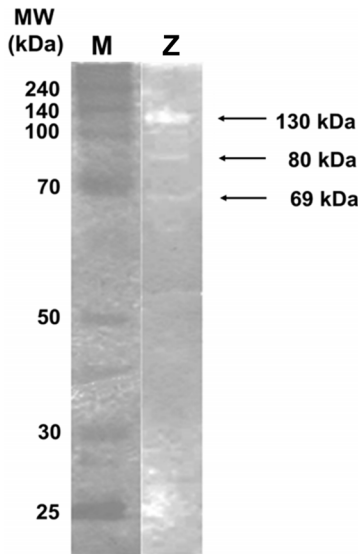


Fig. 6. Zymogram and SDS-PAGE analysis of agarase. The molecular weight of the enzyme is estimated 130, 80 and 69 kDa. (size marker; lane M, zymogram analysis of agarase; lane Z).

Zymogram을 통한 한천분해효소의 단백질 크기 분석

Zymogram을 이용하여 한천분해효소 활성을 보이는 단백질 크기를 분석한 것을 Fig. 6에 나타냈다. 조효소를 이용한 zymogram에서는 한천이 분해된 단백질의 밴드들이 관찰되지 않았는데, 이는 조효소액이 한천분해활성을 보였지만(Fig. 3, Fig. 4) zymogram으로 가시화하기에는 단백질의 농도가 낮은 것으로 판단되었다. 따라서 균주 배양과 원심분리로 수확한 세포를 초음파 파쇄기로 파쇄하여 제조한 세포추출물로 zymogram을 실시하였다. 분자량이 약 130 kDa, 80 kDa, 및 69 kDa인 3개의 한천분해효소가 있는 것으로 나타났고, 가장

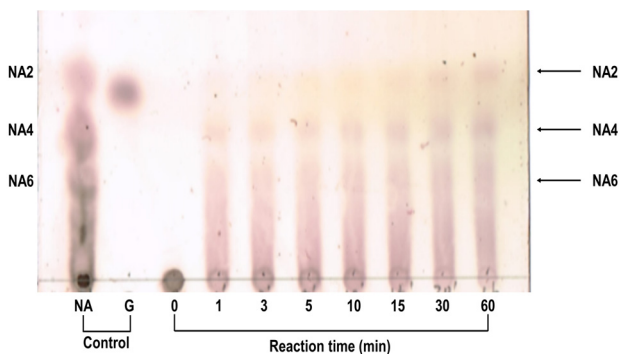


Fig. 7. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 50°C in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agarose and 500 µl of raw enzyme solution for 0, 1, 3, 5, 10, 15, 30 and 60 min. (NA, neoagarooligosaccharides; G, D-galactose; NA6, neoagarohexaose; NA4, neoagarotetraose; NA2, neoagarobiose).

높은 활성을 가진 한천분해효소의 크기는 130 kDa으로 확인되었다. *Alteromonas* sp. SH-1 [14]은 85 kDa 과 110 kDa의 크기를 가진 한천분해효소가, *Agarivorans* sp. JA-1 [5]는 47 kDa의 한천분해효소가 있다고 보고되어 있다. 본 균주는 85 kDa 이상의 β-agarase를 생산하였는데(Fig. 6), 85 kDa 이상의 β-agarase를 생산하는 다른 균주로는 *Agarivorans* sp. AG17 [16]이 있다. Kim 등[7]은 총설에서 α-agarase의 분자량이 85 kDa 이상이고 β-agarase는 53 kDa 이하만 보고하였다. 본 연구에서 보고하는 130 kDa, 약 80 kDa, 및 69 kDa의 크기를 나타내는(Fig. 6) 3개의 β-agarase는 신규성이 높다고 할 것이다.

한천가수분해산물의 TLC분석

Agarivorans sp. KC-1 균주를 2 일간 배양하여 제조된 조효소액에 agarose를 기질로 첨가하여 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 7에 나타냈다. 반응 1분째부터 활발한 분해를 보였으며, 30분과 1시간 반응 후에는 기질이 거의 안 보이는 것을 확인할 수 있었다. 한천분해효소는 β-agarase와 α-agarase 두 종류가 존재한다고 알려져 있으며[4], 기질을 agarose로 사용할 경우에 α-agarase는 agarotriose 및 agaropentose를 생성하고, β-agarase는 neoagarohexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose를 생성하는데[4, 6, 14] 본 연구에 사용된 조효소액이 neoagarohexaose, neoagarotetraose 그리고 neoagarobiose를 생성하는 것으로 보아 *Agarivorans* sp. KC-1 균주가 생성하는 효소들은 β-agarase로 확인되었다. 반응시간에 따라 neoagarohexaose (NA6)와 neoagarotetraose (NA4)가 먼저 증가하고 이후 neoagarobiose (NA2)가 증가하였다. NA4의 생산은 반응 1분째부터 관찰되었고 NA2의 생산은 반응 15분째부터 관찰되었으며, 반응시간에 따라 NA2와 NA4의 농도가 증가하는 것을 알 수 있었다. 최종적으로 neoagarohexaose : neoagarotetraose : neoagarobiose는 각각 21.6%, 32.2% 및 46.2%로 생산되는 것을 알 수 있었다. 본 연구에 이용된 *Agarivorans* sp. KC-1 균주가 생산하는 50°C에서 최적활성을 보이는 β-agarase를 이용하여 전분노화방지, 세균성장 억제, 대식세포 활성화 기능, 미백효과 및 보습 기능을 가진 소재로 개발될 것이 기대된다[8].

References

1. Cha, J. A., Kim, Y. J., Seo, Y. B. and Yoon, M. H. 2009. Isolation of an agarolytic bacteria, *Cellovibrio mixtus* SC-22 and the enzymatic properties. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 157-162.
2. Chi, W. J., Lim, J. H., Park, D. Y., Kim, M. C., Kim, C. J., Chang, Y. K. and Hong, S. K. 2013. Isolation and characterization of a novel agar degrading bacterium, *Alteromonas macleodii* subsp. GNUM08120, from red macroalgae. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 8-16.
3. Cho, S. Y., Joo, D. S., Choi, Y. S., Kim, O. S., Song, H. M. and Lee, E. H. 1996. Isolation of agar degrading bacteria,

- Cytophaga* sp. ACLJ-18 and optimization of enzyme production. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **11**, 593-599.
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. 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.
 6. Jo, J. G., Lee, S. J., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2016. Characterization of agarase produced from the isolated marine bacterium *Marinomonas* sp. SH-2. *J. Life Sci.* **26**, 198-203.
 7. Kim, J. H., Kim, Y. H., Kim, S. K., Kim, B. W and Nam, S. W. 2011. Properties and industrial applications of seaweed polysaccharides-degrading enzymes from the marine microorganisms. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 189-199.
 8. Lee, C. E., Lee, S. J., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2016. Isolation of a new agar degrading bacterium, *Maribacter* sp. SH-1 and characterization of its agarase. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**, 156-162.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. Lee, S. A., Kim, J. U., Jung, J. H., 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. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **5**, 389-393.
 13. Lee, S. J., Oh, S. J., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2015. Characterization of agarase from an isolated marine bacterium, *Simiduia* sp. SH-1. *J. Life Sci.* **25**, 1273-1279.
 14. Lee, S. J., Shin, D. Y., Kim, J. D., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2016. Characterization of α -agarase from *Alteromonas* sp. SH-1. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **31**, 113-119.
 15. Lee, S. W., Lee, D. G., Jang, M. K., Jeon, M. J., Jang, H. J. and Lee, S. H. 2011. Improvement in the catalytic activity of β -agarase agaA from *Zobellia galactanicorans* by site-directed mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1116-1122.
 16. 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. Aqua. Sci.* **13**, 36-48.
 17. Oh, Y. H., Jung, C. K. and Lee, J. W. 2011. Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 818-821.
 18. Park, G. T., Lee, D. G., Kim, N. Y., Lee, E. J., Jung, J. G., Lee, J. H., Heo, M. S., Lee, J. H., Kim, S. J. and Lee, S. H. 2005. Isolation and characterization of a marine bacterium producing thermotolerant agarase. *J. Life Sci.* **15**, 884-888.

초록 : 한천분해세균 *Agarivorans* sp. KC-1의 분리 및 내열성 β -아가라제의 특성 규명

민경철¹ · 이창은² · 이동근^{1,2} · 이상현^{1,2*}

(¹신라대학교 제약공학과, ²신라대학교 일반대학원 그린화학융합공학과)

본 연구에서는 해양 한천분해세균 *Agarivorans* sp. KC-1과 해당균주의 agarase 특성을 조사하였다. 한천분해균인 KC-1은 경상남도 사천시 남일대 해수욕장에서 채취한 바닷물을 이용하여 Marine broth 2216 한천 배지에서 분리하였다. 분리된 균은 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통하여 *Agarivorans* 속 세균과 99% 일치하여 *Agarivorans* sp. KC-1으로 명명하였다. 세포외로 분비되는 agarase는 *Agarivorans* sp. KC-1 균주 배양액에서 획득하였으며, 이를 이용하여 특성 조사를 하였다. *Agarivorans* sp. KC-1 균주의 한천분해효소는 20, 30, 40, 50, 60 및 70°C에서 각각 65, 91, 96, 100, 77, 35%의 상대활성을 나타냈으며, pH 5, 6, 7, 8에서는 93, 100, 87, 82%의 활성을 나타내었다. 세포외 agarase는 50°C에서 pH 6.0인 20 mM Tris-HCl 완충용액을 사용하였을 때 최대(254 U/l)의 활성을 보였다. 이 agarase는 20, 30, 40°C에서 2시간 동안 열처리 하여도 90% 이상의 잔존활성을 보였다. 또한, 50°C에 2시간 노출된 후에도 67%의 잔존활성을 보였다. Zymogram 분석을 통하여 *Agarivorans* sp. KC-1 균주가 생산하는 한천분해효소의 크기는 약 130 kDa, 80 kDa, 69 kDa의 3개로 확인할 수 있었다. TLC 분석 결과, *Agarivorans* sp. KC-1 균주의 한천분해효소는 네오한천올리고당인 neoagarohexaose (21.6%), neoagarotetraose (32.2%) 및 neoagarobiose (46.2%)를 생성하는 것으로 보아 β -agarase로 확인되었다. 따라서 *Agarivorans* sp. KC-1가 생산하는 β -agarase는 전분노화 방지, 미백효과, 보습효과 및 세균생장 억제 등의 기능을 가지는 한천올리고당의 생산에 유용할 것으로 판단된다.