

## Isolation of an Agarase-producing *Persicobacter* sp. DH-3 and Characterization of its $\beta$ -agarase

Da-Hye Heo<sup>1</sup>, Dong-Geun Lee<sup>2</sup> and Sang-Hyeon Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Green-Chemistry Convergence Engineering, Graduate School, Silla University, Busan 617-736 Korea

<sup>2</sup>Major in Pharmaceutical Engineering, Division of Bioindustry, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received October 12, 2018 / Revised October 25, 2018 / Accepted October 26, 2018

The purpose of this study was to isolate a new marine agarase-producing bacterium. Agarase can hydrolyze agar and agarose to produce agarooligosaccharides or neoagarooligosaccharides, which possess many physiological functions. Strain DH-3 was isolated from seawater collected from the coast of Yeosu at Jeollanam province, Korea. A 16S rDNA sequence analysis showed this strain to be *Persicobacter* sp. DH-3. Extracellular agarase was prepared from culture media of *Persicobacter* sp. DH-3 and used for characterization. Relative activities at 20, 30, 40, 50, 60, and 70°C were 50, 55, 70, 100, 90, and 50%, respectively. Relative activities at pH 5, 6, 7, and 8 were 75, 100, 90, and 75%, respectively. The enzyme showed maximum activity at 50°C in a 20 mM Tris-HCl buffer at pH 6. This enzyme could be useful, as agar is in liquid state at 50°C. Agarase activities were maintained at 80% or more for 2 hr at 20, 30, and 40°C. Thin layer chromatography analysis suggested that *Persicobacter* sp. DH-3 produced extracellular  $\beta$ -agarases as it hydrolyzed agarose to produce neoagarohexaose and neoagarotetraose. In addition, zymogram analysis confirmed that *Persicobacter* sp. DH-3 produces at least three agar-degrading enzymes with molecular weights of 45, 70, and 140 kDa. Therefore, it is expected that agarases from *Persicobacter* sp. DH-3 could be used to produce functional neoagarooligosaccharides.

**Key words** : Agar-degrading bacterium,  $\beta$ -agarase, neoagarooligosaccharides, *Persicobacter* sp. DH-3, zymogram

### 서론

한천은 홍조류인 꼬시래기, 우뚝가사리 및 석무 등의 세포벽을 구성하는 성분이며, agarose와 agaropectin으로 구성되어 있다[7]. 한천은 의약품, 식품, 향장품산업 등에 이용되어 왔으며 미생물 배지와 분자생물학 실험에서도 사용되어 왔다. 국내에서는 생산량이 수 천 톤에 달하지만 일부만 사용되고 대부분의 한천은 방치되고 있다[7, 11]. 방치되고 있는 한천을 이용하여 고부가가치 물질을 생산하면 생산 어민의 소득증대와 수산 경제 발전향상에 이바지할 수 있을 것이다. 한편 한천의 분해로 생성되는 올리고당은 생리활성이 높아 화장품, 의약품, 식품생산에 사용되고 있고 보습, 미백, 세균의 성장 억제와 대식세포 활성화와 같은 유용한 기능을 나타낸다[5, 11]. 한천유래 올리고당을 생산하기 위한 2가지 방법으로 산가수분해법과 효소가수분해법이 있다. 산가수분해법은 반응 후 부

산물이 형성되거나, 중화과정을 거쳐야 하여 시간이 많이 들고 올리고당의 기능성과 안정성이 떨어진다. 효소가수분해법은 효소가 다당체의 특정부위에 특이적으로 작용하여 한천을 선택적으로 분해해서 한천올리고당을 쉽게 생산할 수 있다[10]. Agarase는 agarose를 분해하는 효소로서  $\beta$ -agarase와  $\alpha$ -agarase가 있다[4, 5, 11].  $\beta$ -Agarase와  $\alpha$ -agarase의 분해산물의 기능성은 면역증진, 항산화, 항균, 미백 및 보습 등의 생리활성이 있어, 한천분해효소로 고부가가치의 기능성 제품을 생산할 수 있다.  $\beta$ -Agarase는 agar나 agarose를 분해하여 neoagarobiose, neoagarotetraose 및 neoagarohexaose 등의 네오한천올리고당(neoagarooligosaccharides)을 생산할 수 있으며,  $\alpha$ -agarase는 agaropentose 및 agarotriose 등의 한천올리고당(agarooligosaccharides)을 생산할 수 있다. 따라서 한천분해효소를 생산하는 균주의 분리와 특성에 대한 연구들이 많이 이루어지고 있는데 *Maribacter* sp. SH-1 [7], *Thalassomonas* sp. SL-5 [9], *Glaciecola* sp. SL-12 [10], *Alteromonas nucleodii* subsp. GNUM08120 [1], *Agarivorans* sp. JA-1 [8], *Marinomonas* sp. SH-2 [5], *Simiduia* sp. SH-1 [11] 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 한천분해능을 가진 보고되지 않은 새로운 해양세균을 국내연안에서 분리하여 동정하였으며, 분리한 세균이 생산하는 한천분해효소의 특성을 검토하여 산업적으로 이용될 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

#### \*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.

## 재료 및 방법

### 한천분해 균주의 분리 및 동정

새로운 agarase를 생산하는 균주를 얻기 위해 전라남도 여수 연안의 해수를 시료액으로 사용했으며, 시료액을 멸균된 증류수로 희석하여 Marine broth 2216 (Difco, Detroit, USA) 고체배지에 도말하여 27°C에서 배양하였다. 멸균한 백금이를 사용해 Marine broth 2216 고체배지에 함몰을 나타내는 군체 (colony)를 새로운 Marine broth 2216 고체배지에 순수분리하여 한천분해활성을 가지는 균주를 선별하였고, 이 균주를 DH-3 균주로 명명하였다. DH-3 균주를 동정하기 위해 16S rDNA 염기서열을 분석하였다. 분석한 염기서열은 NCBI의 Blast 검색하여 다른 균주와의 유사도를 확인하여 균주 동정에 사용하였으며, Clustal 프로그램(ClustalW2)을 통해 다중염기 배열(multiple alignment)을 실시하고 MEGA 7.0.26 프로그램의 Neighbor-joining method와 bootstrap method (n=1,000)로 분석한 후 계통분류학적 위치를 파악하였다.

### 배양시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성 측정

Marine broth 2216 배지 4 ml에 순수분리한 DH-3 균주를 접종한 후 27°C, 250 rpm에서 하루 동안 진탕배양한 후, 0.2% (w/v) agar가 첨가된 Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 삼각플라스크에 배양액을 접종하고 27°C, 250 rpm에서 7일 동안 진탕배양하였다. 진탕배양하면서 24시간 마다 배양액의 일부를 채취하여 시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성 측정에 이용하였다. 균주의 생육 현황은 흡광도 600 nm에서 측정된 광학밀도로 결정하였다. 효소활성은 아래의 '효소활성 측정'에 따라 측정하였다.

### 효소액의 제조

Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 삼각플라스크에 순수분리한 DH-3 균주를 접종한 후 진탕배양기에서 27°C, 250 rpm의 조건으로 4일간 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여(3,000×g, 30분, 4°C)하여 균체를 제거하고 상층액을 Membrane filter (0.45 μm, Millipore, USA)로 여과시켰다. 여과액을 Snakeskin dialysis tube (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에 넣은 후 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액에 담그고 4°C 냉장고에서 교반기를 이용해 2시간씩 2번 처리하고, 마지막은 12시간 동안 교반한 후 효소액으로 사용하였다.

### 효소활성 측정

한천분해효소의 활성측정은 DNS법을 사용해 측정하였다 [6]. DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변형법으로 환원당을 측정하는 방법이며, DNS 시약은 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

녹여 제조하였다. 효소액 0.5 ml와 기질용액 1 ml를 혼합한 후에 30분 동안 반응시켰다. 반응을 마친 후에 DNS 시약 3.0 ml와 반응액 1 ml를 혼합해서 100°C에서 10분간 끓이고 충분히 식힌 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1 μmole의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit로 정의하였고 galactose를 이용해 표준적정곡선을 작성하였다.

### 반응온도에 따른 한천분해 효소의 활성측정

표준기질용액으로 0.2% (w/v)의 한천을 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 효소액 0.5 ml와 표준기질용액 1 ml를 혼합하여 20, 30, 40, 50, 60, 70°C의 온도에서 효소액의 활성을 측정하였다.

### pH에 따른 한천분해 효소의 활성측정

한천분해효소의 pH에 따른 활성을 측정하기 위해 0.2% (w/v)의 한천을 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 5.0-8.0) 및 20 mM GTA (pH 8.0-9.0) 완충용액을 사용하여 50°C에서 각 pH에 따른 효소활성을 측정하였다.

### 한천분해 효소의 열안정성 측정

효소액 0.5 ml를 20, 30, 40, 50, 60, 70°C에서 각 0.5, 1, 1.5, 2시간 열처리한 후, 표준기질용액 1 ml와 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시켰으며, 열처리하지 않은 효소액의 활성과 비교하였다.

### 한천분해효소의 zymogram

효소액에 포함되어 있는 agarase의 분자량을 확인하기 위해 0.1% agarose (LMP, Promega, USA)를 포함하는 12.5% (w/v) polyacrylamide gel에서 SDS-PAGE를 수행하였다. 효소액의 전기영동이 끝난 후에 SDS를 제거하기 위하여 0.1% (v/v) Triton X-100에 1시간 동안 방치하였다. 그 후 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) 완충용액으로 15분씩 3회 세척하고 50°C에서 20 mM Tris-HCl (pH 7.2) 완충용액에 겔을 넣어 하룻밤 동안 agarose를 분해하도록 하였다. 반응이 끝난 후 루골용액 (Lugol's solution)을 겔에 분사하여 agarase 활성을 나타내는 단백질들의 위치를 확인하였다.

### 한천가수분해산물의 thin layer chromatography (TLC) 분석

효소액을 이용하여 한천의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 표준기질용액 1 ml에 효소액 0.5 ml를 혼합하여 50°C에서 5, 10, 15, 20, 25, 30분간 반응시킨 후 Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석하였다. n-Butanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O (2/1/1 (v/v/v)) 용액을 이용해 전개시켰으며, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 가시화시켰다. 표준물질로는 D-galactose (ACROS,

USA) 및 neogargarooligosaccharide [4]를 사용하였다.

### 결과 및 고찰

#### 한천분해균주의 분리 및 동정

Marine broth 2216 고체배지에서 한천을 분해하는 균주를 선별하였다. 분리된 균주의 16S rDNA 염기서열을 비교한 결과, *Persicobacter* sp. CCB-QB2 [2] 및 *Persicobacter psychrovioidus* NBRC 101262와 98%의 높은 유사성을 나타내었다. 따라서 분리한 균주를 *Persicobacteraceae*과(Family)의 *Persicobacter* 속(Genus) 균주에 속하는 *Persicobacter* sp. DH-3으로 명명하였다. 분리한 DH-3 균주의 다른 균주들과의 계통분류학적 관계를 Fig. 1에 나타내었다.

#### 배양시간에 따른 한천분해 균주의 효소활성과 성장 측정

균주의 성장에 따른 한천분해효소의 활성을 Fig. 2에 나타내었다. 배양시간별 생장은 1일째에 가장 높았으며 2일째는

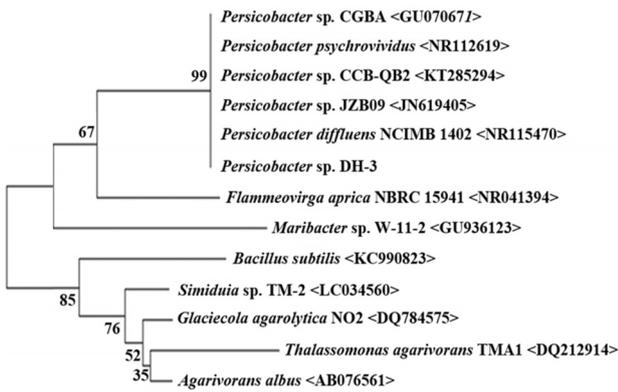


Fig. 1. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing strain DH-3 with other bacteria. The numbers at the branch are bootstrap values and numbers in parenthesis are accession numbers at NCBI.

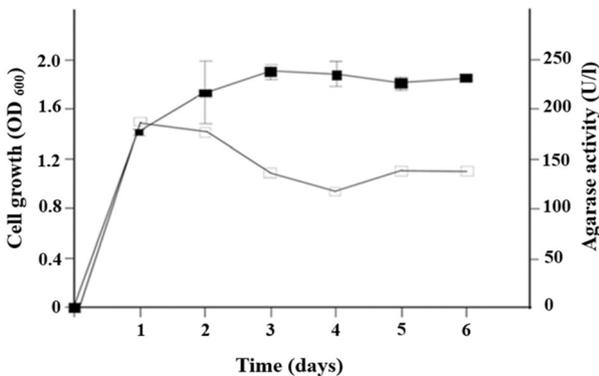


Fig. 2. The growth curve (□) of *Persicobacter* sp. DH-3 and the production of agarase (■) in the presence of 0.2% (w/v) agar. The highest level of agarase was reached at the period of lag phase.

생장곡선의 정체기로 판단되었고 3일째 이후는 생장이 감소하였다. *Persicobacter* sp. CCB-QB2 [2] 균주는 0.2%(w/v) agarose가 포함된 인공해수배지에서 30°C, 200 rpm 조건으로 배양하면 56시간 안에 2단계 성장(diauxic growth) 양상을 보였는데 [10] 본 균주는 27°C, 250 rpm 조건으로 Marine broth 2216 배지에서 6일까지 1단계 성장을 보였다. 온도와 진탕조건은 크게 차이가 없으므로 이러한 성장양상의 차이는 균주 혹은 배지 그리고 시료채취간격의 차이에 의한 결과로 판단된다. 본 연구에서는 시료채취간격이 24시간이지만 *Persicobacter* sp. CCB-QB2 [2]균주는 2.5시간이었다. *Persicobacter* sp. DH-3의 한천분해 활성은 1일째보다 2일째가 높았으며, 2일째부터 6일째까지는 오차범위 내에서 비슷하였다. 한천분해 효소의 활성은 균주 성장곡선의 정체기까지 증가되는 것으로 판단되었다.

*Persicobacter* sp. CCB-QB2 [2] 균주는 배지에 0.5% (w/v) tryptone이 존재할 때에는 한천의 존재유무와 상관없이 agarase 활성이 생장에 비례하는 양상을 보였고, 배지에 0.05% (w/v) tryptone이 존재할 때에는 한천이 없으면 agarase 활성이 거의 없었다. 본 연구에 사용된 Marine broth 2216 배지에는 peptone이 0.5% (w/v), yeast extract가 0.1% (w/v) 함유되어 있고 나머지는 무기이온들로 구성되어 있다. 본 연구에서 한천분해효소의 활성이 성장곡선과 비례하는 양상을 보인 것은 세균생장의 단백질원으로 사용되는 peptone과 yeast extract의 전체농도가 *Persicobacter* sp. CCB-QB2 [2] 균주 배양의 0.5% (w/v) tryptone과 비슷한 농도로 들어있어 나타났을 가능성도 있었다. 이 후 4일간 배양한 배양액으로 효소액을 제조하고 실험에 사용하였다.

#### 한천분해효소의 온도별 활성

*Persicobacter* sp. DH-3의 효소액의 온도별 상대활성을 Fig. 3에 나타내었다. 효소액이 한천분해 최적활성을 보이는 온도

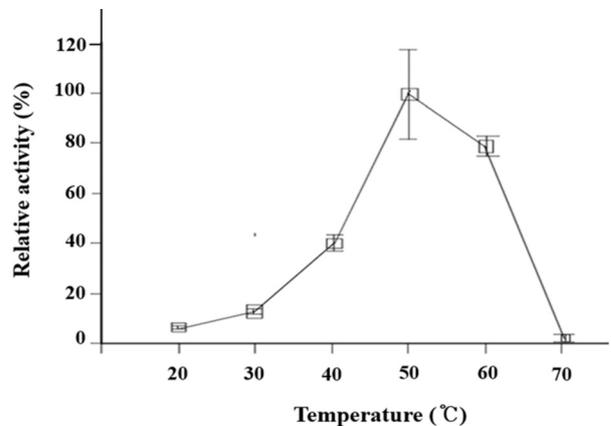


Fig. 3. Effects of reaction temperatures on agarase activities. The reactions were carried out at 20, 30, 40, 50, 60 and 70°C in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min.

는 50°C이었고, 50°C에서의 활성을 100%로 하였을 때, 60°C에서도 90%의 상대활성을 보였으므로 비교적 높은 온도에서 최적활성을 보이는 agarase로 판단되었다. 다른 균주의 한천분해효소의 최적 온도는 *Maribacter* sp. SH-1 [7]가 50°C로 *Persicobacter* sp. DH-3와 같았다. *Simidiuia* sp. SH-1 [11]은 30°C, *Agarivorans* sp. JA-1 [8]은 40°C, *Simidiuia* sp. SH-4 [6]는 30°C, *Thalassomonas* sp. SL-5 [9]는 40°C, *Alteromonas macleodii* subsp. GNUM08120 [1]는 40°C, *Marinomonas* sp. SH-2 [5]는 30°C, *Glaciecola* sp. SL-12 [10]는 30°C이었다. 이들 균주들에 비해 *Persicobacter* sp. DH-3가 생산하는 한천분해효소의 최적 활성 온도가 높은 것을 알 수 있었다.

**최적온도에서의 pH별 한천분해효소의 활성**

한천분해효소의 각 pH에서의 상대활성을 Fig. 4에 나타내었다. 사용한 완충용액과 pH 중 최고 활성을 나타낸 것은 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액으로 나타났다. 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액에서의 활성을 100%로 하였을 때, pH 5, 7, 8에서도 75% 이상의 활성을 보였다. pH 6에서 최적활성을 나타내는 한천분해효소를 생성하는 균주는 *Maribacter* sp. SH-1 [7], *Simidiuia* sp. SH-4 [6], *Marinomonas* sp. SH-2 [5] 등이었고, pH 7에서 최적활성을 나타내는 균주는 *Simidiuia* sp. SH-1 [11], *Glaciecola* sp. SL-12 [10], *Thalassomonas* sp. SL-5 [9], *Alteromonas macleodii* subsp. GNUM08120 [1] 등이었으며, *Agarivorans* sp. JA-1 [8]은 pH 8.04에서 최적활성을 나타내었으므로 균주의 종류에 따라서 생산하는 한천분해효소의 최적 pH가 차이를 보이는 것을 알 수 있었다.

**한천분해효소의 열안정성**

효소액을 각 온도에서 일정시간 동안 열처리한 후의 잔존활성을 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 열처리하지 않은 효

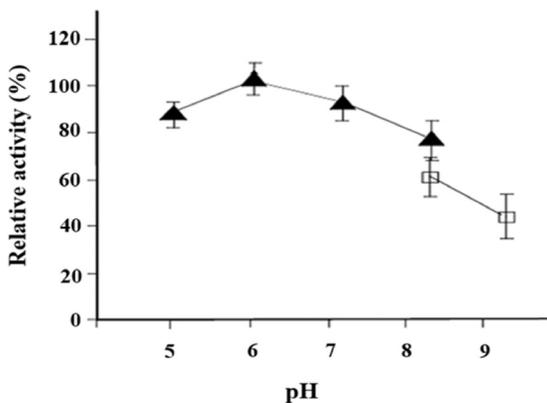


Fig. 4. Effects of pHs on the agarase activities. 20 mM Tris-HCl buffer (pH 5.0-8.0) and GTA buffer (pH 8.0-9.0) were used. The reactions were carried out at 50°C in 1 ml of corresponding buffer and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min.

소액의 활성을 100%로 하였을 때 50°C 이상에서는 0.5, 1, 1.5, 2시간 동안 열처리하였을 때에는 20% 이하의 잔존활성을 나타내었다. 20과 30°C에는 2시간 이상 노출되어도 80% 이상의 잔존활성을 유지하였고, 40°C에서는 1.5시간 이후에도 80% 정도의 잔존활성이 관찰되었다. 50°C 이상의 온도에서는 30분간 열처리하면 활성을 현저히 잃어버리므로 *Persicobacter* sp. DH-3의 한천분해효소는 내열성을 가지고 있지 않은 것을 확인할 수 있었다. 다른 균주의 한천분해효소의 열안정성은 *Simidiuia* sp. SH-1 [11]은 40°C에서 0.5, 1, 1.5, 2시간 동안 열처리하였을 때에는 약 20%의 상대활성을 유지하였으며, 50°C에서 30분간 처리했을 때에는 10% 미만의 상대활성을 보였다. *Simidiuia* sp. SH-4 [6]는 20-30°C에서 1.5시간 동안 열처리하였을 때에는 80% 이상의 활성을 보였고, 40°C 이상에서는 열처리 0.5시간 이내에 활성을 잃어버렸다. *Alteromonas* sp. SH-1 [12]는 40 및 50°C에서 1시간 동안 열처리한 후에는 40%의 상대활성을 나타내었다. *Maribacter* sp. SH-1 [7]은 열처리하지 않은 효소에 비해 20, 30, 40°C에서 30분간 열처리하였을 때에는 90%의 상대활성을 유지하였고, 50°C에서는 30분간 열처리하였을 때에도 열처리하지 않은 효소활성에 비해 50% 이상의 상대활성을 보였다. *Marinomonas* sp. SH-2 [5]는 40°C 이상의 온도에서 30분간 열처리하였을 때에는 상대활성이 50% 이하로 감소하는 것으로 보고되었다.

**Zymogram을 통한 한천분해효소의 단백질 크기 분석**

*Persicobacter* sp. DH-3의 한천분해효소 분자량을 Fig. 6에 나타내었다. 0.1% (w/v) agarose를 포함한 12.5% (w/v) polyacrylamide gel에서 전기영동하여 140 kDa, 70 kDa, 45 kDa의

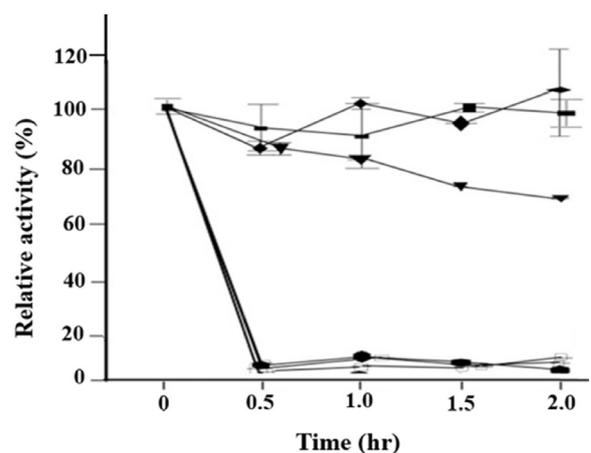


Fig. 5. Remaining activities of agarase after heat treatments for defined times. The enzyme solutions were pre-incubated at 20 (■), 30 (◆), 40 (▼), 50 (●), 60 (○) and 70°C (□) for 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 hr. The reactions were then carried out at 50°C in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.5 ml of heat-treated enzyme solution for 30 min.

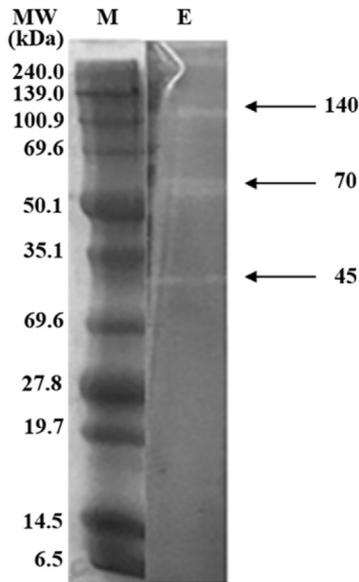


Fig. 6. Zymogram analysis of agarases. The molecular masses of the enzymes were 45, 70 and 140 kDa. (Lane M size markers; lane E, agarases).

분자량을 나타내는 3개의 한천분해효소가 확인되었다. *Persicobacter* sp. JZB09 [3]에서는 45 kDa와 70 kDa의 한천분해효소가 확인되었으며, *Persicobacter* sp. CCB-QB2 [2]에서는 분자량은 보고되지 않았지만 4개의 agarase가 확인되었다. 본 연구의 *Persicobacter* sp. DH-3는 *Persicobacter* sp. JZB09 [3]와 동일한 분자량의 한천분해효소 이외에 140 kDa의 한천분해효소가 추가로 확인되었다(Fig. 6).

한천가수분해산물의 TLC분석

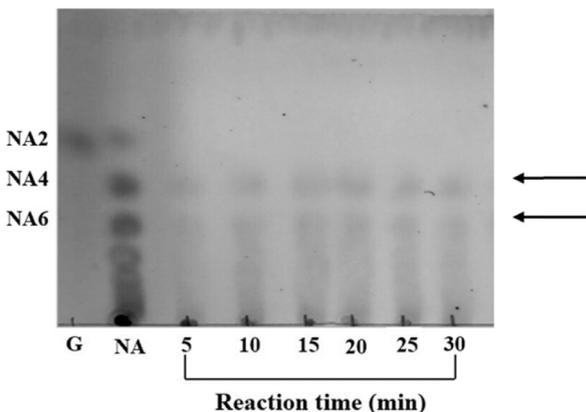


Fig. 7. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 50°C in Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% (w/v) agar and 0.5 ml of enzyme solution for 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min. The reaction mixtures were developed by TLC. (G, D-galactose; NA, neoagarooligosaccharides; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose).

효소액의 기질로 agarose를 사용하였을 때 최적조건에서 생산하는 가수분해산물을 처리 시간별로 채취하여 TLC로 분석한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. *Persicobacter* sp. DH-3가 생산하는 한천분해효소는 반응 5분 후부터 neoagarohexaose (NA6)와 neoagarotetraose (NA4)를 생성하는 것으로 나타났다. 반응시간을 12시간 이상 늘려도 NA4와 NA6만 생성되고 neoagarobiose (NA2)는 생성되지 않았다(data not shown). β-Agarase는 agarose를 분해하여 neoagarohexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose 등의 neoagarooligosaccharides를 생성할 수 있으며 α-agarase는 agaropentose 및 agarotriose 등의 agarooligosaccharides를 생산할 수 있다[3, 8, 11]. *Persicobacter* sp. DH-3의 한천분해효소는 neoagarohexaose와 neoagarotetraose를 생산하는 것으로 보아 β-agarase임을 알 수 있었다. *Persicobacter* sp. CCB-QB2 [2]와 *Persicobacter* sp. JZB09 [3]도 본 연구와 같이 β-agarase를 생산하는 것으로 보고되었다. β-Agarase를 생산하는 다른 균주들이 생산하는 neoagarooligosaccharides를 고찰하면 *Simidiua* sp. SH-1 [11]과 *Thalassomonas* sp. SL-5 [9], *Maribacter* sp. SH-1 [7]는 neoagarohexaose, neoagarotetraose, neoagarobiose를 생산한다. *Alteromonas macleodii* subsp. GNUM08120 [1]는 neoagarotetraose와 neoagarobiose를, *Glaciecola* sp. SL-12 [10]는 neoagarobiose를 *Agarivorans* sp. JA-1 [8]와 *Simidiua* sp. SH-4 [6], *Marinomonas* sp. SH-2 [5]는 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 생산한다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 BB21+사업에 의하여 지원되었음

References

1. 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.
2. Furusawa, G., Leu, N. S., Fuganthi, A. and Amirul, A. A. 2017. Agarolytic bacterium *Persicobacter* sp. CCB-QB2 exhibited a diauxic growth involving galactose utilization pathway. *Microbiologyopen* **6**, e00405.
3. Han, W., Liu, S. Z., Liu, H., Wu, Z., Gu, Q. and Li, Y. 2012. Isolation identification and agarose degradation of a polysaccharide-degrading marine bacterium *Persicobacter* sp. JZB09. *Acta Microbiol. Sin.* **52**, 776-783.
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. Jo, J. G., Lee, S. J., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2016. Characteri-

- zation of agarase produced from the isolated marine bacterium *Marinomonas* sp. SH-2. *J. Life Sci.* **26**, 198-203.
6. Kim, J. D., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2018. Cloning, expression, and characterization of a thermotolerant  $\beta$ -agarase from *Simiduia* sp. SH-4. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **23**, 525-531.
  7. 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.
  8. 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  $\beta$ -agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 in *Bacillus subtilis* and the whitening effect of its product. *Biotechnol. Lett.* **30**, 911-918.
  9. 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  $\beta$ -agarase. *J. Life Sci.* **17**, 70-75.
  10. 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  $\beta$ -agarase. *J. Life Sci.* **18**, 58-62.
  11. 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.
  12. Lee, S. J., Shin, D. Y., Kim, J. D., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2016. Characterization of  $\alpha$ -agarase from *Alteromonas* sp. SH-1. *Kor. Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **31**, 113-119.

### 초록 : Agarase를 생산하는 *Persicobacter* sp. DH-3의 분리 및 $\beta$ -agarase의 특성

허다혜<sup>1</sup> · 이동근<sup>2</sup> · 이상현<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>신라대학교 일반대학원 그린화학융합공학과, <sup>2</sup>신라대학교 제약공학과)

이 연구의 목적은 agarase를 생산하는 새로운 해양 박테리아를 분리하는 것이다. Agarase는 agarose를 가수분해하여 다양한 생리활성을 가지는 agarooligosaccharides 또는 neoagarooligosaccharides를 생성할 수 있다. 전라남도의 여수연안에서 채취한 해수로부터 DH-3 균주를 분리하였다. DH-3 균주는 16S rDNA 서열분석을 통하여 *Persicobacter* sp. DH-3로 명명하였다. 세포 외로 분비된 효소는 *Persicobacter* sp. DH-3의 배양액으로부터 얻었으며, 특성연구에 사용하였다. 20, 30, 40, 50, 60 및 70°C에서의 온도별 상대활성은 각각 50, 55, 70, 100, 90 및 50%였다. pH 5, 6, 7 및 8에서의 pH별 상대활성은 각각 75, 100, 90, 75%였다. 본 효소는 20 mM Tris-HCl 완충액에서 pH 6.0 및 50°C에서 최대활성을 나타내었다. 본 효소는 한천이 액체상태로 존재하는 50°C에서 최대활성을 나타내었으므로 산업적으로 유용한 효소로 판단된다. 본 효소는 20, 30 및 40°C에서 2시간 동안 열처리하여도 80% 이상의 잔존활성을 보였다. TLC 분석결과, *Persicobacter* sp. DH-3 균주의 한천분해효소는 네오한천올리고당인 neo-agarohexaose와 neoagarotetraose를 생성하였으므로  $\beta$ -agarase로 확인되었다. Zymogram 분석결과, *Persicobacter* sp. DH-3는 적어도 45, 70 및 140 kDa 크기의 3종류 이상의 한천분해효소를 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로, *Persicobacter* sp. DH-3 유래 agarase는 기능성을 가진 neoagarooligosaccharides의 생산에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.