

Isolation of a *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 Producing Agarase and Characterization of its Agarase

Dong-Geun Lee¹, Ju-Hui Kim² and Sang-Hyeon Lee^{1,2*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958 Korea

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

Received January 20, 2021 / Revised February 26, 2021 / Accepted March 2, 2021

In this study, the marine agar-degrading bacterium *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 was isolated, and its growth and agarase properties were investigated. Seawater was collected from the offshore of the Yonggung Temple in Busan, and agar-degrading bacteria were isolated and cultured with marine agar medium. The bacterium *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 was isolated through 16S rRNA gene sequencing. The extracellularly secreted enzyme was obtained from the culture broth of *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 and was used to characterize its agarase. The extracellular agarase exhibited a maximum activity of 116.6 U/l at 50°C and pH 6.0 of 20 mM Tris-HCl buffer. Relative activities were 31, 59, 94, 100, 45, and 31% at 20, 30, 40, 50, 60, and 70°C, respectively. Relative activities were 49, 85, 100, 86, 81, and 67% at pH 4, 5, 6, 7, 8, and 9, respectively. Residual activity was more than 85% after exposure at 20, 30, and 40°C for 2 hr, and more than 82% after exposure at 50°C for 2 hr. Zymogram analysis confirmed that *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 produced at least two agarases of 55 and 97 kDa. As the products of α -agarase and β -agarase have antioxidation, antitumor, skin-whitening, macrophage activation, and prebiotic effects, further studies are needed on the agarase of *Pseudoalteromonas* sp. JH-1.

Key words : Agarase, agar-degrading bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. JH-1, zymogram

서 론

우리나라는 삼면이 해안으로 둘러싸여 있는 환경 조건으로 해양 미생물의 개발에 높은 잠재성을 지니고 있다. 한천(agar)은 거대 홍조류에서 추출한 점질의 다당류로 저온의 물에는 용해가 되지 않고 85°C 이상에서 용해하여 점조한 액체가 되고, 32~39°C 이하에서는 점조한 액체가 응고하는 성질을 갖는 물질로[7] 우리나라에서는 우뚝가사리나 꼬시래기를 주원료로 하여 제조된다[6].

해양수산부의 통계연감에 의하면 한천의 국내 연간 생산량은 2018년 현재 259톤이며[21] 우뚝가사리나 꼬시래기 등의 한천생산 원료는 90% 가량이 방치되어 그 이용량은 10%에도 못 미치고 있다[13]. 한천을 원료로 생산되는 시약용 제품이나 의약품 등의 고가 제품은 대개 수입에 의존하고 있기에 우리나라 연안의 풍부한 수산자원인 한천을 이용하는 고부가가치 산업에 대한 연구가 필요한 실정이다[10].

응고력이 센 한천 용액은 용융점과 친수성이 높아서 수분을 흡수하여 겔화하는 능력이 크며 잘 부패하지 않는다. 겔화 능

력으로 아이스크림 젤리, 양갱, 잼 등의 식품 가공에 이용되고 있으며, 분해가 잘되지 않는 성질과 강한 응고력으로 세균배양용 배지성분으로도 사용되고 있다[14, 18]. 또한, 탄수화물이 주성분인 한천은 소화, 흡수가 잘되지 않는 특성으로 저칼로리 식품 및 다이어트 식품의 원료로 각광받으며[2] 변비, 당뇨병, 비만 치료에도 쓰인다. 가공된 한천은 분자생물학 실험에서도 널리 사용되고 있다[15].

한천은 홍조류의 세포벽 성분에서 유래하며 구성성분은 중성 다당류인 agarose 70%와 산성 다당류인 agaropectin 30%로 구성되어 있다[4].

한천분해로 올리고당과 갈락토스를 얻을 수 있는데 갈락토스를 기질로 하여 효모를 이용한 바이오 에탄올 획득이 목질계 cellulose를 이용하는 것 보다 쉬워 주목받고 있다[12]. 한천 올리고당의 생산방법은 산가수분해법과 효소가수분해법으로 나눌 수 있다. 산가수분해법은 부산물 형성과 중화과정을 거치는 등으로 오랜 시간이 필요하고[11] 무엇보다 올리고당의 기능성과 안정성이 낮은 단점이 있다. 이에 반해 효소가수분해법은 한천올리고당을 쉽게 생산할 수 있는데, 한천분해효소가 다당체의 특정부위에 특이적으로 작용하기 때문이다[15].

Agarose는 β -galactose와 3,6-anhydro- α -L-galactose로 구성된 중성 고분자이다[9]. Agarose를 분해하는 agarase는 β -agarase와 α -agarase가 있다. 한천을 원료로 α -agarase를 이용하여 생산되는 한천올리고당은 항산화 및 항암 활성 등이 있고, β -agarase를 이용하여 생산되는 네오한천올리고당은 미백, 대식세포 활성화, 장내세균 활성화, 활성산소종으로부터

*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.

간 보호 효과 등이 있다[15]. 이에 agarase를 생산하는 *Agarivorans* 속[16], *Alteromonas* 속[20], *Flammeovirga* 속[8], *Glaciicola* 속[18], *Marinomonas* 속[10], *Simiduia* 속[13], *Thalassomonas* 속[17], *Vibrio* 속[3] 등의 다양한 균주들이 보고되고 있다.

본 연구에서는 새로운 한천 분해효소 개발을 위하여 부산광역시 기장군 기장읍 해동용궁사 해안의 해수를 채취하고, 한천분해세균을 채취한 시료에서 분리하고 동정하였다. 또한 분리한 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1의 생육특성과 균주가 생산하는 agarase의 특성을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

한천분해 균주 분리 및 동정

부산광역시 기장군 기장읍 해동용궁사의 해수를 시료로 채취하였으며, 채취한 시료액을 멸균 증류수로 희석한 후 Marine broth (Conda S.A., Madrid, Spain)에 한천을 첨가한 고체 배지에 도말하여 30°C에서 배양하였다.

배양한 후에 한천 고체배지를 함몰시키는 균주들을 선택하여 각각의 Marine agar 배지에 재배양한 후 함몰 상태가 깊게 활성을 나타내는 균주 2종을 선발하였다. Wizard Genomic DNA isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 순수분리된 균체로부터 genomic DNA를 획득하고, PCR로 16S rRNA 유전자 단편을 증폭하였다. PCR primer로는 1492R (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')와 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')를 사용하였으며, PCR/Gel Combo Kit (NucleoGen, Siheung, Korea)을 이용하여 증폭된 DNA 단편을 정제하였다. DNA 염기서열 분석은 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에서 수행하였다.

분석된 염기서열은 NCBI의 BLAST로 타 균주들과의 유사도를 검토하여 균주 동정에 이용하였다. Clustal (ClustalW2) 프로그램을 통하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행하고 MEGA 프로그램의 Neighbor-joining method와 bootstrap method (n=1,000)로 계통분류학적 위치를 파악하였다.

배양시간에 따른 한천분해 균주 생육과 효소활성

Marine broth 4 ml에 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1를 접종한 후 250 rpm, 30°C에서 1일간 진탕배양하였다. 이후 agarose 0.2% (w/v)가 첨가된 Marine 액체배지 50 ml을 가진 삼각플라스크에 4 ml를 접종하고, 진탕배양기(250 rpm, 30°C)에서 5일간 배양하였다. 진탕배양 기간 중 매 24시간 마다 배양액의 일부를 채취하여 배양시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 한천분해 효소활성을 측정하였다. 균주의 생육은 분광광도계로 600 nm에서 측정하였다.

조효소액의 제조

Marine broth 4 ml에 접종하여 1일간 진탕배양(30°C, 250

rpm)하고, 0.2% (w/v) agarose가 포함된 Marine broth 50 ml에 접종 후 shaking incubator에서 30°C, 250 rpm 조건으로 1일간 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리(3,000 x g, 15 min, 4°C)하여 균체를 제거하고 상층액을 Membrane filter (Millipore, 0.45 µm, USA)로 여과시켰다. Snakeskin dialysis tubing (Thermo Fisher Scientific, USA)에 여과액을 투입 후, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액 1 l에 넣고 4°C에서 교반기를 이용하여 2시간 동안 1차 투석을 수행하였다. 2시간이 경과한 후 동일한 완충용액으로 교체하여 2시간 동안 2차 투석을 수행하였다. 동일한 완충용액으로 교환하여 12시간 이상 3차 투석을 수행하였다.

효소활성 측정

효소활성 측정을 위해서 표준기질용액으로 0.2% (w/v) agarose가 투입된 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 6.0)을 이용하였다. 효소활성은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 측정하였다[24]. DNS 용액의 제조과정은 증류수 1 l에 3,5-dinitrosalicylic acid 7.07 g, NaOH 13.2 g, phenol 5.01g, sodium sulfate 5.54 g, potassium tartrate (Rochelle salt) 204 g을 용해하였다. 효소용액 0.5 ml와 표준기질용액 1 ml를 혼합한 후 50°C 온도에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. DNS 용액 3 ml와 반응액 1 ml를 혼합하고 100°C에서 10분간 가열하였다. 이후, 약 5분간 냉각한 후 분광광도계(Spectrophotometer, X-ma 3000, Korea)를 이용하여 흡광도를 550 nm에서 측정하였다. D-galactose를 표준적정곡선으로 사용하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1 µM의 galactose를 생산하는 한천분해 효소의 양을 1 unit (U)으로 나타내었다.

반응온도에 따른 한천분해효소의 활성 측정

반응온도에 따른 agarase의 활성을 측정하기 위하여 조효소액 0.5 ml에 표준기질용액 1 ml를 혼합하여 20, 30, 40, 50, 60, 70°C의 각각의 온도에서 효소활성을 측정하였다.

pH에 따른 한천분해효소의 활성 측정

pH에 따른 agarase의 활성을 측정하기 위하여 0.2% (w/v)의 agarose를 포함하는 20 mM sodium acetate 완충액(pH 4.0 5.0), Tris-HCl 20 mM 완충액(pH 5.0 6.0 7.0 8.0), 20 mM GTA (3,3-dimethylglutaric acid, Tris hydroxymethyl/ aminomethan, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) 완충액(pH 8.0, 9.0)을 사용하여 50°C에서 효소활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 열안정성 측정

효소의 열안정성을 측정하기 위해 20, 30, 40, 50, 60, 70°C에 2시간 동안 노출시키면서 0.5, 1.0, 1.5, 2.0시간이 되었을 때 각각 효소의 활성을 측정하였다. 각 온도에 노출된 조효소액의 활성은 열처리하지 않은 조효소액의 활성과 비교하였다.

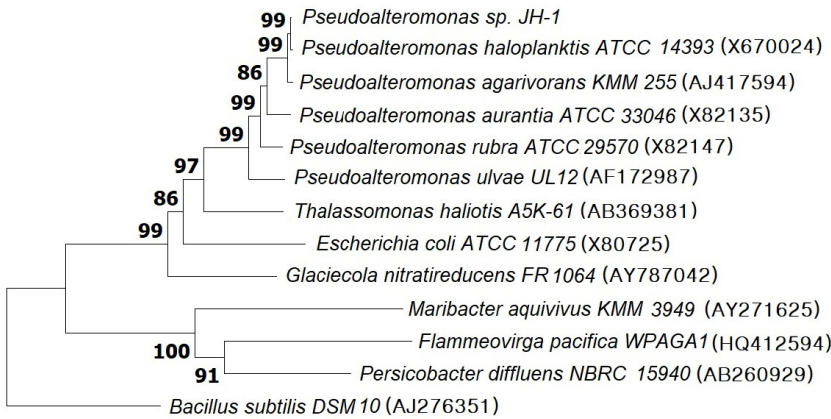


Fig. 1. Phylogenetic position of *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 based on almost complete 16S rDNA sequence. The number of branch nodes is a percentage of the bootstrap value, and the number after the strain name is the NCBI's registration number.

한천분해효소의 Zymogram

조효소액에 포함된 agarase의 분자량을 확인하기 위하여 0.1% (w/v) agarose (LMP, Promega, USA)를 포함하는 12.5% (w/v) polyacrylamide gel에서 zymogram을 수행하였다. SDS-PAGE가 끝난 후 효소액의 SDS를 제거하기 위하여 0.1% (w/v) Triton X-100 용액에 30분 동안 방치하였으며, size marker 부분은 Gelcode blue stain (# 24590, Pierce, USA)으로 염색시켰다. Zymogram 부분은 Tris-HCl 20 mM 완충용액(pH 7.0)으로 20분씩 3회 세척하고 50℃에서 Tris-HCl 20 mM 완충용액(pH 7.0)에 겔을 넣어 다음 날까지 agarose를 분해하도록 하였다. 반응 이후 겔에 루골용액(Lugol's solution)을 분사하여 agarase의 위치를 확인하였다.

결과 및 고찰

한천분해균주 분리 및 동정

부산광역시 기장군 기장읍 해동용궁사 연안의 해수를 채취하여 Marine 한천배지에 도말 후 한천배지에 함몰을 나타내는 균을 선별하였다.

분리된 균주 JH-1의 분류학적 위치를 동정하기 위하여 16S rRNA의 유전자 단편을 PCR으로 증폭하였으며 14 kb의 염기서열을 분석하였다. 이후 BLAST를 이용하여 *Pseudoalteromonas* sp. K8 KT428728와의 99% 유사성을 밝혀냈다. 이를 토대로 균주 JH-1을 Podoviridae 과(Family)의 *Pseudoalteromonas* 속(Genus) 균주에 속하는 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1으로 명명하였다. 본 연구와 GenBank에서 구한 표준균주(type strain)들의 16S rDNA 염기서열들을 분석하여 본 균주의 계통분류학적 위치를 Fig. 1에 나타냈다.

배양시간에 따른 한천분해 균주 효소활성과 생장 측정

Agarose 0.2% (w/v)를 첨가한 50 ml의 Marine broth에 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 균주를 접종하여 30℃, 250 rpm으로 진탕배양하였다. 배양시간에 따른 균주의 생장과 효소 활성을 Fig. 2에 나타내었으며 매 24시간 마다 5일 동안 균체의

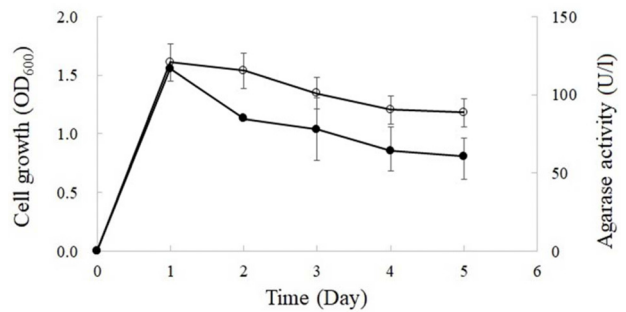


Fig. 2. Cell growths and agarase activities of *Pseudoalteromonas* sp. JH-1. (○ cell growth [OD₆₀₀], ● agarase activity [unit/l]).

생육과 agarase 활성도를 측정하였다. 접종 후 배양시간별 생장은 1일 차에 가장 높게 나타났었다. 2일째부터는 균주의 생육이 점차 저하되었다.

한천분해 활성도 세포의 생육처럼 1일 차에 116.6 unit/l의 최고 활성을 나타내었고, 이후 감소하는 경향을 보였다. 따라서, 이후의 실험에서는 본 균주를 1일간 배양한 시료를 사용하였다.

한천분해효소의 온도별 활성

Pseudoalteromonas sp. JH-1의 효소액의 온도별 상대활성을 Fig. 3에 나타내었다. 한천분해 최적활성을 보이는 온도는 50℃이었으며 50℃에서의 활성을 100%로 간주하였을 때, 20, 30, 40, 50, 60, 70℃에서의 반응온도에 따른 상대활성은 각각 31, 60, 94, 100, 45, 31%였다. 40과 50℃에서는 효소활성의 큰 차이는 없었지만 50과 60℃에서는 효소활성의 큰 차이가 있었다. 다른 균주들의 한천분해효소의 최적 온도는 *Maribacter* sp. SH-1 [14]가 50℃로 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1와 같았다. *Flammeovirga* sp. mbrc-1 [8]는 40℃가 최적 온도였으며 *Agarivorans* sp. JA-1 [16]와 *Thalassomonas* sp. SL-5 [17]는 40℃가 최적 온도였고 *Simidiua* sp. SH-4 [13], *Simidiua* sp. SH-1 [19], *Marinomonas* sp. SH-2 [10], *Glaciecola* sp. SL-12 [18]는 30℃에서 최적활성을 보였다. 이들 균주들에 비해 *Pseudoalteromonas*

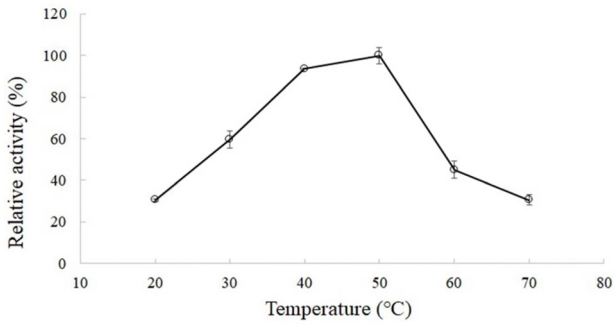


Fig. 3. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reaction was performed at 20, 30, 40, 50, 60, and 70 °C for 30 minutes with 1 ml of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 6.0, 0.2% (w/v) agarose) and 0.5 ml of the raw enzyme solution.

sp. JH-1가 생산하는 효소의 최적활성 온도는 40-50°C로 비교적 높은 온도에서 활성이 있는 효소임을 알 수 있었다. 본 연구와 동일한 *Pseudoalteromonas* 속 세균이 생산하는 한천분해효소의 최적온도는 35°C [21], 40°C [1, 25]가 보고되어 본 연구의 50°C와 차이를 보였다.

한천은 40°C 이상의 온도에서 겔(gel)이 아닌 졸(sol) 상태로 존재하며[6], 일반적으로 효소는 겔보다는 졸 상태에서 활성이 높다[23]. 따라서 50°C에서 최적의 활성을 나타내는 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1의 한천분해효소는 매우 유용할 수 있다.

pH별 한천분해효소의 활성

각 pH별 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 유래 한천분해효소의 상대활성은 Fig. 4로 나타내었다. 동일한 pH 5라도 완충용액의 종류에 따라 활성의 차이가 컸고, 동일한 pH 8에서는 완충용액의 종류에 따른 활성차이가 크지 않았다. 동일한 pH에서 높은 상대활성을 나타내는 것을 기준으로 하여 pH 4, 5, 6, 7, 8 및 9에서의 상대활성은 각각 49, 85, 100, 87, 81, 67%였다.

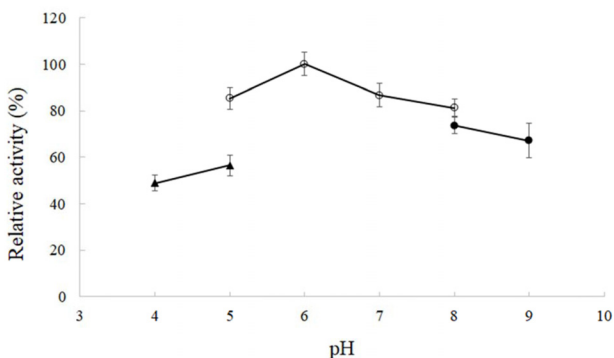


Fig. 4. Effects of pH on the agarase activities. Sodium acetate buffers (20 mM pH 4.0-5.0, ▲), Tris-HCl buffer (20 mM pH 5.0-8.0, ○) and GTA buffer (pH 8.0-9.0, ●) were used. Each buffer contained 0.2% (w/v) agarose. The reaction was carried out in 1 ml of buffer and 0.5 ml of raw enzyme solution for 30 minutes at 50 °C.

최고 활성을 나타낸 pH 6에서의 활성을 100%로 하면 pH 5.0 및 7.0에서는 85% 이상의 높은 활성을 보였다. 20 mM Tris-HCl 완충용액을 사용하면 pH 5.0~8.0 범위에서 80% 이상의 상대활성을 보여 향후의 응용과정에서 pH에 의해 효소활성의 변화가 크지 않을 것으로 생각되었다.

각 균주가 생산하는 한천분해효소의 최적 pH는 균주에 따라 다양한데 *Maribacter* sp. SH-4 [14]의 경우 pH 6.0, *Agarivorans* sp. JA-1 [16]의 경우 pH 8.0, *Flammeovirga* sp. mbrc-1 [8]와 *Simidiua* sp. SH-1 [14]의 경우 pH 7.0이었다. 본 연구와 동일한 *Pseudoalteromonas* 속 세균이 생산하는 한천분해효소의 최적 pH는 pH 7 [1, 22]과 pH 9 [25]가 보고되어 본 연구의 pH 6과 차이를 보였다.

한천분해효소의 열안정성

각 온도별로 일정 시간 동안 처리 후의 조효소액의 잔존활성을 측정하였으며 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 열처리하지 않은 조효소액의 활성을 100%로 설정하였을 때 20과 30°C에 0.5, 1, 1.5, 2시간 노출시킨 조효소액은 90% 이상의 잔존활성을 나타내었다. 40과 50°C에 2시간 노출시킨 조효소액은 82% 이상의 잔존활성을 유지하였다. 60과 70°C에서는 30분간 노출된 이후에는 한천분해활성이 사라지는 것으로 관찰되었다. 따라서 본 연구의 한천분해효소는 50°C 이하의 온도에서는 열안정성을 어느 정도 가지는 것으로 판단되었다.

다른 균주가 생산하는 한천분해효소의 열안정성을 보면 *Simidiua* sp. SH-1 [19]의 경우 40°C에 2시간 열처리 시 20% 가량의 잔존활성을 나타내었으며, 50°C에 30분간 노출 후에는 10% 미만의 활성을 나타내었다. *Marinomonas* sp. SH-2의 한천분해효소는 40°C 이상의 온도에서는 0.5시간 노출되어도 잔존활성이 50% 이하로 감소하였다[10]. *Thalassomonas* sp. SL-5의

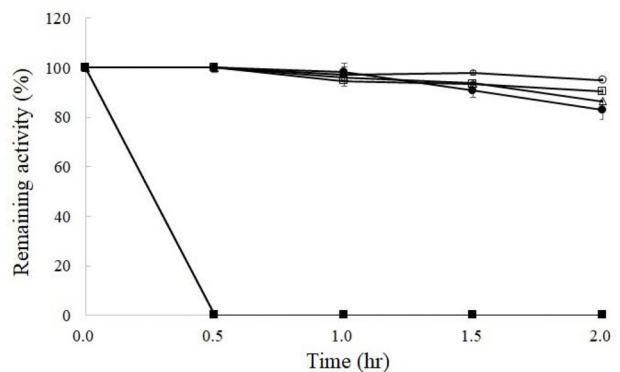


Fig. 5. Remaining activity of agarase after heat treatment. The live enzyme solution was pre-incubated at 20 (○), 30 (□), 40 (△), 50 (●), 60 (■) and 70°C (▲) for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reaction was carried out at 50°C for 30 minutes in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% (w/v) agarose and 0.5 ml of heat-treated raw enzyme solution.

한천분해효소는 70℃에서 1시간 처리 후에도 약 30%의 잔존활성이 관찰되었고[17] *Glaciecola* sp. SL-12의 한천분해효소는 60℃에 0.5시간 노출되었을 때 잔존활성이 50% 이상으로[18] 본 연구보다 열안정성이 높았다. 하지만 한천은 40℃ 이상에서 sol 상태이고, 본 연구에서 확보한 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1의 한천분해효소도 50℃에 2시간 노출시킨 조효소액은 82% 이상의 잔존활성을 유지하므로(Fig. 5) 한천을 이용한 올리고당의 생산 등에는 문제가 거의 없을 것으로 판단되었다.

Zymogram을 통한 한천분해효소의 단백질 크기 분석

Pseudoalteromonas sp. JH-1의 한천분해효소의 분자량을 Fig. 6에 나타내었다. 0.1% (w/v) agarose를 포함하는 12.5% (w/v) polyacrylamide gel로 전기영동하여 97 kDa 및 55 kDa의 분자량을 나타내는 2개의 한천분해효소를 확인하였다. *Persicobacter* sp. JZB09 [5]에서는 70 kDa과 45 kDa의 분자량을 가진 한천분해효소가 확인되었다. 동일한 *Pseudoalteromonas* 속 세균의 한천분해효소가 나타내는 분자량은 60 kDa [22]과 50.15 kDa [25]이 보고되어 본 연구의 한천분해효소가 기존에 보고되지 않은 새로운 한천분해효소일 가능성이 확인되었다.

Agarase는 두 가지 종류가 있으며 한천을 기질로 하여 α -agarase 또는 β -agarase가 작용하여 생성되는 한천올리고당과 네오한천올리고당은 항산화, 항종양, 피부 미백, 대식세포 활성화 및 prebiotics 효과가 있으므로 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1와 그의 agarase에 대한 연구는 의미가 있을 것이다.

다른 균주들의 β -agarase에 의해 생산되는 neoagarooligosaccharides를 살펴보면 *Thalassomonas* sp. SL-5 [17], *Maribacter*

sp. SH-1 [14]는 neoagarohexaose, neoagarobiose, neoagarotetraose를 생산한다. *Alteromonas* sp. SH-1의 α -agarase는 agarotriose와 agaropentaose를 생산하였다[20]. 본 연구와 동일한 *Pseudoalteromonas* 속 세균이 생산하는 한천분해효소의 산물을 보면 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 생산하는 *Pseudoalteromonas* sp. H9 [1], 다양한 올리고당을 생산하는 *Pseudoalteromonas* sp. JT-6 [25]이 보고되어 있다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Chi, W. J., Yoon, Y. S., Kim, J. H. and Hong, S. K. 2015. Isolation and characterization of an agar-hydrolyzing marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. H9, from the coastal seawater of the west sea, south Korea. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**, 134-141.
2. Do, J. H. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Kor. Fish. Soc.* **30**, 423-427.
3. Dong, J. H., Tamaru, Y. and Araki, T. 2007. Molecular cloning, expression, and characterization of a β -agarase gene, agaD, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 38-46.
4. Duckworth, M. and Yaphe, W. 1971. Structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbo. Res.* **16**, 189-197.
5. Han, W., Zhao, S., 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.
6. <https://www.miryangagaragar.com/shop/Agar/agar05.php>
7. <https://www.nongsaro.go.kr/portal/ps/psq/psqb/farmTermDicLst.ps?menuId=PS00064>
8. 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.
9. Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. and Ewart, H. S. 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* **9**, 196-223.
10. 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.
11. Joo, D. S., Kim, O. S., Cho, S. Y. and Cho, C. H. 2003. Preparation condition of agar oligosaccharide with organic acids. *J. Kor. Fish. Soc.* **36**, 6-10.
12. Kim, H. T., Lee, S., Kim, K. H. and Choi, I. G. 2012. The complete enzymatic saccharification of agarose and its application to simultaneous saccharification and fermentation

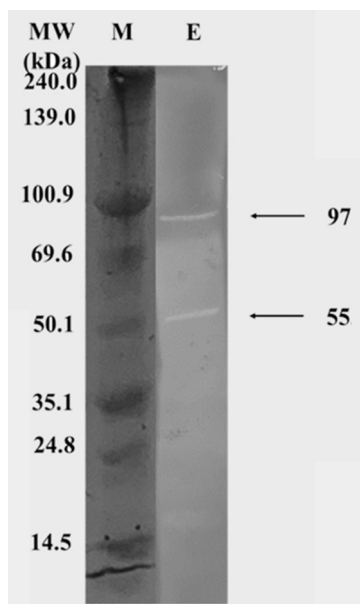


Fig. 6. Zymogram analysis of agarases. The molecular weights of the enzymes are estimated 97.0 and 55.0 kDa (size marker: lane M, agarases: lane E).

- of agarose for ethanol production. *Bioresour. Technol.* **107**, 301-306.
13. Kim, J. D., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2018. Cloning, expression, and characterization of a thermotolerant β -agarase from *Simiduia* sp. SH-4. *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **23**, 525-531.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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 β -agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 in *Bacillus subtilis* and the whitening effect of its product. *Biotechnol. Lett.* **30**, 911-918.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. Ministry of Oceans and fisheries. 2019. Yearbook. pp. 251-257.
 22. Oh, Y. H., Jung, C. G. and Lee, J. W. 2011. Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudoalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 818-821.
 23. Park, G. T., Lee, D. G., Kim, N. Y., Lee, E. J., Jung, J. G., Lee, J. H., Heo, M. S. and Lee, S. H. 2005. Isolation and characterization of a marine bacterium producing thermotolerant agarase. *J. Life Sci.* **15**, 884-888.
 24. Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**, 61-73.
 25. Tao, X., Jing, W., Kim, K. S., Yu, Z. and Lee, Y. C. 2008. Cloning, expression and characterization of β -agarase gene from a marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. JT-6. *J. Life Sci.* **18**, 625-630.

초록 : Agarase를 생산하는 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1의 분리·동정 및 agarase의 특성 연구

이동근¹ · 김주희² · 이상현^{1,2*}

(¹신라대학교 제약공학과, ²신라대학교 일반대학원 그린화학융합공학과)

본 연구에서는 해양 한천 분해 세균인 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1을 분리하여 그 성장과 agarase 특성을 조사하였다. 부산 기장군 용궁사 앞바다에서 해수를 채취하여 Marine agar media로 한천 분해 세균을 분리하여 배양하였다. 순수하게 분리된 박테리아는 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통해 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1로 명명하였다. 세포의 분비 효소를 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1의 배양 배지에서 얻었으며 agarase의 특성 파악에 사용하였다. Agarase는 50℃와 pH 6.0의 20 mM Tris-HCl 완충액에서 116.6 U/l의 최대 활성을 보였다. 20, 30, 40, 50, 60, 70℃에서 상대활성은 각각 31, 60, 94, 100, 45 및 31%였다. pH 4, 5, 6, 7, 8, 9에서 상대활성은 각각 49, 85, 100, 87, 81 및 67%였다. Agarase는 20, 30, 40℃에서 2시간 동안 열처리 후 85% 이상의 잔류 활성을 보였고, 50℃에서 2시간 동안 노출 후에도 82% 이상의 잔류 활성을 보였다. Zymogram 분석으로 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1이 55 및 97 kDa의 agarase를 생성하는 것을 확인하였다. Agarase는 두 가지 종류가 있고 한천을 기질로 α -agarase 또는 β -agarase가 작용하여 만들어지는 한천올리고당과 네오한천올리고당은 항산화, 항종양, 피부 미백, 대식세포 활성화 및 prebiotics 효과가 있으므로 *Pseudoalteromonas* sp. JH-1와 그의 agarase에 대한 연구는 의미가 있을 것이다.