

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

Jin Sun Kim, Dong-Geun Lee, Go-Wun Yeo, Min-Joo Park and Sang-Hyeon Lee*

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

Received March 14, 2023 /Revised March 21, 2023 /Accepted March 22, 2023

This report looks at an agar-degrading marine bacterium and characterization of its agarase. Agar-degrading marine bacterium JS-1 was isolated with Marine agar 2216 media from seawater from the seashore of Sojuk-do, Changwon in Gyeongnam Province, Korea. The agar-degrading bacterium was named as *Agarivorans* sp. JS-1 by phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequencing. The extracellular agarase was prepared from the culture media of *Agarivorans* sp. JS-1 and used for characterization. Relative activities at 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, and 60°C were 70%, 74%, 78%, 83%, 87%, 100%, 74%, and 66%, respectively. Relative activities at pH 5, 6, 7, and 8 were 91%, 100%, 90%, and 89%, respectively. Its extracellular agarase showed maximum activity (207 units/l) at pH 6.0 and 50°C in 20 mM Tris-HCl buffer. The residual activity after heat treatment at 20°C, 30°C, and 50°C for 30 minutes was 90%, 70%, and 50% or more, respectively. After a 2-hour heat treatment at 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, and 45°C, the residual activity was 80%, 68%, 65%, 63%, and 57%, respectively. At 50°C and above, after heat treatment for 30 minutes, the residual activity was below 60%. Thin layer chromatography analysis suggested that *Agarivorans* sp. JS-1 produces extracellular β -agarases as they hydrolyze agarose to produce neoagarooligosaccharides such as neoagarohexaose (20.6%), neoagarotetraose (58.5%), and neoagarobiose (20.9%). *Agarivorans* sp. JS-1 and its thermotolerant β -agarase would be useful in the production of neoagarooligosaccharides, showing functional activity such as inhibition of bacterial growth and delay of starch degradation.

Key words : *Agarivorans* sp. JS-1, β -agarase, marine bacterium, neoagarooligosaccharides, TLC

서 론

우리나라는 3면이 바다로 둘러싸여 있으며 연간 국내 한천(agar) 생산량은 수천 톤에 이른다. 반면에 한천의 사용량은 약 6.5% 정도로 나머지는 대부분 방치되어 있다. 한천은 젤리나 다이어트 식품 등 식품 산업에 사용되고 있다[8, 14]. 또한 응고력이 강하고 잘 분해되지 않기 때문에 분자생물학 실험 또는 미생물 배지에 널리 사용되는 중이다[9].

한천은 지누아리와 같은 홍조류의 주요 구성성분인 다당류로서 agarose와 agaropectin 등으로 구성되어 있다[3]. 중성다당류인 agarose는 한천의 약 70%를 차지하고 있으며 1→3결합으로 연결된 β -D-galactose의 결합체이다[1, 2]. 산성다당류인 agaropectin 은 1→4결합으로 연결된

3,6-anhydro- α -L-galactose의 결합체이다[1, 2]. 한천올리고당은 생체 등에 많은 기능성을 나타낸다고 보고되었다. 즉 한천올리고당은 세균성장 억제, 전분노화 방지, 미백 효과, 항산화 효과 등이 보고되어 있으며, 신약개발에도 사용될 수 있는 고부가가치 소재이다[17].

한천올리고당의 생산 방법에는 효소가수분해법과 산가수분해법이 있다. 효소가수분해법은 한천분해효소가 다당체에 특이적으로 작용하기 때문에 한천올리고당을 보다 쉽게 생산할 수 있다[15]. 반면에 산가수분해법은 반응 후 부산물이 생기며 중화과정을 거쳐야 하고 생성된 올리고당의 기능성과 안정성이 떨어지는 문제점이 있다 [15]. 한천을 분해하는 효소인 agarase에는 β -agarase와 α -agarase가 있다. β -agarase는 한천 또는 agarose를 분해하여 neoagarooligosaccharides을 생산할 수 있다[4]. 또한, α -agarase는 agarooligosaccharides을 생산할 수 있다[13]. 따라서 한천분해균주를 탐색하고 그 균주가 생산하는 효소의 특성을 파악하는 것은 방치되고 있는 한천을 이용하여 고부가가치 산물을 생산하는데 필수적이므로 중요하다. 이에 본 연구는 경상남도 창원시 소죽도에서 채취한 해수를 통해 한천을 분해하는 새로운 균주를 분리하고 동정하였으며, β -agarase를 생산하는 새로운 균주의 효소활성에 대해 보고하고자 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

경상남도 창원시 소죽도에서 한천분해활성을 가지는 세균의 분리를 위한 시료를 채취하였으며, Marine broth 2216 배지(Difco, USA)에 1.5% (w/v)의 agar를 첨가한 Marine agar 2216 배지에 시료액을 도말하여 30°C에서 배양하였다. 배양 후에 한천분해활성에 의해 Marine agar 2216 배지를 함몰시키는 JS-1 균주를 3차례 이상 순수분리하여 선별하였다. 순수분리된 균체를 배양하고 Wizard Genomic DNA Isolation Kit (Promega, Cat.#: A1120)를 사용하여 Genomic DNA를 획득하고, 16S rRNA 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 사용하였다. DNA 염기서열 분석은 Bionics (Seoul, Korea)에서 수행하였다. 분석된 염기서열은 BLAST를 사용하여 보고된 균주들과 유사도를 검토하였으며, Mega 프로그램(ver. 11)의 phylogeny analysis를 이용하여 neighbor joining tree를 작성하면서 bootstrap method (n=1,000)로 분석하였다.

배양시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성 측정

Marine broth 2216 배지 4 ml에 순수분리한 JS-1 균주를 접종한 후 27°C, 250 rpm에서 하루 동안 진탕배양하였다. 이후 0.2% (w/v)의 agar가 첨가된 Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 삼각플라스크에 4 ml의 배양액을 접종한 후 27°C, 250 rpm에서 6일 동안 진탕배양하였다. 진탕 배양하면서 24시간마다 배양액을 1 ml씩 채취하여 시간에 따른 한천분해 균주의 성장과 효소의 활성을 측정하였다. 균주의 생장은 분광광도계로 600 nm에서 측정하였다.

조효소액의 제조

Marine broth 4 ml가 들어있는 시험관에 순수분리한 JS-1 균주를 접종한 후 1일간 진탕배양(30°C, 250 rpm)한 후, 0.2% (w/v)의 agar가 첨가된 Marine broth 배지 50 ml에 계대한 후에 진탕배양기를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 2일간 배양하였다. 배양액을 원심분리하여(3,000×g, 4°C, 15 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액 15 ml를 Snake Skin Dialysis Tubing (Thermo Scientific, USA)에 넣은 후 1,000 ml 비커에 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액 900 ml를 첨가하고, 4°C의 냉장실에서 2시간 정치하는 것을 2번 반복한 후 세 번째에는 12시간 이상 투석을 시행하였다. 투석을 할 때마다 매번 새로운 완충용액을 사용하였다. 투석이 완료된 조효소액은 membrane filter (0.45 µm, Millipore, USA)를 통과시킨 후 4°C에서 냉장보관하였다.

효소활성 측정

Agarase 활성은 DNS법을 이용하여 측정하였으며, DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변형법으로 환원당을 측정하는 방법이다[4]. DNS 용액은 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 증류수에 녹이고 최종 부피가 1,000 ml이 되도록 제조하였다. 최종농도 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 완충용액을 중탕 가열한 후 반응온도까지 냉각하고 반응수조를 이용하여 온도를 유지하면서 표준기질용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 0.5 ml의 효소 반응액에 1.5 ml의 DNS 용액을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준적정곡선으로 D-galactose를 사용하였고, 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 한천분해활성을 비교하기 위하여 표준기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 중탕가열한 후에 조효소액 0.5 ml와 표준기질용액 1 ml를 혼합하여 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C의 온도에서 30분간 반응시킨 후에 효소활성을 측정하였다.

pH에 따른 한천분해 효소의 활성측정

pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 20 mM GTA (3,3-dimethyl-glutamic acid, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, 2-amino-2-methyl-1, 3-propanediol) 완충용액(pH 4.0-10.0)을 사용하였다. 각 완충용액에 최종농도 0.2% (w/v)의 agarose를 첨가하고 중탕 가열한 후에 50°C에서 효소활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 열안정성 측정

한천분해 효소의 열안정성을 측정하기 위하여 표준기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 20°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C에서 0시간, 0.5시간, 1시간, 2시간 동안 열처리한 후에 기질용액과 반응시키고 효소활성을 측정하였다.

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, 0.5, 1, 2, 6, 12 시간 동안 반응시킨 후 Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 수행하였다. n-Butanol/acetic acid/H₂O (2/1/1)를 이용하여 전개시켰고, 10% (v/v) H₂SO₄로 가시화시켰다. 표준물질로는 D-galactose (Sigma) 및 neogargarooligosaccharides를 사용하였다[5].

결과 및 고찰

한천분해균주의 분리 및 동정

경상남도 창원시 진해 소죽도에서 채취한 해수를 Marine agar 2216배지에 도말한 후 한천분해 활성이 뛰어난 균주를 선발하였다. 선발한 균주는 백금을 이용하여 3차례 이상 순수분리하였다. 순수분리된 균주를 배양하고 원심분리로 균체를 수집한 후에 추출된 Genomic DNA의 16S rRNA 유전자를 분석하니 *Agarivorans litoreus* 및 *Agarivorans albus*와 99%의 가장 높은 유사성을 나타내었으므로, 이를 *Agarivorans* sp. JS-1으로 명명하였다. 본 연구 균주의 계통분류학적 위치를 Fig. 1에 나타냈다.

시간에 따른 한천분해 균주의 효소활성과 성장 측정

Marine broth 2216 배지 50 ml에 0.2% (w/v)의 agar를 첨가한 후, *Agarivorans* sp. JS-1 균주를 접종하여 30°C, 250 rpm에서 6일 동안 진탕배양하였다. 이때 나타나는 효소활성과 성장곡선을 Fig. 2에 나타냈다. 접종 후 3일째에 균의 수가 최고가 되었으며, 4일째부터 점차 감소하는 것을 알 수 있었다. 효소활성은 1일째에 가장 높았으며 3일째부터 확연하게 감소하였다. 따라서 이후 연구에서는 2일 동안

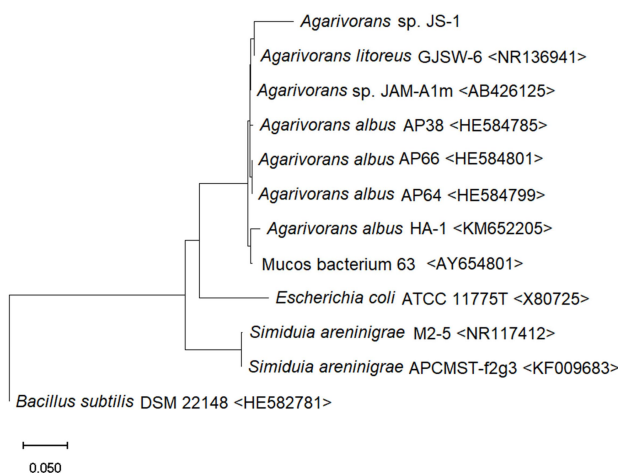


Fig. 1. Neighbor-Joining Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing isolated *Agarivorans* sp. JS-1 strain with other bacteria. The numbers at the branch node are percentages of bootstrap values (n=1,000) and numbers in parenthesis are numbers in GenBank.

진탕배양한 배양액을 사용하였다.

한천분해효소의 온도별 활성

각 온도별로 *Agarivorans* sp. JS-1이 생성하는 한천분해 효소가 보이는 활성을 Fig. 3에 나타내었다. *Agarivorans* sp. JS-1의 한천분해효소는 50°C까지 온도가 증가하면 효소활성이 증가하였고 50°C에서 최대활성을 보였다. 50°C 이상에서는 온도가 증가할 때 효소활성의 낙폭이 컸다. 50°C에서의 활성을 100%로 보았을 때, 상대활성이 45°C에서는 약 87%, 40°C에서는 약 83%를 나타내었고, 30°C, 55°C에서는 약 74%를 나타내었다. 다른 균주들의 한천분해효소의 최적온도를 확인해 보면 *Maribacter* sp. SH-1 [9]가 *Agarivorans* sp. JS-1과 동일하게 50°C에서 최고활성을 보였으며, *Glaciecola* sp. SL-12 [12]는 30°C, *Thalassomonas* sp. SL-5 [11]는 40°C에서 최고활성을 보였다. 동일한 *Agarivorans* 속 세균의 한천분해효소의 최적온도는 *Agarivorans* sp. JA-1과 *Agarivorans* sp. HY-1에서 40°C였고, *Agarivorans* sp. KC-1에서 50°C였다[6, 10, 16].

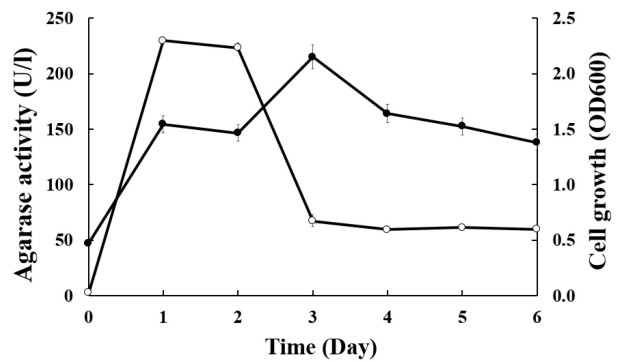


Fig. 2. Cell growth and agarase activity of *Agarivorans* sp. JS-1 with culture time. (○ agarase activity [units/L], ● cell growth [OD₆₀₀]).

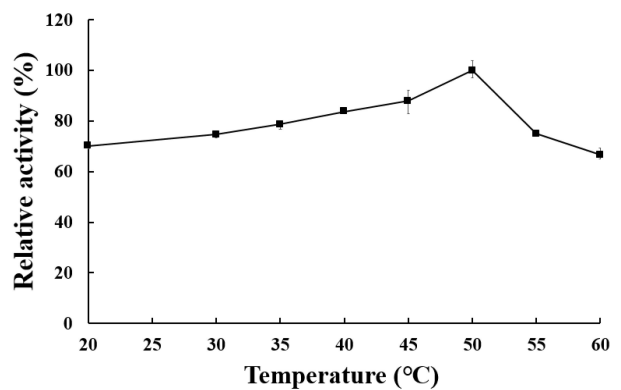


Fig. 3. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reactions were carried out at 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60°C in 500 μl of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agarose and 250 μl of raw enzyme solution for 30 min.

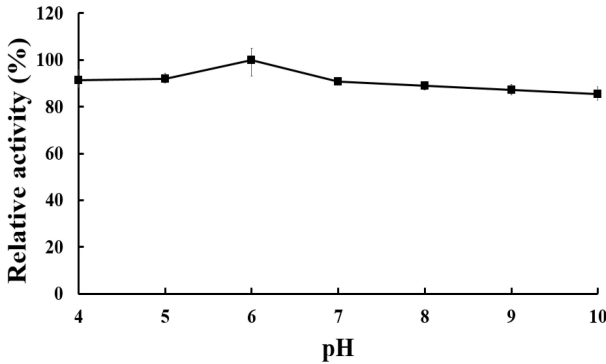


Fig. 4. Effect of pH on agarase activity. The reactions were carried out at 50°C in 500 µl of corresponding buffer containing 0.2% agarose and 250 µl of raw enzyme solution for 30 min. (■ 20 mM 20 mM GTA, pH 4.0-10.0)

최적온도에서의 pH별 한천분해효소의 활성

최적온도에서 pH별로 *Agarivorans* sp. JS-1이 생성하는 한천분해효소의 활성은 Fig. 4에 나타내었다. *Agarivorans* sp. JS-1은 20 mM GTA 완충용액 pH 6.0에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH6.0에서의 활성을 100%로 하였을 때 pH 4.0와 pH 5.0, pH 7.0와 pH 8.0 사이에서는 90% 이상의 활성을 보였다. 또한, pH 9.0와 pH 10.0 사이에서는 80% 이상의 활성을 보였다. 동일한 *Agarivorans* 속 세균이 생산하는 한천분해효소의 최적 pH는 *Agarivorans* sp. KC-1 [16]는 pH 6.0으로 *Agarivorans* sp. JS-1과 동일한 pH를 보였고, *Agarivorans* sp. HY-1 [10]은 pH 7.0으로 중성을 보였으며, *Agarivorans* sp. JA-1 [6]에서는 pH 8.0으로 염기성을 보이는 등 다양한 최적 pH가 보고된 것을 확인할 수 있다. 동일한 *Agarivorans* 속 세균의 한천분해효소들의 최적 온도와 최적 pH를 비교하면 *Agarivorans* sp. JS-1이 50°C, pH 6.0이었고, *Agarivorans* sp. JA-1에서 40°C, pH 5.0이었고[5], *Agarivorans* sp. HY-1에서 40°C, pH 7.0이었으며[9], *Agarivorans* sp. KC-1에서 50°C, pH 6.0이었다[15]. *Agarivorans* sp. JS-1과 *Agarivorans* sp. KC-1은 최적 온도와 최적 pH는 동일하지만 한천의 분해산물에서 차이를 보였다.

한천분해효소의 열안정성

Agarivorans sp. JS-1 유래 한천분해효소의 열안정성은 Fig. 5에 나타내었다.

최적온도와 최적 pH에서 열처리없이 반응시킨 효소활성을 100%로 간주하였을 때, 20°C에서 2시간 노출되었을 때 80% 이상의 잔존활성을 보였으나 30°C부터는 30분 노출되면 20°C의 2시간 노출보다 효소의 잔존활성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 45°C까지는 2시간 노출되어도 60% 정도의 잔존활성이 있었지만, 50°C 이상의 열처리에서는 2시간부터 50% 정도로 잔존활성이 떨어지는 것을

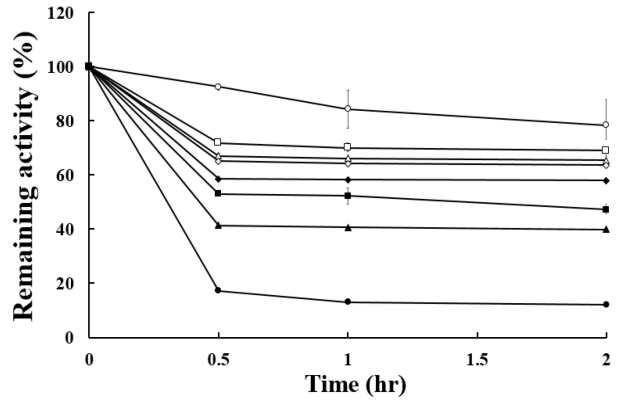


Fig. 5. Remaining activities of agarase after heat treatment. The raw enzyme solutions were pre-incubated at 20 (○), 30 (□), 35 (△), 40 (◇), 45 (◆), 50 (■), 55 (▲) and 60°C (●) for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reactions were then carried out at 50°C in 500 µl of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agarose and 250 µl of heat-treated raw enzyme solution for 30 min.

확인할 수 있었다. 반면에 *Agarivorans* sp. HY-1 균주[9]는 40°C에서 열처리없이 반응시킨 것을 100%로 보았을 때, 40°C까지는 최적 온도에서 2시간 노출되었을 때 86% 이상의 활성을 보이는 등 *Agarivorans* 속 세균이 생성하는 agarase의 열안정성이 서로 다르다는 것을 알 수 있었다. 따라서 *Agarivorans* sp. JS-1 가 생산하는 한천분해효소는 50°C 이상의 온도에서 높은 내열성을 보유하고 있지 않다는 것을 확인할 수 있었다. *Agarivorans* sp. HY-1과 *Agarivorans* sp. KC-1은 각각 40°C에 2시간 노출되었을 때 80% 이상의 잔존활성이 있어 본 연구와 차이를 보였다 [10, 16].

한천가수분해산물의 TLC분석

Agarivorans sp. JS-1 균주를 2일간 배양하여 제조된 조효소액에 0.2% (w/v)의 agarose가 첨가된 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) 완충용액을 첨가하여 0시간에서 12시간까지 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 한천분해효소에는 β-agarase와 α-agarase 두 종류가 존재한다고 알려져 있고[13] 이들 효소의 산물은 TLC에서 서로 다른 양상을 보인다. NA6는 neoagarohexaose, NA4는 neoagarotetraose로 30분째부터 이들의 생산 반응이 관찰되었다. NA2는 neoagarobiose로 30분째 소량이 관찰되었고 1시간째부터 확실한 생산 반응이 관찰되었다. 30분째 관찰되는 NA6보다 큰 산물은 시간이 지남에 따라 사라졌으며, NA2와 NA4는 시간이 지날수록 농도가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 최종적으로는 neoagarohexaose가 20.6%, neoagarotetraose가 58.5% 그리고 neoagarobiose가 20.9% 생성되어 *Agarivorans* sp. JS-1의 한천분해효소는 β-agarase

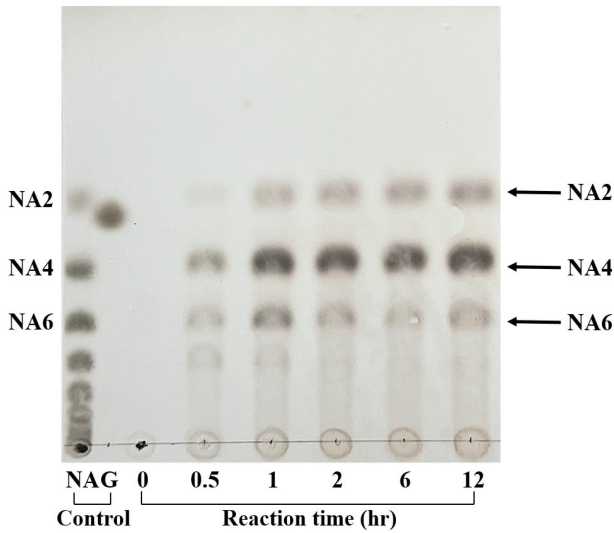


Fig. 6. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 50°C in 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% agarose and 500 μ l of raw enzyme solution for 0, 0.5, 1, 2, 6 and 12 hr. (NA, neoagarooligosaccharides; D, D-galactose; NA6, neoagarohexaose; NA4, neoagarotetraose; NA2, neoagarobiose).

로 확인되었다. TLC 분석으로 *Agarivorans* sp. HY-1는 α -agarase를 생산하여[10] 본 연구의 β -agarase와 차이가 있었다. *Agarivorans* sp. JA-1과 *Agarivorans* sp. KC-1은 β -agarase를 생산하였지만 agarose의 분해산물이 *Agarivorans* sp. JA-1에서는 NA4와 NA6로 NA2가 없었고[6], 최적 pH와 최적 온도가 본 연구의 *Agarivorans* sp. JS-1가 동일한 *Agarivorans* sp. KC-1에서는 NA2와 NA4의 비율이 각각 46.2%와 32.2% 였는데[16], 본 연구에서는 NA2와 NA4의 비율이 각각 20.9%와 58.5%로 차이를 보이는 것을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 2022년도 BB21+사업에 의하여 지원되었음.

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Cha, J. A., Kim, Y. J., Seo, Y. B. and Yoon, M. H. 2009. Isolation of an agarolytic bacteria, *Cellvibrio 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. 1998. Isolation of agar degrading bacteria, *Cytophaga* sp. ACLJ-18 and optimization of enzyme production. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 320-324.
4. Cji, W. J., Park, J. S., Kwak, M. J., Kim, J. F., Chang, Y. K. and Hong, S. K. 2013. Isolation and characterization of a novel agar-degrading marine bacterium, *Gayadomonas joobiniege* gen. nov., sp. Nov., from the southern sea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1509-1518.
5. Jang, M. K., Lee, H. O., Yoo, K. H., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2007. Secretory overexpression of β -agarase in *Bacillus subtilis* and antibacterial activity of enzymatic products. *J. Life Sci.* **17**, 1601-1604.
6. 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.
7. 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.
8. Jo, H. 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.
9. 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.
10. Lee, D. G., Cho, H. Y., Kim, A. and Lee, S. H. 2022. The isolation of agarolytic *Agarivorans* sp. HY-1 and the characterization of its agarase. *J. Life Sci.* **32**, 285-289.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Lim, D. J., Kim, B. J., Bae, S. K., Kim, D. J. and Kong, J. Y. 1999. Immobilization of agarase for the agarooligosaccharide production. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 208-214.
15. Lin, F., Ye, J., Huang, Y., Yang, Y. and Xiao, M. 2019. Simple preparation of diverse neoagaro-oligosaccharides. *Processes* **7**, 267.
16. Min, K. C., Lee, C. E., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2018. Isolation of *Agarivorans* sp. KC-1 and characterization of its thermotolerant β -agarase. *J. Life Sci.* **28**, 1056-1061.

17. Park, G. T., Lee, D. G., Kim, N. Y., Lee, E. J., Jung, J. G., Lee, J. H., Heo, M. S., 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. JS-1의 분리 및 β -아가라제의 특성 규명

김진선 · 이동근 · 여고운 · 박민주 · 이상현*
(신라대학교 제약공학과)

본 연구에서는 해양 한천분해세균 *Agarivorans* sp. JS-1과 해당균주의 agarase 특성을 조사하였다. 한천분해세균인 *Agarivorans* sp. JS-1은 경상남도 창원시 소죽도에서 채취한 해수를 이용하여 Marine agar 2216배지에서 분리하였다. 분리된 균은 16S rRNA 유전자 염기서열분석을 통하여 *Agarivorans* 속 세균과 99% 일치하여 *Agarivorans* sp. JS-1으로 명명하였다. 세포외로 분비되는 agarase는 *Agarivorans* sp. JS-1 균주 배양액에서 획득하였으며, 이를 이용하여 특성 조사를 하였다. *Agarivorans* sp. JS-1 균주의 한천분해효소는 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 및 60°C에서 각각 70, 74, 78, 83, 87, 100, 74, 66%의 상대활성을 나타냈으며, pH 5, 6, 7, 8에서는 91, 100, 90, 89%의 활성을 나타내었다. 세포외 agarase는 50°C에서 pH 6.0인 20 mM Tris-HCl 완충용액을 사용하였을 때 최대(207 U/l)의 활성을 보였다. 20, 30, 50°C에서 30분간 열처리하면 잔존활성이 각각 90%, 70%, 50% 이상이었다. 55°C 이상에서는 30분 동안 열처리하면 잔존활성이 50% 미만이었다. 20, 30, 35, 40 및 45°C에서 2시간 열처리 후의 잔존활성은 각각 80, 68, 65, 63 및 57%였다. TLC 분석 결과, *Agarivorans* sp. JS-1 균주의 한천분해효소는 네오한천올리고당인 neoagarohexaose (20.6%), neoagarotetraose (58.5%) 및 neoagarobiose (20.9%)를 생성하는 것으로 보아 β -agarase로 확인되었다. 따라서 *Agarivorans* sp. JS-1 가 생산하는 β -agarase는 전분노화 방지, 미백효과, 보습효과 및 세균생장 억제 등의 기능을 가지는 한천올리고당의 생산에 유용할 것으로 판단된다.