

## Isolation of *Simiduia* sp. SH-2 and Characterization of Its $\beta$ -Agarase

Dong-Geun Lee, Geun-Dae Kim and Sang-Hyeon Lee\*

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

Received July 6, 2022 / Revised August 16, 2022 / Accepted August 30, 2022

This study isolated a new agarase-producing bacterium and characterized its agarase. A new agar-degrading strain was isolated from the seashore of Namhae in Gyeongnam province, Korea, and was purely cultured using the Marine Agar 2216 media. The isolated bacterium was identified as *Simiduia* sp. SH-2 after 16S rRNA gene sequencing. The crude agarase was obtained from the culture medium of the *Simiduia* sp. SH-2 strain, and the agar-degrading activity was measured. The highest level of activity of the *Simiduia* sp. SH-2-derived agar-degrading enzyme was 625 U/l. Agar degradation activity was most significant at 40°C and pH 7.0. Compared to the activity at 40°C, the relative activity was 31% at 20°C and 71% at 30°C. Compared to the activity at pH 7.0, the relative activity was 94% and 89% at pH 6.0 and pH 8.0, respectively. Residual activity was greater than 96% after exposure to 20°C and 30°C for 2 hr and more than 49% after exposure to 40°C for 2 hr. *Simiduia* sp. SH-2 was identified as a strain producing  $\beta$ -agarase that creates neoagarooligosaccharides, such as neoagarotetraose and neoagarohexaose. Therefore, the *Simiduia* sp. SH-2 strain and its  $\beta$ -agarase are expected to be useful functional material producers in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries.

**Key words :** Agarase, agar-degrading bacterium, neoagarooligosaccharides, *Simiduia* sp. SH-2

### 서 론

올리고당(oligosaccharides)은 2-10개의 단당류가 glycoside 결합으로 탈수축합된 소당류로서, 설탕 등의 기존 당류의 과다 섭취에 의해 발생하는 충치, 비만, 성인병 발생 등의 문제점 해결의 대체 감미료와 기능성으로 주목을 받고 있다[6, 9].

식물 가공 부산물들은 올리고당(oligosaccharides) 등의 기능성 당 생산의 소재이며 저렴하고 대량 이용이 가능하여 주목을 받고 있다[16]. 기능성 올리고당의 생산을 위한 원료로 한천을 들 수 있다. 한천은 꼬시래기나 우뚝가사리 등에서 생산되지만 한천 생산 원료의 90% 가량이 한천 생산도 하지 않고 방치되고 있으며[9] 한천의 국내 연간 생산량은 2018년 현재 259톤이다[16]. 한천으로부터 한천 올리고당과 네오한천올리고당이 형성되는데 네오한천올리고당은 항암[2], 대식세포 활성화[21], 항산화[1], prebiotic 효과[3] 등이 보고되어 있다.

한천에서 한천올리고당을 생산하는 방법은 산가수분해법과 효소가수분해법 등이 있는데, 산가수분해법은 산의 중화 과정이 필요하며 반응 후 부산물이 형성되어 올리고당의 안정성과 기능성이 떨어지는 것으로 알려져 있다[5]. 효소가수분해법은 효소의 특이적 작용에 의한 한천의 선택적 분해로 부산물이 거의 생기지 않으며 활성형 한천올리고당의 생산이 보다 용이하다[9].

이에 한천분해효소에 관한 연구는 지속적으로 진행되고 있으며, 한천분해효소를 생산하는 새로운 한천분해세균에 관한 연구 등이 보고되고 있다. 본 연구진도 *Agarivorans* 속[14], *Maribacter* 속[8], *Pseudoalteromonas* 속[10], *Thalassomonas* 속[11], *Flammeovirga* 속[4] 등이 생산하는 한천분해효소에 관한 연구들을 보고하였다.

본 연구에서는 한천분해능이 있는 새로운 해양성 세균인 *Simiduia* sp. SH-2를 국내 연안의 해수에서 분리 및 동정하였고, 분리한 균주가 생산하는 agarase의 특성 및 성장 최적조건 등을 검토하여 산업적 이용 가능성을 제안하고자 한다.

#### \*Corresponding author

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

E-mail : [slee@silla.ac.kr](mailto: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 남해군 미조면 일대의 연안에서 한천분해활성을 가지는 세균의 분리를 위한 시료를 채취하였으며, Marine broth 2216 (Difco, Detroit, USA) 배지에 1.5% (w/v)

의 한천을 첨가한 Marine agar 2216 배지에 시료액을 도말한 후 33°C에서 배양하면서 한천분해활성으로 Marine agar 2216 배지를 함몰시키는 SH-2 균주를 3차례 이상 순수분리하여 선별하였다[7]. 순수분리된 균체로부터 Wizard Genomic DNA isolation Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였고, 16S rDNA 유전자 단편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 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, 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.

#### 배양시간에 따른 한천분해 균주의 성장과 효소활성 측정

Marine broth 2216 배지 4 ml에 순수분리한 SH-2 균주를 접종한 후에 33°C, 250 rpm에서 하루 동안 진탕배양한 후, 0.2 (w/v)의 한천이 첨가된 Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 삼각플라스크에 배양액을 1% (v/v)가 되게 접종하고 33°C, 250 rpm에서 6일 동안 진탕배양하였다. 진탕배양하면서 24시간마다 일부 배양액을 채취하여 시간에 따른 한천분해 균주의 성장과 효소의 활성을 측정하였다.

#### 조효소액의 제조

Marine broth 2216 배지 4 ml에 순수분리한 SH-2 균주를 접종한 후 33°C, 250 rpm에서 하루 동안 진탕배양한 후, 0.2% (w/v)의 한천이 첨가된 Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 삼각플라스크에 배양액을 1% (v/v)가 되게 접종하고 33°C, 250 rpm에서 1일 동안 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하여(3,000×g, 4°C, 15 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 냉장실에서 2시간 동안 교반하여 투석하는 것을 2번 반복한 후에 세 번째에는 12시간 이상 교반하여 투석을 시행하였다. 투석이 완료된 조효소액은 Membrane filter (0.45 µm, Milipore, USA)를 통과시킨 후에 -20°C에서 냉동 보관하였다[13].

#### 효소활성의 측정

Agarase 활성은 DNS법을 이용하여 측정하였다. DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변형법으로 환원당을 측정하는 방법이다[19]. DNS solution은 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 1,000 ml에 녹여서 제조하였다. 기질용액(0.2% (w/v)의 agarose (Sigma, USA)가 포함된 완충용액)을 중탕 가열한 후에 반응온도까지 냉각하고 반응수조를 이용하여 온도를 유지하면서 기질용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후에 효소활성을 측정하였다. 효소 반응액 1 ml에 DNS solution 3 ml를 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후에 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준적정곡선으로 D-galactose (USB, USA)를 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 7.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 중탕 가열한 후, 20-70°C의 온도별로 냉각한 후에 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 0.2% (w/v)의 agarose를 첨가하고 40°C에서 효소활성을 측정하였다.

#### 한천분해 효소의 열안정성 측정

조효소액을 이용하여 온도별 노출시간에 따른 한천분해효소의 잔존활성을 비교하였다. 조효소액 0.5 ml에 표준 기질용액 1 ml를 첨가하여 각 온도별로 0.5, 1.0, 1.5, 2.0시간 열처리한 후, 40°C에서 효소활성을 측정하였다. 측정된 효소활성은 열처리전의 효소활성과 비교하였다.

#### 한천가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

조효소액을 이용한 agarose의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 조효소액 0.5 ml에 표준 기질용액 1 ml를 첨가하여 40°C에서 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 12, 24시간 반응시킨 후, Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 수행하였다. n-Butanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O (2/1/1 (v/v/v))를 이용하여 전개하였고, 10% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 가시화하였다. 표준물질로는 D-galactose (Sigma) 및 neoagarooligosaccharides [12]를 사용하였다.

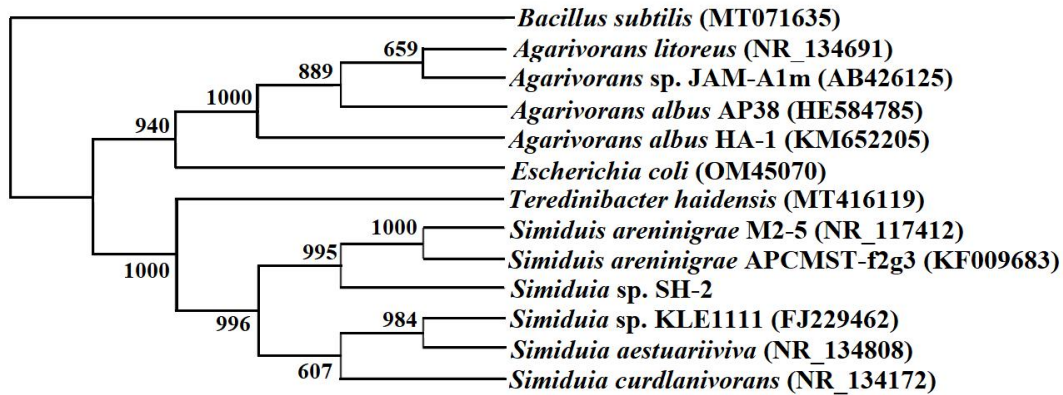


Fig. 1. Phylogenetic position of *Simiduia* sp. SH-2 based on almost complete 16S rDNA sequence. The number of branch nodes is the number of times during 1,000 bootstraps, and the number after the strain name is the NCBI's registration number.

**결과 및 고찰**

**한천분해균주의 분리 및 동정**

경상남도 남해군 미조면 일대의 해수를 Marine agar 2216 배지에 도말하여 한천 분해능력이 우수한 균주를 선별하였다. 분리된 한천분해 SH-2 균주의 16S rDNA 염기서열 분석 결과, 1,340 bp의 염기서열을 얻었고, BLAST 탐색으로 *Simiduia areninigrae*와 97%의 가장 높은 유사성을 나타냈고 *Simiduia* sp. KLE111과 96%의 유사성을 보여, 분리 균주를 *Simiduia* sp. SH-2으로 명명하였다. 본 연구와 Genbank에서 획득한 16S rDNA 염기서열을 bootstrap method (n=1,000)와 Neighbor-joining method로 분석하여 알아낸 본 연구 균주의 계통분류학적 위치를 Fig. 1에 나타냈다.

**시간에 따른 한천분해 균주의 효소활성 과 성장 측정**

0.2% (w/v)의 한천을 첨가한 Marine broth 2216 배지 50 ml에 *Simiduia* sp. SH-2 균주를 접종하여 33°C, 250 rpm에서 진탕배양하였을 때 나타나는 균주의 성장곡선과 효소 활성을 Fig. 2에 나타냈다.

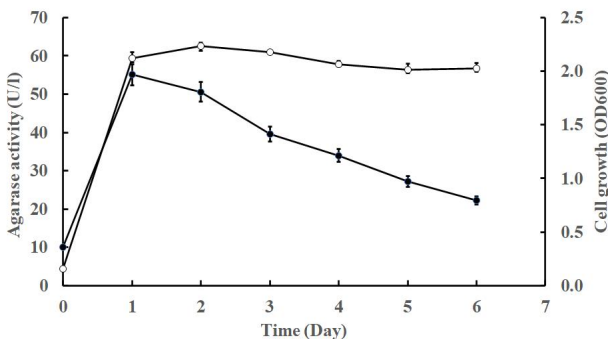


Fig. 2. Cell growths and the agarase activities of *Simiduia* sp. SH-2. (○ cell growth [OD<sub>600</sub>], ● agarase activity [units/l]).

배양시간에 따른 한천분해 균주의 생장은 1일차에서 성장기가 끝나고, 2일차까지 오차범위내에서 감소하여 지체기와 사멸기 초기가 포함된 것으로 판단되며 이후 세포농도가 감소하였다. 한천분해 효소활성은 2일차에서 최고활성을 보였지만, 효소활성의 증가폭이 0일차에서 1일차 사이가 가장 크고, 1일차부터 6일차까지의 차이는 크지 않았다. 따라서 이후의 실험에서는 *Simiduia* sp. SH-2 균주의 한천분해효소의 조효소액은 1일차까지 진탕배양한 배양액에서 제조하였다.

해양에서 분리한 *Simiduia* sp. SH-1과 *Simiduia* sp. SH-4는 30°C, 250 rpm 배양조건에서 3.5일째까지 세포수가 증가하였는데[7, 13], 본 연구의 *Simiduia* sp. SH-2는 3일째에 세포수가 감소하여 차이를 보였다.

**한천분해효소의 온도별 활성**

각 온도별 *Simiduia* sp. SH-2 유래의 한천분해효소의 활성은 Fig. 3에 나타냈다. 실험에 사용된 한천분해효소는 40°C에서 최대활성을 보였고, 40°C에서의 활성을 100%로 하였을 때, 상대활성이 50°C에선 약 67%, 30°C에서 약 71%를 나타내었고, 60°C에서 55% 이상의 활성을 보였다. 다른 균주들의 한천분해효소의 최적온도를 보면 *Pseudoalteromonas* sp. JYBLC가 35°C [17], *Thalassomonas* sp. SL-5가 40°C [11], *Maribacter* sp. SH-1 [8]는 50°C였다. 동일한 *Simiduia* 속인 *Simiduia* sp. SH-1 [13]과 *Simiduia* sp. SH-4 [7]는 각각 40 및 30°C로 나타나 *Simiduia* sp. SH-1 [13]과 본 연구의 *Simiduia* sp. SH-2가 동일한 최적 온도를 가졌다. 본 연구에 사용된 *Simiduia* sp. SH-2의 한천분해효소의 1 l당 최대활성은 625 U/l로 나타났다.

**최적온도에서의 pH별 한천분해효소의 활성**

pH별 *Simiduia* sp. SH-2 유래의 한천분해효소의 활성은 Fig. 4에 나타냈다. Fig. 4는 각 완충용액에서 각 pH별 3회 실험한 것의 평균, 최대, 최소를 나타내는 것이다. 최적인

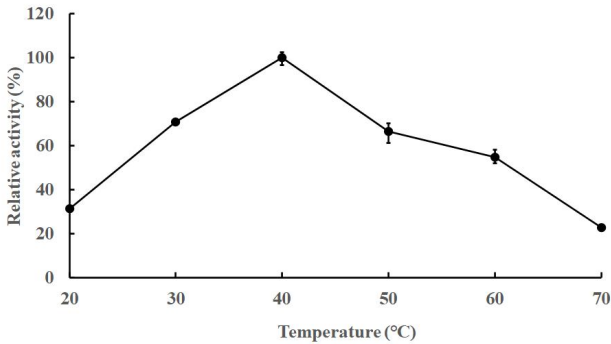


Fig. 3. Effects of reaction temperatures on the agarase activities of *Simidiua* sp. SH-2. The reaction was performed at 20, 30, 40, 50, 60, and 70°C for 30 minutes with 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer containing 0.2% (w/v) agarose and 0.5 ml of the crude enzyme solution.

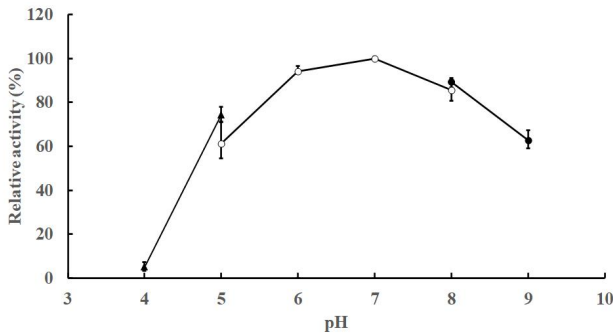


Fig. 4. Effects of pHs on the agarase activities of *Simidiua* sp. SH-2. 20 mM Sodium acetate buffers (pH 4.0-5.0, ▲), 20 mM Tris-HCl buffer (pH 5.0-8.0, ○) and 20 mM GTA buffer (pH 8.0-9.0, ●) were used. The reaction was carried out in 1 ml of buffer containing 0.2% (w/v) agarose and 0.5 ml of the crude enzyme solution for 30 minutes at 40°C.

pH 7.0에서의 활성을 100%로 하였을 때, pH 6.0, 8.0, 9.0에서도 85% 이상의 활성을 보였다. pH 8.0에서는 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 보다 20 mM GTA 완충용액에서 더 높은 활성을 보였고, pH 5.0에서는 20 mM Sodium acetate 완충용액에서 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 보다 더 높은 활성을 보였다. 다른 한천분해효소의 최적 pH를 살펴보면, *Agarivorans* sp. JA-1 은 pH 8.0 [18], *Maribacter* sp. SH-1은 pH 6.0 [8]이었다. 동일한 *Simidiua* 속인 *Simidiua* sp. SH-4는 pH 6.0 [7]에서, *Simidiua* sp. SH-1은 pH 7.0 [13]에서 최적활성을 나타내었다. 본 연구의 *Simidiua* sp. SH-2의 최적 pH는 *Simidiua* sp. SH-1의 최적 pH와 같았고, 최적 온도는 *Simidiua* sp. SH-4의 최적 온도와 같았다. Tawara 등[20]은 *Simidiua* sp. TM-2의 한천분해효소의 최적조건은 35°C, pH 8.0으로 보고하여 *Simidiua* 속은 다양한 한천분해효소를 생산하는 것을 알 수 있다.

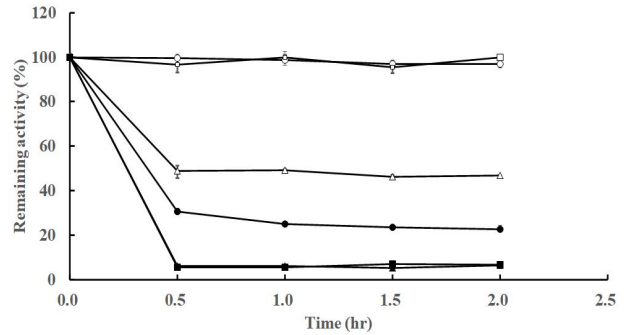


Fig. 5. Remaining activities of the agarases after heat treatment. The crude enzyme solutions were pre-incubated at 20 (○), 30 (□), 40 (△), 50 (●), 60 (■) and 70°C (▲) for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reaction was carried out at 40°C for 30 minutes in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer containing 0.2% (w/v) agarose and 0.5 ml of the heat-treated crude enzyme solution.

### 한천분해효소의 열안정성

*Simidiua* sp. SH-2 유래의 한천분해효소의 열안정성을 Fig. 5에 나타냈다. 전반적으로 40°C 이상의 온도에서는 온도가 증가할수록 잔존활성이 적었으며 30분간 노출되었을 때에 활성 감소가 컸고, 이후에는 감소 정도가 적었다. 최적온도와 최적 pH에서 열 처리를 하지 않은 효소의 활성을 100%로 하였을 때, 20, 30°C에서는 해당온도에 2시간 노출되어도 96% 이상의 잔존활성을 보였다. 40°C에서는 30분간 노출되었을 때 49%의 잔존활성을 보였고, 2시간까지는 큰 차이를 보이지 않았다. 60°C와 70°C의 열 처리에서는 0.5시간부터 90% 이상의 급격한 활성의 감소를 보였다. *Simidiua* sp. SH-4의 한천분해효소는 40°C 이상에서 30분간 열처리하면 활성을 거의 상실하였으며[7], *Simidiua* sp. SH-1의 한천분해효소는 40°C 이상에서 30분간 열처리하면 30% 이하의 잔존활성을 보여[13] 본 연구의 *Simidiua* sp. SH-2의 결과와 차이를 보였다.

### 한천가수분해산물의 TLC분석

*Simidiua* sp. SH-2 균주를 1일간 배양하여 제조된 조효소액에 agarose를 기질로 첨가하여 시간별로 반응시킨 후에 TLC로 분석한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 반응 15분째부터 활발한 분해를 보였으며, 1시간 반응 후에는 기질이 거의 안 보이는 것을 확인할 수 있었다. 한천분해효소는 α-agarase와 β-agarase로 두 종류가 있는데, agarose를 기질로 하여 α-agarase는 agarotriose 및 agaropentose를 생성하고, β-agarase는 neoagarohexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose를 생성하는데[9] 본 연구에 사용된 조효소액이 neoagarohexaose, neoagarotetraose를 주로 생산하고 일부 neoagarobiose를 생성하는 것으로 보아 *Simidiua* sp. SH-2 균주가 생성하는 한천분해효소는 β-agarase로 확인

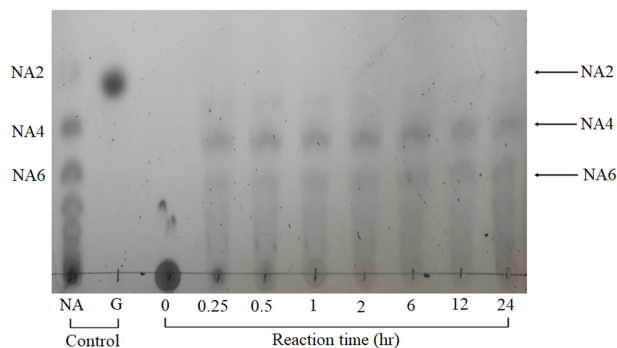


Fig. 6. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by the agarase. The reactions were carried out at 40°C in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer containing 0.2% (w/v) agarose and 0.5 ml of the crude enzyme solution for 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 6, 12 and 24 hr. The reaction mixtures were developed by TLC. (G, D-galactose; NA, neoagarooligosaccharides; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose).

되었다. *Simiduia* sp. SH-1과 *Simiduia* sp. SH-4의 agarase는 neoagarobiose와 neoagarotetraose를 주로 생산하였다[7, 13]. 본 연구에 이용된 *Simiduia* sp. SH-2 균주가 생산하는 40°C와 pH 7.0에서 최적활성을 보이는  $\beta$ -agarase를 이용하여 대식세포 활성화 기능, 미백 및 보습 기능, 전분노화방지 기능, 세균성장 억제 기능 등을 가진 기능성 소재의 개발이 가능할 것이다[8].

### The Conflict of Interest Statement

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

### References

- Chen, H. M. and Yan, X. J. 2005. Antioxidant activities of agarooligosaccharides with different degrees of polymerization in cell-based system. *Biochim. Biophys. Acta* **1722**, 103-111.
- Fernandez, L. E., Valiente, O. G., Mainardi, V., Bello, J. L., Velez, H. and Rosado, A. 1989. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. *Carbohydr. Res.* **190**, 77-83.
- Hu, B., Gong, Q. H., Wang, Y., Ma, Y., Li, J. B. and Yu, W. G. 2006. Prebiotic effects of neoagarooligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe* **12**, 260-266.
- Jang, H. J., Lee, D. G., Lee, S., Jeon, M. J., Chun, W. J., Kwon, K. K., Lee, H. S. and Lee, S. H. 2011. Isolation of a marine-derived *Flammeovirga* sp. mbr-1 strain and characterization of its agarase. *KSBB J.* **26**, 552-556.
- 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.
- Kim, B. J., Song, C. M., Ha, S. D., Hwang, S. H., Kim, H. J., Bae, S. K. and Kong, J. Y. 2000. Physicochemical properties of agarooligosaccharides for using as food stuffs. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**, 284-290.
- Kim, J. D., Lee, S. J., Jo, J. G., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2016. Characterization of  $\beta$ -agarase from isolated *Simiduia* sp. SH-4. *J. Life Sci.* **26**, 70-75.
- 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.
- 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.
- Lee, D. G., Kim, J. H. and Lee, S. H. 2021. Isolation of a *Pseudoalteromonas* sp. JH-1 producing agarase and characterization of its agarase. *J. Life Sci.* **31**, 496-501.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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  $\beta$ -agarase. *J. Life Sci.* **28**, 1056-1061.
- Ministry of Oceans and fisheries. 2019. Yearbook. pp. 251-257.
- Nawirska, A. and Kwasniewska, M. 2005. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chem.* **91**, 221-225.
- Oh, Y. H., Jung, C. K. 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.
- 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.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**, 61-73.
- Tawara, M., Sakatoku, A., Tiodjio, R. E., Tanaka, D. and Nakamura, S. 2015. Cloning and characterization of a novel agarase from a newly isolated bacterium *Simiduia* sp. strain TM-2 able to degrade various seaweeds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **177**, 610-623.
- Yoshizawa, Y., Ametani, A., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh, M., Fukui, F. and Kaminogawa, S. 1995. Macropha-

stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structure-function rela-

tionships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1933-1937.

## 초록 : 한천분해세균 *Simiduia* sp. SH-2 균주의 분리 및 $\beta$ -agarase의 특성조사

이동근 · 김근대 · 이상현\*  
(신라대학교 제약공학과)

본 연구에서는 해양 한천분해세균인 *Simiduia* sp. SH-2을 분리하여 생장과 agarase의 특성을 조사하였다. 경상남도 남해군 미조면 연안에서 채취한 해수를 Marine agar 2216 배지에 도말하여 한천분해활성을 보이는 SH-2 균주를 분리하였다. 선택된 SH-2 균주는 16S rDNA 염기서열분석을 통해 *Simiduia* sp. SH-2로 명명하였다. *Simiduia* sp. SH-2 균주의 배양액으로부터 한천분해효소를 획득하여 한천분해활성을 측정하였다. *Simiduia* sp. SH-2 유래 한천분해효소의 최고활성은 625 U/l로 나타났다. 한천분해활성은 40°C에서 최고치를 나타내었으며, 40°C에서의 활성을 100%로 하였을 때 20°C에서 31%, 30°C에서 71%의 상대활성을 나타내었다. 최적 pH는 pH 7.0으로 pH 7.0의 활성을 100%로 하였을 때 pH 6.0과 pH 8.0에서 각각 94%와 89%의 상대활성을 나타내었다. 한천분해효소는 20, 30°C에서 2시간 동안 열처리한 후에도 96%의 잔존활성을 나타내었고, 40°C에서 2시간 동안 열처리한 후에도 49%의 잔존활성을 나타내었다. *Simiduia* sp. SH-2는 neo-agarotetraose 및 neoagarohexaose 등의 neoagarooligosaccharides를 생성하여  $\beta$ -agarase를 생산하는 균주로 확인되었다. 따라서 *Simiduia* sp. SH-2 균주와 이 균주의  $\beta$ -agarase는 식품, 화장품, 의약품 산업에서 기능성 소재의 생산자로서 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.