

**Bacillus subtilis에서  $\beta$ -agarase의 분비형 과발현 및 효소분해산물의 항균활성**

장민경 · 이옥희 · 류기환 · 이동근 · 이상현\*

신라대학교 공과대학 생명공학과

Received October 17, 2007 / Accepted October 30, 2007

**Secretory Overexpression of  $\beta$ -Agarase in *Bacillus subtilis* and Antibacterial Activity of Enzymatic Products.** Min-Kyung Jang, OK Hee Lee, Ki Hwan Yoo, Dong-Geun Lee and Sang-Hyeon Lee\*. Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea - The gene for  $\beta$ -agarase of an *Agarivorans* sp. JA-1 was expressed in *Bacillus subtilis* DB104, 168 and ISW1214 strains for mass-production. Among 3 host strains, *B. subtilis* ISW1214 secreted the highest amount of recombinant  $\beta$ -agarase with a specific activity of 201 U/mg and 360 mg of protein into culture broth. This was approximately 130-fold higher than the production in *E. coli* as an expression host. Recombinant enzyme produced neoagarooligosaccharides such as neoagarohexaose, neoagarotetraose, and neoagarobiose from agar. Produced neoagarooligosaccharides showed antibacterial activities against gram-negative *E. coli* and gram-positive *B. subtilis* at a concentration of 1.5%. These data suggest that neoagarooligosaccharides could be an useful preservative for food industry.

**Key words :**  $\beta$ -agarase, antibacterial activity, neoagarooligosaccharides, secretory expression.

**서 론**

한천(agar)은 galactose의 중합체로 약 70%의 agarose와 30%의 agaropectin으로 구성되어 있는 다당류이며 홍조류의 세포벽에 존재한다[3]. 한천은 아이스크림 제조 등의 식품산업에 있어 첨가물로 사용되고 있으며 사람이 소화할 수 없는 다당류이어서 다이어트 식품 등의 재료로 널리 이용되고 있다[2].

$\beta$ -agarase (EC 3.2.1.81)는 agarose를 분해하여 전분노화방지 및 향균효과[8,9], 면역활성효과[16], 미백효과[7] 등이 있는 기능성 neoagarooligosaccharides를 생산할 수 있는 효소이다. 저부가가치인 한천의 단순가공품에 비해  $\beta$ -agarase 분해산물은 고부가가치 물질로서 식품산업, 화장품산업, 제약산업 등에 널리 사용될 수 있으므로 활성이 뛰어난  $\beta$ -agarase 유전자의 확보와  $\beta$ -agarase의 대량생산을 통하여 한천을 원료로 하는 고부가가치 소재산업의 창출이 가능할 것으로 기대된다. 이러한 이유로  $\beta$ -agarase를 생산하는 균주에 대한 보고가 지속적으로 이루어지고 있다[5,11-13]. 본 연구실에서는 제주도 연안에서 내열성  $\beta$ -agarase를 생성하는 *Agarivorans* sp. JA-1을 분리하였으며[13],  $\beta$ -agarase 유전자를 클로닝하고 대장균 숙주를 이용하여 배양액에서 560 U/l (specific activity 1.9 U/mg)의  $\beta$ -agarase 생산을 보고한 바 있다[11].

*E. coli*는 유전자 클로닝과 재조합 DNA를 이용한 단백질 생산에 많이 이용되는 숙주이다. 하지만 *E. coli*는 성장속도가 빠르며 형질전환을 쉽게 할 수 있는 장점이 있으나, 재조합

단백질의 분비생산이 어려운 단점이 있다. *Bacillus subtilis*는 포자형성, competence 발현 등의 특성이 있어 배양과 보관이 쉽고 병원성이 없으며 생산된 단백질의 대부분을 세포 외부로 분비하는 특성이 있어 재조합 단백질의 산업적 생산에 있어 *E. coli*보다 우수한 숙주로 평가되고 있다[6].

본 연구에서는 *Agarivorans* sp. JA-1 유래의 내열성  $\beta$ -agarase 유전자를 *B. subtilis*의 3가지 균주를 이용한 분비형 발현결과를 비교하여 최적 숙주를 선택하였으며, 재조합 효소에 의해 생산된 한천 가수분해산물의 항균능을 확인하였다.

**재료 및 방법****균주 및 배양조건**

*E. coli* DH5a (*F'* supE44 hsdS20 recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1)를 cloning의 숙주로 사용하였다. *B. subtilis* DB104 (*his*, *nprR2*, *nprE18*, *aprE A3*) 및 *B. subtilis* ISW1214 (*hsrM*, *leuA8*, *metB5*; *Tets*)는 (주)바이오 리더스(BioLeaders, Daejeon, Korea)에서 분양받았으며, *B. subtilis* 168 (ATCC 33234, KCTC 2217)과 함께 발현숙주로 사용하였다. 균주들의 배양은 37°C (250 rpm)에서 Luria-Bertani (LB) broth (Difco, USA)를 이용하였고, 필요에 따라 배지 1 ml 당 100  $\mu$ g ampicillin 혹은 10  $\mu$ g kanamycin을 첨가하였다.

 **$\beta$ -Agarase 유전자의 *B. subtilis*에서의 분비발현**

플라스미드 DNA 추출을 비롯한 일련의 분자생물학적 기법은 Sambrook 등[14]의 방법을 따랐다. *Agarivorans* sp. JA-1의  $\beta$ -agarase 유전자 증폭을 위한 template DNA는 앞서

\*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

보고한 pGEMTe-A\_sp\_b-agaE11 플라스미드 DNA를 이용하였다[11]. A\_sp\_b-agaE8-F (5'-GAATTCATATGGCTGCTACCTTAGTCACCTC-3', EcoRI-NdeI sites underlined)와 A\_sp\_b-agaE7-R (5'-GGATCCTACTCGAGCACTTTACGACGTCTTAG-3', BamHI-XhoI sites underlined)를 primer로 사용하여 Pyrobest DNA polymerase (Takara Bio Inc., Otsu, Japan)로 증폭한 후 pGEM-T Easy vector (Promega, WI, USA)에 ligation시켜 pGEMTe-A\_sp\_b-agaE87를 제작하였고, 이를 제한효소 EcoRI과 BamHI로 처리하여 생성된 2.9-kb의  $\beta$ -agarase 유전자 단편을 *B. subtilis* 발현벡터인 pLip (BioLeaders, Daejeon, Korea)에 삽입시켜 pLip-A\_sp\_b-agaE87를 제작하였다. 제작된 재조합 DNA들은 제한효소 처리에 의한 단편 및 염기서열 분석을 통하여 확인하였다. 3가지 종류의 *B. subtilis* strain들을 pLip-A\_sp\_b-agaE87로 형질전환시켰고 이들을 kanamycin (10  $\mu$ g/ml)이 첨가된 4 ml LB에서 진탕배양(37°C, 250 rpm)하였다. 배양시작으로부터 각각 5, 7, 9, 11 시간이 지난 후 배양액을 채취하여 원심분리(5,000  $\times$ g, 5 min)를 행하였으며, 상등액을 취하여 발현시료로 사용하였다.

pLip-A\_sp\_b-agaE87를 가지는 *B. subtilis* ISW1214를 kanamycin (10  $\mu$ g/ml)이 첨가된 LB 1 l에서 9시간동안 진탕배양(37°C, 250 rpm)하였고, 배양액을 채취하여 원심분리(5,000  $\times$ g, 5 min)를 행하였다. 상등액에 함유된  $\beta$ -agarase는 Centriprep Ultracel YM-10 (Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용하여 농축하였고 50 mM Tris/HCl (pH 7.4) 완충용액을 이용하여 투석을 행한 후 대량발현 효소시료로 사용하였다. 단백질의 정량은 BCA protein assay reagent (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 이용하여 행하였고, bovine serum albumin을 표준물질로 이용하였다.

## SDS-PAGE

SDS-PAGE는 11% polyacrylamide gel을 이용하여 Laemmli의 방법으로 행하였다[10]. 효소용액을 5분간 끓인 후 gel에 주입하였고 coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad, USA)으로 염색한 후 관찰하였다.

## $\beta$ -agarase 활성 측정

한천분해 효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogy-Nelson법으로 실시하였다[15]. 한천을 50 mM TAPS 완충용액 (pH 7.8, 1 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>)에 0.2% (w/v) 비율로 녹인 후에 재조합된  $\beta$ -agarase를 첨가하여 50°C에서 30분간 반응시켰다. 효소반응액 0.5 ml에 2.0 ml의 Somogy 시약 (10% CuSO<sub>4</sub> 80 ml, 1N NaOH 100 ml, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 71 g, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>KNa · 4H<sub>2</sub>O 40 g per dH<sub>2</sub>O 1 l)을 첨가하여 반응을 중지시키고 10분간 끓였다. 실온으로 냉각된 용액에 arseno-molybdate 시약을 첨가하고 14,000  $\times$ g

에서 5분간 원심분리한 상층액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1  $\mu$ mole의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit로 정의하였고 galactose (Sigma, MO, USA)를 이용하여 표준적정곡선을 작성하였다.

## 한천분해산물의 생산

한천 35 g을 50 mM TAPS 완충용액 (pH 7.8, 1 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) 665 ml에 넣고 90°C에서 10분간 가열한 후 50°C까지 냉각시키고, 한천 1 g 당 재조합 효소 0.3 U를 첨가하여 24 시간 반응시켰다. 이후 한천 1 g 당 재조합효소 2.0 U를 추가하고 45°C에서 24 시간 추가 반응시켰다

## 한천분해산물의 TLC 분석

$\beta$ -agarase에 의한 한천분해산물은 thin-layer chromatography (TLC)로 확인하였다[11]. 효소분해산물을 silica gel 60 TLC plates (Merck, Darmstadt, Germany)에서 n-butanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O (2:1:1, v/v/v)를 전개용액으로 사용하여 전개시켰고[3,4], 10% 황산용액을 뿌리고 80°C에서 가열하여 가시화하였다. 표준물질로 neoagarohexaose (Sigma), neoagarotetraose (V-Labs Inc., St. Covington, LA, USA), D-galactose (Sigma)를 사용하였다.

## 항균효과 측정

*B. subtilis*와 *E. coli*를 각각 50 ml LB 액체 배지에 접종하여 잘 섞은 후 10 ml씩 분주하고 한천분해산물을 0, 0.75, 1.5% 비율로 각각 첨가하였다. 이후 37°C, 250 rpm으로 배양하면서 2, 4, 6 시간제 시료를 채취하여 분광광도계로 600 nm에서 광학밀도를 측정하여 성장양상을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 발현속주에 따른 발현양상 비교

발현속주로 사용된 *B. subtilis* 168, DB104, ISW1214의 3가지 균주에서 배양시간별로 보이는  $\beta$ -agarase 발현량을 Fig. 1에 나타냈다. *B. subtilis* 형질전환체가 생산하는  $\beta$ -agarase의 분자량은 109 kDa으로 (Fig. 1) 대장균에서 생산된 것과[11] 동일한 것으로 나타났다. 168 균주는 배양 9시간 후에 재조합효소가 관찰되었으며 DB104와 ISW1214 균주는 배양 7시간 후부터 재조합효소가 관찰되었다 (Fig. 1). ISW1214 균주에서 배양 9시간에 최대발현량을 나타냈으므로 발현속주로 *B. subtilis* ISW1214 균주를 선택하였다. *E. coli* BL21(DE3)를 발현속주로 사용한 경우는 분비생산이 되지 않아 세포내에 생산된 많은 종류의 단백질을로부터 정제과정을 거쳐 목적 단백질을 분리해내야 하는데 반해[11], *B. subtilis*를 발현속주로 사용한 경우는 목적 단백질과 함께 분비되는 단백질의 양과 종류가 훨씬 적어 효소시료의 제조가 용이할 것으로 기대

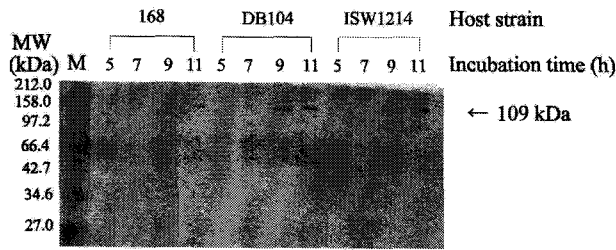


Fig. 1. Expression pattern of recombinant  $\beta$ -agarase by culture times from *B. subtilis* strain 168, DB104 and ISW1214 cells harboring pLip-A\_sp-b-agaE87. The arrow indicates the position of  $\beta$ -agarase. Lane M is size marker.

된다.

*B. subtilis* ISW1214를 발현숙주로 사용하여 1 l의 배지에서 9시간 배양한 후, 재조합  $\beta$ -agarase를 포함하는 배지를 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer로 투석하고 농축하여 얻은 효소시료를 SDS-PAGE에서 확인하였다. 그 결과, 배양액의 투석 및 농축과정만으로도 109 kDa의  $\beta$ -agarase에 해당하는 순수한 단백질 band를 얻을 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이 조건에서 생산된 총 단백질량은 360 mg/L, 총 효소활성은 52,460 U/L, 비활성은 201 U/mg이었다. 본 연구와 동일한  $\beta$ -agarase를 *E. coli* BL21(DE3)에서 생산한 경우 [11]와 비교하면 총 효소활성은 약 90배, 비활성은 약 100배 증가한 것으로 나타났다. Ohta 등[12]은 *Agarivorans* sp. JAMB-A11 유래의  $\beta$ -agarase 유전자를 *B. subtilis* 균주에서 발현시켜 총 단백질 1,662 mg/L를 생산하였지만 비활성은 0.8 U/mg로 나타났다. 이 결과들을 비교해보면 총 효소활성은 Ohta 등[12]의 연구결과에서 더 높게 나타났지만, 비활성의 경우는 본 연구결과에서 더 높게 나타났으므로 추후 대량 생산 공정개발을 위한 조건 확립에 참고가 될 수 있는 결과라 하겠다. *B. subtilis* 균주를 이용한 재조합효소의 장점은 외분비형으로 세포과피 없이 다량의 효소를 생산할 수 있다는 것과 [6] 재조합 산물의 안전성 [12]을 들 수 있다. Ohta 등 [12]

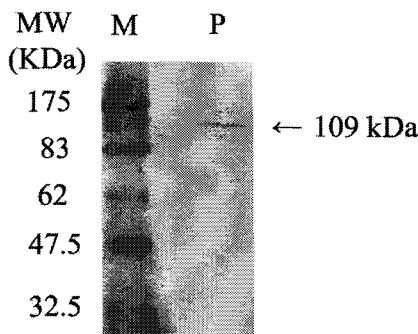


Fig. 2. SDS-PAGE of dialyzed and concentrated  $\beta$ -agarase from *B. subtilis* strain ISW1214 cells harboring pLip-A\_sp-b-agaE87. Lane M, size marker, lane P, produced enzyme. The arrow indicates the position of  $\beta$ -agarase.

은 *Agarivorans* 속의 생물위해성에 대한 평가가 완전하지 않으므로 *B. subtilis* 균주를 이용한  $\beta$ -agarase의 생산이 안전하고 효율적이라고 보고하였다.

### 한천분해산물의 생산

재조합  $\beta$ -agarase로 한천(agar)을 분해하여 얻어진 분해산물인 neoagarooligosaccharides를 TLC로 분석한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 재조합  $\beta$ -agarase로 한천을 분해한 결과, neoagarobiose, neoagarotetraose 및 neoagarohexaose 등을 포함하는 neoagarooligosaccharides를 생산할 수 있었다(Fig. 3). 일반적으로  $\beta$ -agarase는 agarose를 가수분해하여 neoagarobiose, neoagarotetraose, neoagarohexaose 등의 neoagarooligosaccharide를 생산하는 것으로 보고되었다 [14]. 한천은 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있어 [3]  $\beta$ -agarase가 agaropectin을 분해할 수 없는 한계점이 있어 한천을 기질로 사용하면 기능성을 가진 순수한 neoagarooligosaccharides만을 생산하기 어려운 단점이 있을 수 있지만, 본 연구에서는 고가의 agarose 대신 저가의 한천을 기질로 사용하여 기능성 소재의 생산을 시도하였으므로 산업적 의의가 있는 결과로 판단된다.

### 한천분해산물의 항균성

한천분해산물의 첨가에 따른 *B. subtilis* 168과 *E. coli* DH5 $\alpha$ 의 성장저해 양상을 Fig. 4에 나타냈다. 두 균주 모두 1.5%의 농도에서 성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었으며, 항균효과는 그람 음성균인 *E. coli* (IC<sub>50</sub>: >1.5%) 보다 그람 양성균인 *B. subtilis* (IC<sub>50</sub>: 1.5%)에 대해 더 크게 나타났다. 이러한 결과로, 본 연구결과로 생산된 한천분해산물은 식품산업 등의 천

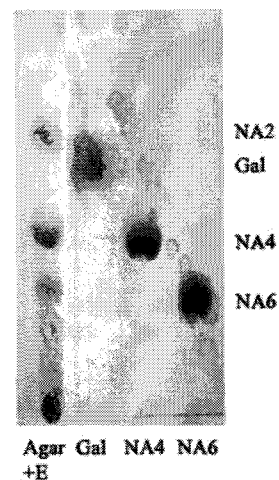


Fig. 3. TLC analysis of the product from agar hydrolyzed by recombinant  $\beta$ -agarase. Gal, NA2, NA4 and NA6 represent D-galactose, neoagarobiose, neoagarotetraose and neoagarohexaose, respectively. Agar+E indicates the hydrolyzed product.

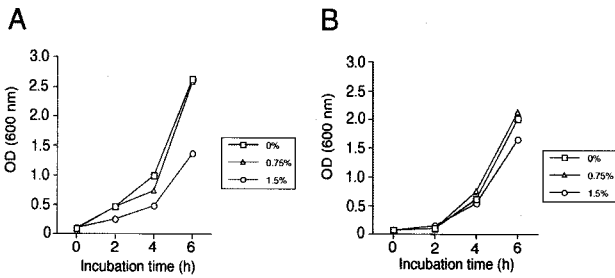


Fig. 4. Antibacterial activities of the neoagarooligosaccharides produced from agar by recombinant  $\beta$ -agarase against (A) gram-positive *B. subtilis* and (B) gram-negative *E. coli* cells.

연 항균제로서의 이용가능성이 있을 것으로 기대된다.

### 요약

*Agarivorans* sp. JA-1 유래의 내열성  $\beta$ -agarase 유전자의 분비형 과발현과 재조합 효소분해산물의 항균효과를 확인하였다. *B. subtilis* 168, DB104, ISW1214의 3가지 재조합발현 숙주를 비교하여 ISW1214 균주가 LB배지에서 배양 9시간에 총 효소활성 52,460 U과 비활성 201 U/mg의 최대 발현량을 보이는 것을 확인하였다. 이는 *E. coli* BL21 균주에 비해 총 효소활성은 약 90배, 비활성은 약 100배 증가한 결과이다. 재조합  $\beta$ -agarase의 기질로 저가의 한천을 사용하여 neoagarobiose, neoagarotetraose 등의 neoagarooligosaccharide를 생산하였으며, 생산된 neoagarooligosaccharides는 그람 양성 세균인 *B. subtilis*와 그람 음성 세균인 *E. coli* 모두의 성장을 저해하는 항균활성이 있음을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 생산된 재조합  $\beta$ -agarase와 재조합 효소의 한천분해산물은 식품산업 등에 사용가능한 천연 항균제 생산에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

### 감사의 글

이 논문은 해양수산부 주관 마린바이오21사업 해양·극한 생물 분자유전체연구단의 지원을 받아 수행되었습니다.

### References

1. Araki, T., Z. Lu and T. Morishita. 1998 Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verucosa* (Rhodophyta). *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 193-197.
2. Do, J. H. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish. Soc.* **30**, 423-427.
3. Duckworth, M. and W. Yaphe. 1971. Structure of agar. I.

Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**, 189-197.

4. Groleau, D. and W. Yaphe. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of  $\beta$ -neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **23**, 672-679.
5. Kim, B. J., H. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang, D. S. Byun, T. H. Lee and J. Y. Kong. 1999. Purification and characterization of  $\beta$ -agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Biotechnol. Lett.* **21**, 1011-1105.
6. Kim, K. H., J. Y. Kim, H. B. Kim and D. S. Lee. 2001. Expression of a  $\beta$ -1,3-glucanase gene from *Bacillus circulans* in *B. subtilis* and *B. megaterium*. *Kor. J. Microbiol.* **37**, 253-258.
7. Kobayashi, R. M. Takisada, T. Suzuki, K. Kirimura and S. Usami. 1997. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 62-63.
8. Kohno, T., H. Kitagawa, T. Hiraga. 1990. Production of hetero-oligosaccharides. pp. 87-105, In Kukami, G. K. (ed.), *Shokuhin sangyo bioreactor system*, Jissen bioreactor, Shokuhin Kagaku Shimbunsa, Tokyo.
9. Kono, T. and H. Hidaka. 1989. Properties and production of neoagarooligosaccharide. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **63**, 1126 - 1129.
10. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
11. Lee, D. G., G. T. Park, N. Y. Kim, E. J. Lee, M. K. Jang, Y. G. Shin, G. S. Park, T. M. Kim, J. H. Lee, S. J. Kim and S. H. Lee. 2006. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50 beta-agarase from a marine *Agarivorans* isolate. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1925-1932.
12. Ohta, Y., Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, Y. Hatada, S. Ito and Koki Horikishi. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable  $\beta$ -agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. *Biosci. Biotech. Bioch.* **68**, 1073-1081.
13. Park, G. T., D. G. Lee, N. Y. Kim, E. J. Lee, J. G. Jung, J. H. Lee, M. S. Heo and S. H. Lee. 2005. Isolation and characterization of a marine bacterium producing thermo-tolerant agarase. *J. Life Sci.* **15**, 884-888.
14. Sambrook, J. and D. W. Russell. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, New York.
15. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
16. Yoshizawa, Y., A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui and S. Kaminogawa. 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structurefunction relationships and improved solubility. *Biosci. Biotech. Bioch.* **59**, 1933-1939.