

## The Classification, Origin, Collection, Determination of Activity, Purification, Production, and Application of Agarases

Dong-Geun Lee and Sang-Hyeon Lee\*

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

Received January 31, 2012 / Revised February 6, 2012 / Accepted February 9, 2012

Agar is a cell wall component of macro red algae that can be hydrolyzed by agarase. Agarases are classified into  $\alpha$ -agarase (E.C. 3.2.1.158) and  $\beta$ -agarase (E.C. 3.2.1.81), in accordance with their cleavage pattern, and can be grouped in the glycoside hydrolase (GH)-16, -58, -86, -96, and -118 family according to the amino acid sequences of the proteins. Many agarases and/or their genes have been detected, isolated, and recombinantly expressed from bacteria, and metagenomes have their origins in sea and terrestrial environments. Products of agarases, agarooligosaccharides and neoagarooligosaccharides, represent wide functions such as antitumor, immune stimulation, anti-oxidation, prebiotic, hepa-protective, antibacterial, whitening, and moisturizing effects; hence, broad applications would be possible in the food industry, cosmetics, and medical fields. In addition, agarases are also used as a tool enzyme for research. This paper reviews the sources, purifications and detection methods, and application fields of agarases. The role of agarases in agar metabolism and the function of their enzymatic products are also surveyed.

**Key words** : Agar, agarase, agarooligosaccharide, GH family, neoagarooligosaccharide

### 서 론

Galactan은 가수분해하면 대부분 또는 모두 galactose가 되는 다당류이다. 한천(agar)은 galactan에 속하며 홍조류에 많이 함유되어 있고 agarose와 agaropectin으로 이루어진 혼합물이다. Agarose는 D-galactose와 3,6-anhydro-L-galactose (AHG)가 단위체로 이들이 교차 결합하여 직쇄구조로 되어 있으며 겔(gel) 형성능력이 강하다. Agaropectin은 agarose와 같이 agarobiose 단위로 되어 있으나 황산기 등의 산성기를 함유하며 겔 형성능력이 약하다. 해조류인 *Chondrus crispus* 등에서 얻어지는 고점성의 galactan을 carrageenan이라 하며 식품의 젤리화제로 널리 이용되고 있다[57].

한천은 그 자체로 식품산업과 의약품, 화장품 산업 등에 이용되지만 한천의 효소분해산물인 한천올리고당(agarooligosaccharides)이나 네오한천올리고당(neoagarooligosaccharides)은 항암 효과, 면역증진 효과, 항산화 효과, prebiotic 효과, 간보호 효과, 항균 효과, 미백 효과, 보습 효과 등의 다양한 기능성이 보고되어 있어 고부가가치 기능성물질의 가능성이 매우 높다. 따라서 한천을 분해하는 효소인 agarase와 agarase를 생산하는 세균을 탐색하기 위해 많은 연구가 진행되었으며 저자들도 한천 분해세균의 탐색, agarase 유전자 확보 및 재조합 발현, 기존 agarase 유전자의 돌연변이를 통한 특성 개선, agarase를 이용한 한천분해산물의 제조와 그 기능성 등을 보고하였다

[54-56,75-79]. 또한, 최근에는 해조류를 이용한 바이오에탄올 생산에 있어 agarase의 유용성이 부각되는 등 agarase에 대한 관심이 고조되고 있다[66].

이에 저자들은 한천분해세균 및 agarase의 활성 검출법, 한천의 효소분해산물의 기능성, agarase 유전자의 이용 등에 대한 총설을 통하여 최근까지의 연구동향을 정리하고 향후 다른 연구에 도움이 되고자 하였다.

### 한 천(agar)

#### 한천의 유래

해조류는 중성다당류로 전분과 셀룰로오스 외에 육상식물과 구분되는 한천, 카라기난 등 황화된 다당류를 풍부하게 가지고 있다[70]. 다양한 해양거대조류의 구성성분인 황함유 다당류의 구조에 대한 총설도 보고된 바 있다[57].

한천은 홍조류인 *Photophyta*에 속하는 종(species)에서 유래하며 우뭇가사리(천초, *Gelidium*), 석무, 꼬시래기 등의 다당을 뜨거운 물로 추출한 후 냉각하여 우무(hydrogel)로 만든 다음, 겔의 98-99%를 차지하는 수분을 제거하여 만든 것이다. 한천의 원료가 되는 홍조류는 세계적으로 13속 85종에 이른다[50].

#### 한천의 특성과 이용성

한천 다당류는 친수성 고분자로 콜로이드의 성질이 있어 0.2~0.3%의 농도로도 겔 형성능이 있으며 85°C 이하에서는 녹지 않아 식품산업에서 고온으로 제조되는 빵 제품과 과자류의 안정제로 널리 사용되고 있으며, 우유, 유제품, 청량음료 등의

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636  
E-mail : slee@silla.ac.kr

생산에도 이용되고 화장품과 약품 등의 안정제로 많이 쓰이고 있다. 즉, 식품산업에서 겔화제, 안정제, 점증제, 변색방지제, 청정제로 사용되고 있고, 연구개발 분야에서도 통상적인 배지용 겔화제 이외에 식물의 조직배양용 배지의 겔화제로도 쓰이며, 의약분야에서는 치과인상제 등으로도 사용된다[50].

한천의 조성과 구조

홍조류는 세포벽의 최대 70%까지 한천성분을 함유하는데 [89], 한천은 agarose가 70%이며 agarpectin이 30% 정도로 구성되어 있고 단위체인 단당류가 2종류인 복합다당류 (heteropolysaccharide)이다. Agarose는 곁가지가 없는 직쇄형의 중합체인 중성 다당류이고 agarpectin은 곁가지가 있는 중합체인 산성 다당류로 황, 메틸, 피루브산, glycosyl 기 등이 곁합되어 있다[6]. Agarose는 겔형성 특성이 높고, agarpectin은 액체성질의 점성과 고체성질인 탄성의 중간인 점탄성이 높다[50].

홍조류의 세포벽을 구성하는 단위체의 곁합은 3번 탄소가 곁합된 β-D-galactopyranosyl (G) 잔기와 4번 탄소가 곁합된 α-D- 혹은 L-galactopyranosyl (D 혹은 L) 잔기의 곁합이 있는데, agar는 L form 잔기를 가지고 carrageenan은 D form 잔기를 가진다. 황함유 다당류는 carrageenan (G-D), agaran (G-L) 과 함께 α-곁합된 galactose가 3,6-anhydro 곁합을 갖는 3,6-anhydro-α-L 혹은 D-galactose의 위치 차이에 따라 carrageenose (G-DA), agarose (G-LA) 등으로 나뉜다[71].

한편, agarose의 구성성분인 neoagarobiose의 neo-는 비환원말단이 수화되지 않은 올리고당에 붙는 접두사이다[47]. Neoagarobiose (NA2)와 agarobiose의 구성단위체는 galactose와 AHG로 동일하지만, neoagarobiose는 3,6-anhydro-α-L-galactopyranosyl-(α1→3)-D-galactose의 구조이며, agarobiose는 β-D-galactopyranosyl-(β1→4)-3,6-anhydro-L-galactose의 구조이다(Fig. 1). Agarose는 전체적으로 선형구조를

갖는 agarose 직쇄가 twisted ribbon 구조와 유사한 double-helical 구조를 형성하여[7] 쉽게 분해가 되지 않는데 (α1→3) 곁합을 분해하는 α-agarase와 (β1→4) 곁합을 분해하는 β-agarase는 agarose를 분해할 수 있다(Fig. 1).

황화다당류에는 agar 및 carrageenan 이외에도 130종 이상의 *Porphyra* 속에서 유래된 porphyran이 있는데, porphyran은 세포벽이나 세포사이에 존재하는 물질로 기본구조는 agarose와 유사하고 D-galactose의 6번 탄소가 메틸화되어 있지만 [149] agarase에 의해 분해될 수 있다[23]. 이는 일부 agarase는 기질 특이성이 높지 않아 구조적으로 유사한 porphyran을 분해할 수도 있다는 것을 나타내며[18,22,125,131], agarase 탐색에 이용될 수 있을 것이다.

세균에 의한 한천의 분해

전 지구적인 탄소순환에 있어 세균의 역할이 중요한데 홍조류의 생물량 분해에는 한천분해효소인 agarase와 카라기난 분해효소인 carrageenase 등을 생산하는 미생물들의 역할이 중요하므로[90], 이에 근거하여 agarase 생산 미생물을 탐색할 수 있다. 한천을 에너지원과 탄소원으로 이용하기 위해서는 다당류인 한천을 분해하여 올리고당으로 만들고 이를 다시 단당류로 전환하는 과정이 필요하다. *Pseudalteromonas atlantica*는 분비형 agarase로 agarose를 neoagarotetraose로 분해한 후 원형질막주위 효소(periplasmic enzyme)인 다른 agarase가 neoagarotetraose (NA4)를 neoagarobiose (NA2)로 분해하고 역시 원형질막주위 효소인 neoagarobiose hydrolase (NABH)에 의해 단당류인 D-galactose와 AHG가 생성되며 세포질에서 이용된다[80,94]. 원형질막주위 효소인 agarase는 세포내에서는 β-neoagarotetraose hydrolase라는 명칭으로 보고되었다[6]. *Vibrio* sp. JT0107 [121,124]은 분비형 agarase가 agarose를 NA2와 NA4로 분해한 후, 원형질막주위 효소인 α-L-galactosidase가 neoagarooligosaccharides의 비환원말단에서 α(1,3) 곁합을 끊어 단당류를 생산한다. *Bacillus* sp. MK03은 agarase에 의해 생산된 NA4 혹은 neoagarohexaose (NA6)의 비환원말단에 있는 α(1,3) 곁합을 α-neoagarooligosaccharide hydrolase에 의해 절단하여 AHG와 agarotriose 혹은 agaropentaose를 생산한다[126].

*Saccharophagus degradans* 2-40에 agarose를 탄소원으로 공급하면 다른 탄소원들이 이용하지 않는 이화경로를 사용하고 아미노산과 핵산 생합성의 중간체들이 증가하였다는 보고가 있어[117], 향후 기초연구와 응용연구에 이용이 가능할 것으로 기대된다.

한천분해산물의 기능성

한천과 같은 황함유 다당류와 한천 분해산물은 항응고 작

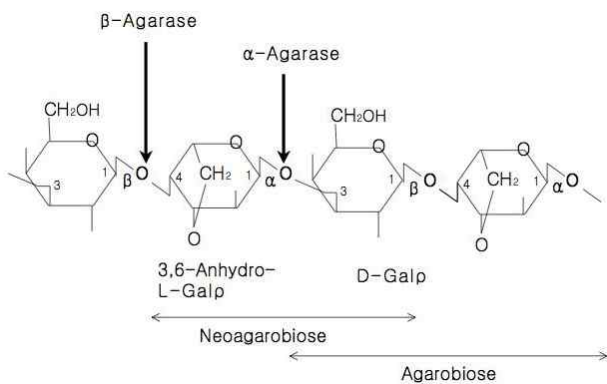


Fig. 1. Structure of agarobiose and neoagarobiose. Agarose are composed of the repetition of neoagarobiose or agarobiose subunit. Catalytic sites of α-agarase and β-agarase were also represented.

용, 항바이러스 작용, 면역-염증 작용 등 다양한 생물학적 활성을 나타내어 식의약(neutraceutical) 식품, 기능성 식품, 화장품 및 의약품에 응용이 가능하다[57]. 한천의  $\beta$ -agarase 산물인 네오한천올리고당의 기능성은 많이 보고되고 있는데, 항암 기능[28], 대식세포 활성화[144], 자유라디칼과 과산화라디칼 및 지질의 과산화를 방지하는 항산화 활성[16,101,139], 장내세균의 활성화로 건강에 도움을 주는 prebiotic 효과[51], 활성산소종(ROS)으로부터 간을 보호하는 효과[17], 미생물성장을 저해하는 효과[33,54] 등이 있다. 한편,  $\alpha$ -agarase가 한천에 작용하여 생산되는 한천올리고당의 기능성도 보고되어 있는데, 항산화 활성과 항암 활성 등이 있으며[103], 홍조류의 구성성분인 porphyrin의  $\alpha$ -agarase 분해산물로 자유라디칼과 과산화라디칼을 제거하는 항산화 활성이 있다[38].

특히, NA2는 미백 효과와 보습 효과를 동시에 가지는 것으로 보고되었는데 100 mg의 NA2가 피부보습제로 사용되는 sodium hyaluronate나 glycerol보다 많은 30 mg 이상의 물을 함유하였다[72]. NA2는 형성된 멜라닌 색소의 감소가 아닌 tyrosinase의 활성을 저해하여 멜라닌의 생합성을 저해하는 기작으로 이는 상업적으로 이용되는 kojic acid나 arbutin과 동일한 미백 기작이지만[68,72,76] kojic acid나 arbutin과 달리 세포독성이 없어[76] 향후 응용가능성이 높다고 할 수 있다. Jang 등[56]은 NA4 처리된 멜라노마(melanoma) 세포의 멜라닌 함량이 kojic acid나 arbutin 처리한 경우와 유사하고 세포독성은 없다고 보고하였다.

### Agarase의 분류와 기원

기능성이 우수한 한천분해산물의 제조에는 한천분해효소

인 agarase가 많이 사용되는데 Fu 등[32]이 2010년 1월에 agarase의 위치와 특성 등을 보고하였다. Table 1은 pubmed에서 2009년부터 현재까지의 agarase 관련 보고를 검색한 후 Fu 등[32]의 보고와 중복되지 않게 정리한 agarase의 기원과 특성들이다.

#### Agarase의 분류

Agarase의 분류는 4가지 기준으로 나눌 수 있다.

첫째, 반응양식에 따라  $\alpha$ -agarase (EC 3.2.1.158)와  $\beta$ -agarase (EC 3.2.1.81)로 나눌 수 있다(Fig. 1).  $\alpha$ -Agarase는 agarose 3-glycanohydrolase라고도 하며 agarose를 기질로 하여 (1→3)- $\alpha$ -L-galactosidic 결합을 끊어 agarotetraose 혹은 agarobiose를 최종산물로 생산한다. 현재까지 *Alteromonas agarilytica*[111]와 *Thalassomonas* sp.[103]에서만 보고되고 있다. 지금까지 보고된 대부분의 agarase는  $\beta$ -agarase인데 agarose 4-glycanohydrolase라고도 불리며 agarose의 (1→4)- $\beta$ -D-galactosidic 결합을 끊어 neoagarohexaose (NA6), NA4, NA2 등의 산물을 형성한다[48].

둘째, 효소를 구성하는 아미노산의 상동성을 기준으로 GH (glycoside hydrolase) family로 분류하는 것이다[15]. Cazy database (<http://www.cazy.org/>)를 보면 2012년 1월 현재  $\beta$ -agarase에는 GH16, GH50, GH86, GH118, GH NC (not classified) families 등 총 5개의 family가 있으며,  $\alpha$ -agarase에는 GH96 family 하나만 있다[29]. 각 family에 속하는 효소들은 catalytic domain과 최종산물이 서로 다른데, GH50은 NA2 혹은 NA2와 NA4의 복합체를 생산하고, GH16은 NA4만 생산하며, GH86은 NA8과 NA6를 생산한다[32]. Michel 등[90]은 GH16, 50, 82, 96을 생산하는 미생물들을 분류하였다. 최근에

Table 1. Properties and main end products of agarases reported from 2009

Organism	Optimal condition		End product	Reference
	pH	Temp. (°C)		
<i>Acinetobacter</i> sp. AG LSL-1	6	40	NA2	74
<i>Agarivorans albus</i> QM38	7.6	35	NA6, NA4	142
<i>Agarivorans albus</i> YKW-34	7	30	N.D.	31
<i>Cellvibrio</i> sp. KY-YJ-3	7	35	NA6, NA4, NA2	112
<i>Flammeovirga yayeyamensis</i> YT	8	40	NA4, NA2	143
<i>Microbulbifer</i> sp. SD-1	6	30	N.D.	65
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AG4	5.5	55	NA6, NA4, NA2	101
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CY-24	6.5	40	NA6, NA4	85
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	7	35	N.D.	102
<i>Saccharophagus degradans</i> 2-40	7	30	NA2	67
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	7	40	NA2	129
<i>Thermoanaerobacter wiegandii</i> B5	5.2	70	N.D.	9
<i>Vibrio</i> sp. CN41	7.5	40	NA4	82
<i>Zobellia galactanivorans</i> (mut AgaA)	7.5	45	NA6, NA4	79
<i>Zobellia galactanivorans</i> (mut AgaB)	7.5	45	NA6, NA4, NA2	55

Overlapped agarases with Fu *et al.* [32] were excluded. NA2, NA4 and NA6 represent neoagarobiose, neoagarotetraose and neoagarohexaose, respectively. N.D. means not defined.

분류된 GH118 family에 속하는 agarase는 2006년 새로운  $\beta$ -agarase가 발견된 *Vibrio* sp. PO-303[19], *Pseudoalteromonas* sp. CY24, *Agarivorans* sp. HZ105, *Alteromonas* sp. X3 및 *Coralimargarita akajimensis* DSM 45221의 다섯 균주의 효소만이 보고되어 있다[46]. *Vibrio* sp. PO-303유래의 GH118 family  $\beta$ -agarase는 neoagarodecaose (NA10) 보다 큰 것을 기질로 인식한다고 보고되었다[19]. 현재, GH50, 86, 96, 118 families에는 agarase 효소들만 속하지만, GH16 family에는  $\beta$ -agarase 외에 caraggeenase, endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase 등이 속해 있고, 이들은 단백질의 접힘(folding) 구조가 서로 유사하다[73]. 탄수화물을 분해하는 효소들은 carbohydrate-binding module (CBM)을 가지고 있는데[15], CBM은 다당류의 결정질(crystalline) 구조를 파괴하여 catalytic domain의 작용을 도와 준다[134]. Agarase는 CBM Family 6 (CBM6)과 CBM Family 13 (CBM13)을 가지고 있는데 이들은 agarase 이외에 cellulose, xylanase, glucanase, glycoside hydrolases 및 glycosyltransferases 등에서도 발견된다. CBM 6을 가지는 agarase는 agarose 사슬의 비환원말단에 결합하여 첫 번째 이당류 단위를 인식한다.

셋째, 세포에서의 위치에 따라서 분비형[121,124], 세포표면형[6,94], 세포질형[68] 효소로 나눌 수 있다. 분비형은 배지 상에서 한천고분자를 분해하여 한천올리고당이나 네오한천올리고당을 형성하므로 효소의 존재를 육안으로 검출하기 용이하지만, 세포표면형은 검출이 용이하지 않고 이종 숙주에서의 생산의 경우에도 활성이 낮게 검출될 수 있다. 한편, 세포질형은 세포를 파쇄하기 전에는 검출이 용이하지 않으므로 agarase의 이종 숙주에서의 생산에서는 분비형 효소가 많이 이용된다.

마지막으로 기질의 종류(NA4, NA6, NA8, NA10 등)에 따라 분류할 수 있다. NA6의 NA4 단위를 인식하여 분해하지만 NA4는 분해하지 못하는 agarase[20,53,68,76,104,106,115,127], NA4와 NA6 등의 기질에서 NA2 단위를 인식하고 NA2가 주 산물인 agarase[4,105,123], 그리고 NA6 단위를 인식하지 못하는 agarase[107], NA10을 인식하지만 NA6와 NA8을 인식하지 못하는 agarase[19] 등이 있다. 이 분류법은 GH family 분류법과 일부 중복되는 경우가 있어 향후 추적이 필요할 것으로 판단된다.

#### Agarase를 생산하는 생물의 분포

현재까지 보고된 agarase를 생산하는 생물로는 식물인 인삼[14], 해조류를 섭취하는 무척추 해양동물[27]과 초식어류[119]가 소수 보고되고 있지만, agarase를 생산하는 대부분의 생물은 미생물로서 특히, 세균이 주를 이루고 있다. 해조류를 분해하는 효소는 전복 등 무척추 해양동물[27]과 초식어류[119] 등에서 숙주가 분비하는 내재성(endogenous) 효소와 공생미생물이 분비하는 외재성(exogenous) 효소로 분류된다.

Erasmus 등[27]은 전복을 무균으로 배양하여 간이자(hepatopancreas)에 내재성 agarase가 존재하는 것을 밝혔고 무균배양하지 않았을 때에는 공생미생물의 70-90%가 다당류 분해효소를 분비하는 것을 밝혔다. Oh 등[102]은 조개의 내장에 공생하는 세균들에서 한천을 분해하는 세균을 분리하였다.

Agarase를 생산하는 세균의 채취원은 1902년에 Gran이 해수에서 최초로 한천을 분해하는 세균을 분리한 이후에 해수가 주류를 이루었으나, 이외에도 질병이 있는 홍조류 표면[84,115], 해수퇴적물[19], 해수와 담수가 만나는 기수지역[26], 염습지[67], 강[112,136], 호수[151], 온천[9], 폐수[42], 토양[127], 육식식물의 뿌리[44], 지하[87] 등도 포함되었다.

#### 한천분해세균의 종류

한천을 분해하는 세균 혹은 유전자를 확보하는 방법은 크게 배양법과 비배양법으로 나눌 수 있는데, 주로 해양유래의 시료를 활용한 배양법이 보고되었지만 최근에는 비배양법도 보고되고 있다. 육지와 다른 환경인 해양에는 '서식지관련 특성'을 보이는 다양하고 독특한 효소의 확보가 가능한데, 해양환경에서 생축매를 확보하는 방안으로는 공생미생물, 극한미생물, 메타게놈 등을 이용하는 것이다[130].

배양법을 통하여 agarase 및 agarase의 유전자를 확보하는 방법으로는 세균을 한천배지에 배양하여 세균집락(colony)의 주위가 파지거나 분해되는 현상을 이용하는 것이다. 이러한 방법으로 보고된 해양유래 세균의 속(genus)은 *Agarivorans* [31,75,76,105], *Alterococcus* [116], *Alteromonas* [68,99,111], *Aquimarina* [83], *Coralimargarita* [88], *Cytophaga* [22,136], *Flammeovirga* [143], *Glaciecola* [78,145], *Microbulbifer* [65,106,107], *Microscilla* [152], *Pseudoalteromonas* [85,86,101,102,115], *Pseudomonas* [6,10,61,94], *Pseudozobellia* [96], *Saccharophagus* [26,36,67,117,148], *Simidiua* [64], *Thalassomonas* [77,103], *Thermoanaerobacter* [9], *Vibrio* [150], *Zobellia* [55,79] 등이며, 비해양유래 세균의 속으로는 *Acinetobacter* [74], *Asticcacaulis* [44], *Bacillus* [52], *Caldanaerobacter* [9], *Cellvibrio* [112], *Cytophaga* [138], *Alteromonas* [1], *Cellulophaga* [59], *Paenibacillus* [132], *Spirochaeta* [151], *Streptomyces* [12], *Thermoanaerobacter* [9], *Thermococcus* [87] 등이 있다. 독특하게는 지하 2,350 m에 위치한 고온의 oil-reservoir에서 검출된 호열성 세균인 *Thermococcus sibiricus* [87]에서 agarase 활성이 검출되었으며 플라스미드를 제거하면  $\beta$ -agarase의 활성이 사라지는 *Microscilla* sp.도 있어[152], 플라스미드를 이용한 agarase 유전자의 수평적 전달의 가능성도 생각해볼 수 있다. Hehemann 등[39]은 인간의 게놈에는 그 유전자가 없고 장내 미생물에 의해 공급되는 것으로 알려진 효소인 CAZyme들의 분석하였는데, 해조류 섭취가 많은 일본인에게서 발견된 장내 세균인 *Bacteroides plebeius*에서는  $\beta$ -agarase와 porphyranases 유전자 등이 검출된 반면 북미인의 *B. plebeius*에서는 검출되지

않았다. 검출된  $\beta$ -agarase와 porphyranases 유전자는 *Zobellia galactanivorans*의 유전자와 일치하였고, 따라서 이 현상을 수평적 전달로 파악하였다[39].

### Agarase의 유전자 확보

한천분해 활성이 있는 세균에서 agarase의 유전자를 확보하는 방법으로 기존 보고된 염기서열이나 아미노산서열을 이용하는 방법과 기존 서열에 대한 정보 없이 확보하는 방법으로 나눌 수 있다.

기존 agarase의 유전자서열 정보를 이용한 신규 agarase의 유전자 확보

이 접근법은 이미 알려진 agarase 유전자가 알려진 세균과 동일한 속의 세균과 유연관계가 있는 세균에서 agarase 유전자를 탐색하고 확보하는 경우에 이용될 수 있는데, 기존의 *Pseudalteromonas* 속 세균이 갖는 agarase 유전자 서열을 기반으로 제작된 PCR primer를 이용하여 새로운 agarase 유전자를 확보한 보고[101]와 *Agarivorans*와 *Vibrio*의 유연관계가 높은 점을 이용하여 *Vibrio* sp. JT0107의  $\beta$ -agarase 유전자[125]를 기초로 PCR primer를 제작하여 *Agarivorans* sp. JA-1의  $\beta$ -agarase 유전자의 확보에 이용한 보고가 있다[75].

기존 agarase의 유전자서열 정보 없이 신규 agarase의 유전자 확보

이 접근법은 기존 서열 정보의 이용이 어려운 경우에 사용되는데, agarase를 정제하고 부분적 아미노산서열을 파악하여 이를 토대로 PCR primer를 제작하여 유전자를 확보하는 방법, 서열 혹은 기능 기반의 게놈라이브러리 분석하는 방법, degenerative primer를 이용한 유전자 확보방법 등이 있다.

첫째, 위 3가지 방법이 모두 동원된 보고를 보면 한천분해 활성이 있는 *Alteromonas agarilytica*의  $\alpha$ -agarase를 분리정제한 후 효소의 N-말단과 internal peptide 서열에 근거하여 degenerative PCR primer와 표지자(probe)를 제작한 후, *A. agarilytica*의 게놈라이브러리에서 서열기반으로 agarase 유전자의 단편을 함유한 집락(colony)을 탐색하고, 이후 완전한 염기서열을 분석하여  $\alpha$ -agarase 유전자를 확보하였다[29]. 이 보고는 한천분해 활성이 있지만 분리한 세균의 게놈라이브러리에서는 한천분해 활성이 없거나 세포질형 agarase 등의 탐색에 유용하게 활용될 수 있다. 아래의 '게놈 및 메타게놈 서열 분석 정보 이용'은 전체 게놈의 서열 파악 후 agarase 유전자를 탐색하는데 반해 이 방법은 전체 게놈의 서열 파악이 필요 없는 장점이 있다.

둘째, 기능기반(function-based)의 게놈라이브러리 분석을 사용한 사례를 보면 Fu 등[31]은 *Agarivorans albus* YKW-34의 DNA를 이용하여 제작된 게놈라이브러리에서 한천분해 활성

을 보이는 집락을 확보하고 이로부터 확보된 plasmid의 염기서열을 분석하여  $\beta$ -agarase 유전자를 확보하였다. 이와 동일한 기법을 이용하여 *Pseudalteromonas* sp. [85], *Vibrio* sp. V134 [150], *Pseudomonas atlantica* [10], *Pseudalteromonas* sp. CY24 [86] 유래 agarase 유전자의 확보가 보고되었다.

셋째, degenerative PCR primer를 이용한 사례를 보면 기존에 보고된 agarase 유전자들의 서열기반(sequence-based) 기법으로 분석하여 보존된 부위(conserved protein domain)에 해당하는 degenerate PCR primer를 제조하는 방법에서 출발한다[113]. GH16  $\beta$ -agarase가 N-말단에 SDDFNV와 EIDVLE 아미노산 서열을 가지고 C-말단에 VDWIR 아미노산 서열을 가지는 것을[21] 기반으로 degenerative primer를 제작하고 *Flammovirga* 속 세균에서  $\beta$ -agarase 유전자를 확보하고 이종 숙주에서 생산한 보고가 있다[143]. 또한, *Vibrio* sp. CN41의 DNA에 agarase의 각 GH family에 해당하는 PCR primer를 모두 적용한 후 sitefinding PCR로[128] agarase 유전자의 염기서열을 파악하고, GH50 family  $\beta$ -agarase 유전자를 확보하고 이종 숙주에서 생산한 보고도 있다[82].

넷째, 부분적 아미노산 서열 파악과 degenerate primer를 사용하는 기법으로, 파악된 부분적 아미노산 서열로 degenerate primer를 제작하고 PCR로 agarase 유전자의 일부분을 획득하여 염기서열을 파악한 후 다시 primer를 제작하고 agarase 유전자의 전체 염기서열을 확보하는 방법이다. 이 방법은 게놈라이브러리를 필요로 하지 않아 첫째와 구분된다. 이러한 기법으로  $\beta$ -agarase 유전자인 *Vibrio* sp. JT0107의 *agaA* [125], *Vibrio* sp. PO303의 *agaC* [19], *agaD* [20] 유전자 등을 확보한 보고가 있다.

### 게놈 및 메타게놈 서열 분석 정보 이용

배양법이 아닌 비배양법의 보고들을 보면 지구표면의 70%는 바다이며 적도의 바다표면과 압력이 100 MPa 정도의 11,000 m 이상의 심해, 100°C 이상의 열수구 등 해양환경은 압력과 온도의 범위가 매우 다양하며 미생물분포 양상도 다양한 것에 기초한다[63]. 이러한 다양한 미생물군집에서 배양되지 않는 미생물에서 저온과 고온, 고압에서 유용하거나 새로운 효소에 해당하는 유전자를 찾는 일이 시도되고 있는데[63], 이는 해양에 존재하는 세균의 0.00001~0.1%만 배양이 가능하므로[2], 99.9% 이상의 세균이 가진 유용 유전자는 미지의 상태라는 것을 전제로 한다.

비배양법의 경우 메타게놈과 게놈라이브러리 등이 이용되는데 새로운 혹은 유용유전자 탐색법은 역시 서열기반법과 기능기반법이 있다. '서열기반의 게놈 분석'은 각 메타게놈의 서열을 파악한 후 상동성(homology)에 근거한 분석법으로 일반적으로 기능파악이 어려운 경우에 적용할 수 있는 장점이 있다. Voget 등[138]은 토양 시료의 메타게놈분석에서 12개의 잠정적인  $\beta$ -agarase 유전자를 발견하고 실험을 통하여 2개의

유전자가 활성이 있음을 보였다. 게놈라이브러리 이용 '기능기반의 게놈 분석'은 서열분석이 필요 없고 서열분석에 따르는 유전자 주석(annotation)의 실수를 줄일 수 있는 장점이 있다. 하지만 숙주가 메타게놈의 promoter를 인식하지 못하거나, 코돈 사용성(codon usage)이 다르거나, 생산된 효소가 분비되지 않으면 게놈라이브러리에서 활성효소를 생성하지 못하거나 검출이 어려운 단점이 있다. 이러한 기능기반법의 한계점을 극복하는 방안으로 Marine metagenomics 총설을 참고하면 도움이 될 것이다[63].

배양법과 비배양법이 결합하여 새로운 agarase 유전자를 탐색한 보고들도 존재하는데 한천분해 활성을 가지는 세균의 게놈서열분석과 주석(annotation)을 행한 후 후보 agarase 유전자를 이중 숙주에서 생산하여 활성을 확인한다. Mardanov 등[87]은 초고온성 고세균인 *Thermococcus* 균주의 전체 게놈 분석으로 총 2061종의 단백질을 지정하는 유전자의 주석을 행하여 agarase 후보 유전자를 탐색하고 대장균에서 생산하여 그 기능을 확인하였다. Temuujin 등[129]은 *Streptomyces coelicolor* A3의 게놈을 분석한 후 보고된 GH50 family  $\beta$ -agarase와 유사한 유전자 서열인 Sco3487을 확인하고 이중 숙주에서 생산하여 한천분해능을 확인하였다. 또한, *Alteromonas* 속 균주의 게놈을 분석하여 6개의 agarase 유전자를 신규로 탐색한 보고[100]와 *Saccharophagus degradans* 2-40 균주의 게놈을 분석하여 GH16, GH50, GH86 families에 속하는 5개의  $\beta$ -agarase 유전자를 탐색한 보고[26]가 있고, 아직 연구되지 않은  $\beta$ -agarase 후보 유전자를 탐색하고 대장균에서 생산하여 활성을 확인한 보고도 있었다[67]. 또 다른 보고로는 0.2% 포도당이 함유된 1.5% 한천 최소배지에 토양을 섞고 일정시간 경과 후 세균을 모아 메타게놈라이브러리를 제작하고 서열을 분석하여 agarase의 유전자를 탐색한 보고가 있는데[138], 이 방법은 토양세균의 1% 이하가 배양가능하다고 알려져[2] 유용할 것이다.

#### 인위적 돌연변이법

활성이 개선된 agarase를 확보하기 위한 비배양법으로는 이미 확보된 agarase 유전자에 대한 인위적 돌연변이가 있다 [55,79]. 일반적으로 기질인 한천이 겔(gel)상태일 때보다는 졸(sol)상태일 때 agarase의 활성이 높고, 한천은 40°C 이상에서만 졸 상태이다. 따라서, 40°C 이상의 온도에서 활성이 높은 agarase를 탐색하고자 하는 노력이 있지만[9,65,101,104], 기존 내열성 agarase 유전자의 재발견의 가능성은 매우 높은 편이다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 기존의 agarase 유전자의 돌연변이를 통해 효소의 최적온도와 열안정성 증진에 관한 시도도 있다. Jang 등[55]은 무작위 돌연변이를 통하여 *Zobellia galactanivorans*의  $\beta$ -agarase B가 50°C까지 열안정성이 증진되었고 최적온도의 범위가 45°C까지 향상되었으며 활성이 야생형에 비해 최대 260% 증진되었다고 보고하였고, Lee 등[79]은

*Z. galactanivorans*의  $\beta$ -agarase A 유전자에 대한 선택적 돌연변이로 활성과 열안정성이 최소 25% 이상 증진되었다고 보고하였다. Kittl과 Withers [69]는 확보된 유전자의 direct evolution을 행한 후, 원하는 돌연변이체의 검색을 위한 high-throughput 기법인 FACS, chemical complementation, robot 기반의 ELISA assay 등을 보고하여 향후 agarase 유전자 돌연변이 연구에 도움이 될 것이다.

### Agarase의 활성 확인법

#### 분비형 agarase의 활성 확인법

한천배지에서의 성장양상으로 agarase가 분비형인지 아닌지의 여부를 판단할 수 있지만, 한천분해 활성의 정량적 분석과 액체배양에서의 분비형 여부를 확인하기 위해서는 후보세균을 배양한 후 pore size 0.45  $\mu$ m 필터를 통과시킨 여과액의 agarase 활성을 확인하거나[10], 배양액을 원심분리한 상층액으로 agarase 활성의 확인이 가능할 것이다. 내재형 agarase의 경우는 여과액을 제거하여 세포를 모으고 이를 파쇄 후 활성의 확인이 가능할 것이다.

#### 정성적 활성 확인법

간편하게는 세균이 성장하는 배지를 육안으로 관찰하여 집락 주위의 함몰로 활성을 파악할 수 있다. 한천분해 활성의 정성적 활성 확인을 위해서는 세균이 성장하는 배지위에 Lugol 시약(5%(w/w) I<sub>2</sub>, 10%(w/w) KI) 이나 Gran's iodine 용액(0.05 M iodine in 0.12 M KI)으로 5분간 처리한 후 clear zone이 생성되는 세균군락을 agarase 활성이 있는 집락으로 판단하고 있다[10,41]. 한천분해산물의 확인은 TLC (thin layer chromatography)나 mass spectrometry 등을 이용하는 방법이 있다[82].

#### 정량적 활성 확인법

Kazłowski 등[62]은 한천분해 활성의 정량적 확인법으로 Somogyi-Nelson법, Miller의 DNS법, Davidson의 ferricyanide법 등을 비교한 결과, high-performance size exclusion chromatography와 refractive index detector 및 ELSD (evaporative light scattering detector)를 결합한 방법이 가장 이상적이라고 보고하였지만, 고가의 기계를 구입해야 하는 단점이 있다.

일반적인 보고들에서 한천분해 활성의 정량적 확인법으로 spectrophotometry 법을 이용하는데, agarase와 기질이 반응하여 환원당 생성, 생성된 환원당과 검출시약과의 반응, 반응 중단, 생성된 환원당의 정량 등의 단계를 거치며 표준물질로는 galactose가 이용된다. 환원당은 반응성 있는 알데히드기 및 케톤기를 가지고 있으며, 금속염 알칼리용액을 환원시키는 성질이 있는 당의 총칭이다. Somogyi-Nelson 법은 당과 구리

시약의 반응으로 생성된 산화제일구리( $\text{Cu}_2\text{O}$ )를 산성( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 조건에서 인몰리브덴산( $\text{H}_3\text{CPO}_4(\text{Mo}_{12}\text{O}_{36})\text{nH}_2\text{O}$ )과 반응시켜 몰리브덴청으로 발색시킨 후에 발색된 정도를 측정한다[97]. 또 다른 방법으로는 구리용액으로 효소반응을 종료시킨 후에 neocuproine-HCl을 첨가하고 중탕으로 끓인 다음 460nm에서 흡광도를 측정하는 Dygert 등의 방법[25,99]과, 0.25%(w/v) agarose를 함유하는 기질과 반응시킨 후 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)로 반응을 중단하고 10분간 중탕으로 끓여서 520 nm에서 흡광도를 측정하는 Somogyi의 DNS법[82,85,91,112, 120] 등이 있다. Sadasivam과 Manickam은 탄수화물을 파악하는 여러 시약과 방법을 자세히 정리하고 있어 참고가 될 것이다[114]. 또 다른 agarase 활성의 정량법으로 ANDS (monopotassium 7-amino-1,3-naphthalenedisulfonic acid)와 sodium cyanoborohydride를 사용하는 FACE (fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis)법이 있는데[81,146], 한천분해산물의 정성적 분석도 가능한 장점이 있지만 아직 비색법에 비해 널리 사용되지는 않고 있다.

#### 박막크로마토그래피(TLC)법

한천의 효소분해산물과 표준물질을 박막에서 전개시킨 후 가시화시켜 확인하는 방법을 이용하는데[24], 이를 통하여 agarase가  $\alpha$ -agarase인지  $\beta$ -agarase인지의 확인이 가능하고 가시화시킨 후의 각 spot의 농도로 개략적인 정량도 가능하다[55,79]. 방법으로는 먼저 정제된 효소 혹은 조효소와 0.25%(w/v) 이하의 agarose 혹은 agar가 함유된 기질용액을 반응시킨다. TLC로 전개할 때에는 전개시약으로 주로 n-butanol:acetate:H<sub>2</sub>O = 2:1:1 용액이 사용되며, 전개가 완료된 후에는 검출을 위해 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 뿌리고 80°C에서 가열하는 방법[112], diphenylamine-aniline 시약을 뿌리고 100°C에서 5분간 가열하는 방법[4,85] ethanolic sulfuric acid:naphthoresorcinol = 2:1 용액으로 검출하는 방법[24,26], diphenylamine/aniline/phosphate 용액으로 가시화하는 방법[8,19] 및 naphthoresorcinol 용액을 뿌리고 100°C에서 10분간 가열하여 가시화하는 방법[74] 등이 보고되어 있다.

#### Agarase의 분리 정제

효소의 특성을 파악하기 위한 비활성(specific activity) 측정 및 agarase 유전자의 확보를 위한 아미노산 서열의 파악을 위해서는 효소의 분리 정제가 필수적이다. 현재까지 보고된 agarase의 분자량은 18 kDa에서[4] 109.5 kDa까지[75]로 다양하며, 황산암모늄이나 과황산암모늄 등을 이용한 단백질 염침전, 겔여과(gel filtration)법, 이온교환 크로마토그래피(ion-exchange chromatography), 한외여과(ultrafiltration)법, 고성능 액체크로마토그래피(HPLC) 등을 이용한 분리 정제법이 병용되고 있다.

상기의 모든 방법이 적용된 예를 보면 Rhee 등[112]은 세포 배양액에 황산암모늄을 20%까지 첨가한 후 원심분리(20,000 rpm, 20분)로 침전된 불순물을 제거하고 다시 황산암모늄을 70%까지 첨가하였고 이후 원심분리(20,000 rpm, 20분)로 침전물을 회수하였다. 이후 20 mM 인산완충용액(pH 8) 50 ml로 침전물을 용해시킨 후 인산완충용액(20 mM, pH 8.0)으로 하룻밤 투석하였다. 투석된 70 ml의 시료를 음이온교환수지에 부착시킨 후 300 ml의 인산완충용액(20 mM, pH 8.0)으로 세척하고 0~1 M NaCl이 첨가된 인산완충용액(pH 7.0, 20 mM)을 통과시켜 분획을 획득하였다. Agarase 활성이 있는 분획을 10 kDa pore size의 한외여과 장치로 농축한 후 인산완충용액(pH 7.0, 20 mM)으로 처리된 Fast protein liquid chromatography (FPLC) 컬럼에 다시 부착시키고 0.18~0.27 M NaCl의 농도구배로 용출시킨 후 Bradford 법으로 단백질을 정량하여 agarase를 순수분리하였다.

음이온교환수지와 겔여과만으로 agarase를 분리한 보고[74,99], 과황산암모늄을 이용한 단백질 침전과 음이온교환수지를 적용한 후 0~0.5 M NaCl의 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)으로 용출시켜 정제하여 배양액보다 비활성으로 45배인 agarase를 정제한 보고[123], 단백질 침전과 음이온교환수지 크로마토그래피 그리고 겔여과법으로 배양액의 129배로 agarase를 농축한 보고[127], 암모늄퍼설페이트 침전과 음이온교환수지(Sephadex G-100)를 이용한 크로마토그래피로 배양액보다 비활성으로 670배인 agarase를 정제한 보고[94] 등이 있었다.

이중 숙주에서의 단백질 생산의 경우에는 His-tag와 Ni 컬럼을 이용한 정제[26,82]와 단백질 분해효소의 활성이 저하된 분비형 숙주인 *Bacillus subtilis* DB104를 이용하여 agarase를 생산한 후 배양액을 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액을 한외여과한 후 SDS-PAGE상에서 agarase의 단일 밴드를 확인한 보고도 있다[76].

#### Agarase 활성의 영향 인자

일반적으로 효소는 금속이온에 의해 촉매활성이나 효소구조의 변화가 일어나는데[101], agarase의 활성도 금속이온의 영향을 받는 경우가 있다.  $\text{Ca}^{2+}$  이온의 영향을 받는 agarase가 많다.  $\text{Ca}^{2+}$  이온이 기질과 agarase의 결합을 촉진하는데,  $\text{Ca}^{2+}$  이온이 존재하면 기질의 neoagarobiose 단위에  $\beta$ -agarase가 결합하는 것을 용이하게 하여 기질인식을 돕는다[40].  $\text{Ca}^{2+}$  이온에 의해 효소활성이 증진되는 것은  $\alpha$ -agarase에서도 보고되었으며[29], Montanier 등[92]은 cellulosome을 이용한 실험에서 galactose를 함유하는 다당류에 효소가 결합할 때  $\text{Ca}^{2+}$  이온이 도움을 준다고 보고하였는데 한천도 galactose를 구성물질로 가지고 있다.

효소활성에 영향을 미치는 물질이 많이 보고되었는데,

NaCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>에 의해 *P. atlantica* 유래 β-agarase의 활성이 증진되었다[94]. Fu 등[30]은 *Vibrio* sp. F-6 유래의 2종류의 agarase 중 하나는 Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 이온에 의해 활성이 증진되고, 또 다른 하나는 Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 이온에 의해 활성이 증진되며, 두 효소 모두 Ag<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> 이온과 EDTA, SDS에 의해 활성이 저해된다고 보고하였다. 한편, *Pseudalteromonas* sp. AG4 유래의 β-agarase는 CaCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>에 의해 활성이 증진되고 CuSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>에 의해 활성이 저해되어[101] Fu 등[30]의 보고와는 상충된 결과였다. *Thermoanaerobacter* 속 세균의 agarase는 Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>에 의해 활성이 증진되었다[9]. *Acinetobacter* sp.의 agarase는 Hg<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>로 활성이 완전히 저해되었고 Zn<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, SDS로 부분 저해되었다[74]. *Agarivorans*속 유래 β-agarase의 활성이 NaCl, CaCl<sub>2</sub>에 의해 증진된 보고도 있지만[76], *Agarivorans albus* YKW-34 유래 β-agarase의 활성은 금속이온(Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>)의 영향뿐만 아니라 금속 킬레이트제(EDTA, EGTA), 환원제(DTT, β-mercaptoethanol), 변성제(SDS, urea)에 대한 영향도 없었고, 단지 Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>에 의해 활성이 저해된다는 보고가 있었다[31]. *Streptomyces coelicolor* A3(2)가 생산하는 agarase 역시 활성을 증진시키는 금속이온은 없었고, Cu<sup>2+</sup> 및 Mn<sup>2+</sup> 이온에 의해 활성이 저해된다고 보고하였다[131]. 따라서, 동일한 속(genus)에서 유래한 agarase라도 균주에 따라 활성을 증진시키는 이온과 저해시키는 이온이 일치하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

## Agarase의 생산

현재 agarase를 상업적으로 판매하는 곳은 Fermentas (cat. # E00461), Biovision (cat. # 9201-500), Sigma-Aldrich (cat. # A6306) 등이다. 다양한 용도를 가지는 agarase를 대량 생산하기 위한 노력으로 agarase 생산세포의 배양조건의 최적화와 유전자 클로닝을 통한 이중 숙주에서의 대량생산 등으로 나눌 수 있다.

### 배양조건의 최적화

배양조건의 최적화는 자연계에서 분리한 agarase 생산균주에 대한 배양조건의 최적화와 agarase의 유전자가 도입된 이중 숙주의 배양조건의 최적화로 나눌 수 있다. *Vibrio* sp. JT0107 균주를 배양하면서 배지에 agarose를 첨가해야 agarase 함성이 촉진된다는 보고[123]와 교반하면서 공기를 공급하고 agarose를 충분히 공급하면 agarase 생산이 통상적인 배양보다 13배 정도 증진된다는 보고도 있었다[122]. Yun 등[148]은 자연계에서 분리한 *Saccharophagus degradans* 2-40 균주에 다양한 탄소원의 종류와 농도별로 실험하여 0.2%(w/v) agar의 첨가가 agarase의 생산에 가장 좋은 영향을 미치며 6.4 U/l (63.2 U/g)의 활성을 획득했다고 보고하였다. Fu 등[31]은

one-factor-at-a-time design으로 9개의 인자 중에 agar, yeast extract, 초기 pH가 *Agarivorans albus* YKW-34 균주의 agarase 생산에 중요하다고 보고하였다.

한편, Parro 등[109]은 *Streptomyces coelicolor*의 agarase 유전자를 이용하여 이중 숙주인 *Streptomyces lividans*에서 생산하는 경우에 인(phosphate)을 제한하면 agarase 유전자의 전사, 번역, 분비가 촉진된다고 보고하였으며, Parro와 Melado [110]는 배지에 포도당을 제한하면 이중 숙주인 *S. lividans*에서 agarase의 분비가 촉진된다고 보고하였다.

### Agarase 유전자를 이용한 이중 숙주에서의 대량생산

자연계에서 발견되는 agarase 생산 세균에서 해당 유전자를 획득하고 이중 숙주에서 생산하는 것은 아주 일반적인 대량생산 방법인데, 이는 agarase의 생산량을 증진시킬 수 있기 때문이다. 이때, 이용되는 이중 숙주는 주로 대장균 [19,26,53,76,101]과 *Bacillus subtilis*이며[38,54,75,105-107], *S. lividans* [109,110]을 이용한 예도 보고되었다. 대장균 숙주의 경우는 연구 초기에 주로 이용되지만, 생산된 단백질을 획득하기 위해서는 세포를 파괴하는 과정이 필수적이다. *B. subtilis* 숙주의 경우는 도입된 유전자에 의해 생산되는 단백질의 외분비 생산이 가능하여 세포를 파괴할 필요가 없는 장점이 있다 [38,75]. Lee 등[75]은 동일한 β-agarase 유전자를 *B. subtilis* 숙주를 이용한 외분비 생산으로 *E. coli* 숙주[76]에서 생산한 경우에 비해 130배 이상의 단백질을 생산하였다. *Streptomyces* 속 세균은 염색체 DNA의 GC 함량이 높은 그람양성세균으로 GC 함량이 낮은 세균과는 코돈 사용성(codon usage)과 프로모터의 구성이 다르며 일반적으로 많은 단백질들이 분비되는 특징이 있다[3]. 이러한 특징을 이용하면 유전자의 GC 함량이 높은 세균 유래 agarase 유전자의 생산에 용이하게 사용될 수 있다.

## Agarase와 그 유전자의 응용

### 세포 및 DNA의 회수율 증진

Yu 등[147]은 배양된 철산화 세균의 세포를 회수하는 과정에서 기존의 oxalic acid를 처리하는 방법과 β-agarase를 처리하는 방법을 비교한 결과, β-agarase를 처리하는 방법이 세포의 회수율이 높았으며, 이로부터 oxalic acid를 처리하는 방법에 비해 5천배나 많은 DNA를 회수하였다. 하지만, Osoegawa 등[108]은 β-agarase 처리법보다 전기영동이 DNA 회수에 더 효율적이라고 보고하여 경우에 따라 DNA 회수율에 차이가 있었다. Vassella와 Boshart[137]는 아프리카 수면병을 일으키는 *Trypanosoma brucei*를 배양할 때 숙주대용으로 agarose를 사용하면 세포의 전처리가 필요하지 않으며, 배양 후 β-agarase로 agarose를 분해하면 생활사의 진행을 중지시키고 세포를 모을 수 있어 다양한 연구에 유용하게 활용이 가능하



다고 보고하였다.

#### 의약학 연구용 세포 배양

의약학 분야의 연구에도 agarase의 응용이 가능한데, Gray 등[34]은 항체를 생산하는 hybridoma 세포를 분리할 때 세포들을 agarose 미세방울에 넣은 후 flow cytometry로 형광항원과 결합하는 항체생산 세포를 가지는 agarose 미세방울을 분리하였으며, 여기에 agarase를 처리하여 원하는 세포를 회수하였다. Wang 등[140]은 인간의 연골세포(chondrocyte)를 agarose 겔 상에서 배양하고 agarase로 처리하여 세포를 회수하면 단층(monolayer) 배양에서 생기는 세포표면 단백질의 소실을 막을 수 있어 추후 연구에 적합하다고 보고하였다. Ng 등[98]은 agarose를 이용하면 연골세포의 체외배양 효율성을 높일 수 있고, 여기에 agarase를 처리하면 콜라겐 함량을 높일 수 있어 운동능력을 향상시킨다고 보고하였다. Ulrich 등[133]은 agarose를 부드러운 콜라겐 세포외기질(ECM)에 주입하여 hydrogel의 강도를 높이는 방법으로 세포의 이동과 stress fiber의 생산 등을 줄여 3차원적인 배양도 가능하였으며, 여기에 agarase를 처리하면 이 현상이 사라지므로 세포 생리의 연구에 유용하다고 보고하였다.

#### 식의약 및 향장품 소재용 한천올리고당의 생산

한천을 이용하여 올리고당을 생산하는 방법으로 산을 이용한 산분해와 agarase를 이용한 효소적 분해를 들 수 있다. 산분해는 산물이 균일하지 않고 분해반응의 조절이 쉽지 않아 대량생산에 부적합하며 환경오염의 문제가 있고[81]. 해조류에 포함된 다른 불안정한 유용물질이 파괴가 되어[123] 추가적인 부가가치가 떨어지는 단점이 있다. 한편,  $\alpha$ -agarase를 이용한 한천분해산물의 기능성이 보고되어 있고[38,103],  $\beta$ -agarase를 이용한 한천분해산물의 경우는 다양한 기능성이 보고되어 있으며,  $\beta$ -agarase의 분해산물인 네오아가로올리고당은 산분해 및  $\alpha$ -agarase에 의해서는 생산되지 않는 기능성이 높은 물질로 알려져 있다[16,28,51,54,144].

기능성이 높은 한천분해물의 생산을 위해 Li 등[81]은 2종류의  $\beta$ -agarase와 겔여과 크로마토그래피를 이용하여 다양한 네오아가로올리고당을 제조하였고, 0.2%(w/v) agarose에  $\beta$ -agarase AgaA와 겔여과를 통해 47%의 NA4와 45%의 NA6 획득하였으며 rotary evaporation으로 농축하였다. Li 등[81]은  $\beta$ -agarase의 기질로 0.2%(w/v)의 낮은 농도의 값비싼 agarose를 사용한 반면, Lee 등[76]은 기질로 5.26%(w/v)의 높은 농도의 저렴한 agar를 사용하여 91.4%의 수율로 네오아가로올리고당을 생산하였고 이중에 48%가 NA4이며 29%가 NA2임을 확인하여 효율적인 한천올리고당의 생산공정을 개발하였다. NA4와 NA6를 생산하는 두 종류의  $\beta$ -agarase를 혼합하여 NA2를 생산한 보고[30]와 수성 이상계(two-phase system)를 이용한 한천을 분해하는 보고도 있다[93].

#### 해조류의 원형질체(protoplast) 제작

해조류로부터 불안정한 생리물질의 추출과 cell-fusion 등을 통한 해조류의 종자 개량용 원형질체를 제작하는 과정에 agarase가 이용되는데[5], 이때 효소활성의 최적온도는 적용 대상 세포를 사멸시키지 않는 저온이 좋다[122].

#### 보고자(reporter), chimera 단백질 및 분비용 signal peptide

유용단백질을 이종 숙주에서 대량생산할 때에 세포를 파괴하는 과정에 의해 공정이 복잡해지고 비용이 상승할 수 있어 단백질을 분비형으로 발현시키면 생산이 용이할 수 있다. Agarase가 배지로 분비되면 쉽게 관찰이 가능한 장점이 있는데, *AgaI*는 *Vibrio* sp. V134 균주유래의 유전자로 그람양성과 그람음성 세균 모두에서 분비발현의 신호를 확인하는 보고자(reporter)로 사용이 가능하다[150]. Widdic 등[141]은 Tat (Twin-arginine translocation) pathway가 모든 세포에서 단백질분비에 사용이 가능하다는 것을 agarase를 이용한 생산으로 이를 규명하였으며 생리현상 등을 파악하는 기초연구에 agarase가 유용하다는 것을 증명하였다.

또한, 분비형 agarase는 세포외로 분비되는 신호서열(signal peptide)을 가지고 있는데, 이 분비신호를 이용하여 도입된 유전자의 생산을 원활하게 할 수 있다. Sugano 등[125]은 *Vibrio* sp. JT0107 균주의 분비형  $\beta$ -agarase 유전자를 분석하여 20개 아미노산의 신호서열을 파악하였다. 양식어류의 질병균에 대한 백신을 제조하기 위한 항원의 이종 숙주를 이용한 생산에 agarase 유전자인 *AgaV*의 신호서열을 이용한 chimera 단백질을 생산하여 백신의 효율을 높였다[58]. Vallin 등[135]은 *Mycobacterium tuberculosis* 단백질의 생산에 *Streptomyces coelicolor* 유래의 agarase 유전자인 *dagA*의 프로모터와 신호서열을 이용하였다.

#### 바이오에너지(bioenergy)

화석연료의 고갈과 환경오염문제 그리고 원자력의 위험성 등으로 안전하고 재생 가능한 에너지의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다. 지구상에서 가장 풍부한 유기탄소원은 식물의 세포벽으로 식물의 구조다당류로 원유 6천억 배럴에 해당하는 바이오에탄올을 생산할 수 있으며[13], 광합성에 의해 지속적으로 유기탄소원이 합성되어 무한정 사용할 수 있는 장점이 있다. 육상식물의 세포벽은 hemicellulose 등으로 구성되어 있어 분해가 어렵고 2차 오염을 일으키는 물질이 있어, 재생 가능한 연료를 생산하는 원료로는 부적합하기 때문에 옥수수 등이 원료로 사용되고 있지만 이는 식량가격의 상승을 부추기는 요소가 되었다[37]. 이러한 부작용을 방지할 수 있는 원료로서 최근 해조류가 부각되고 있으며[29,35,60,118], 특히 홍조류는 목질계 바이오에탄올 생산에 필수적인 리그닌 제거 단계가 필요 없고[95], 탄수화물의 구성비가 높아 바이오에탄올 생산

에 적합한 원료로 알려졌다[49].

해조류를 이용한 바이오에탄올 생산은 고분자 탄수화물의 당화, 포도당이나 갈락토오스 같은 단당류의 생산, 단당류에서 에탄올을 생산하는 과정을 거친다[43]. 즉, 바이오에탄올을 생산하기 위해서는 우선 탄수화물의 당화가 필수적인데[90], 홍조류의 당화에는 marine amylase와 agarase가 이용된다[11]. 또한, agarase의 분해산물에서 단당류인 galactose 등을 생산하기 위해서는 neoagarobiose hydrolase (NABH)가 필요하며[36,148], 이후 생산된 단당류를 이용하여 바이오에탄올의 생산이 가능하다. NABH도 세포에서의 위치에 따라 분비형, 원형질막주위형, 세포질형 등으로 구분되는데[36,90,126,148], 향후 목적에 맞게 이중 숙주를 이용한 생산이 가능할 것이다. 현재로는 값비싼 agarose를 기질로 아세트산, agarase, NABH 등을 이용하여 단당류를 만들고 이를 효모로 발효시켜 바이오에탄올을 생산하므로[66] 경제성이 낮지만 추후 저렴한 한천을 기질로 사용하면 산업적 응용가능성이 높아질 것이다.

#### Galactose의 생산

Galactose와 AHG는 한천의 구성성분이며 다양한 특수기능성 물질합성의 출발물질로 사용될 수 있는 chemical feed stock이다. Galactose는 기능성 감미료인 tagatose 등의 원료물질이며, AHG는 바이오 항암제나 당뇨치료제의 후보 물질 가운데 하나로 영국의 Carbosynth사에서 유일하게 생산되고 있는데 1 g당 판매가격은 2600 달러이다[45]. 가격이 저렴한 한천에  $\beta$ -agarase를 처리하면 NA2의 생산이 가능하고[76], NABH를 이용하여 NA2에서 galactose와 AHG를 만들 수 있다[36,148]. 한천에서 AHG의 생산을 위한 연구도 보고되고 있다[80,148].

## 결 론

단순한 식품소재로 사용되던 홍조류의 구성성분인 한천의 유용성이 알려지면서 한천이 식품산업, 의약산업, 화장품산업 그리고 연구용 배지 등의 형태로 생물연구 분야에서 이용되고 있다. 한천을 정제하여 제조한 agarose는 분자생물학 연구에 필수품으로 고부가가치 제품이다. 한편, 한천분해효소인 agarase의 한천분해 산물인 한천올리고당이 나타내는 기능성인 항암효과, 미백효과, 보습효과 등이 보고되었다. 또한, 재생 가능한 에너지인 바이오에탄올 생산에도 agarase를 이용할 수 있다. 이에 한천을 분해할 수 있는 세균과 한천분해효소인 agarase 유전자를 확보하고 이중 숙주에서의 생산을 위한 많은 연구가 진행되어 왔으며 현재 상업용으로 판매되고 있는 agarase도 존재한다.

본 총설에서는 세균에 의한 한천의 분해와 그 분해산물의 기능성 그리고 한천을 분해하는 효소인 agarase의 분류와 기원 및 agarase 유전자의 확보 방법 등을 설명하였다. 또한,

agarase의 활성 측정법과 agarase의 분리정제 및 활성에 영향을 미치는 인자 등도 검토하였으며, agarase의 생산법과 agarase 유전자의 응용범위 등도 분석하여 추후의 관련 연구에 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

## References

1. Agbo, J. A. C. and M. O. Moss. 1979. The isolation and characterization of agarolytic bacteria from a low land river. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 355-368.
2. Amann, R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**, 143-169.
3. Anné, J. and L. van Mellaert. 1993. *Streptomyces lividans* as host for heterologous protein production. *FEMS Microbiol. Lett.* **114**, 121-128.
4. Aoki, T., T. Araki, and M. Kitamikado. 1990. Purification and characterization of a novel  $\beta$ -agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur. J. Biochem* **187**, 461-465.
5. Araki, T., Z. Lu, and T. Morishita. 1998. Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verrucosa* (*Rhodophyta*). *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 193-197.
6. Araki, C. 1966. The purification and properties of an agarase from a marine bacterium, *Pseudomonas atlantica*, pp. 3-17, In Young, E. G. and J. L. McLachlan (eds.), Proceedings of 5th International Seaweed Symposium. Pergamon Press, Oxford.
7. Arnott, S., A. Fulmer, W. E. Scott, I. C. Dea, R. Moorhouse, and D. A. Rees. 1974. The agarose double helix and its function in agarose gel structure. *J. Mol. Biol.* **90**, 269-284.
8. Bailey, R. W. and E. J. Bourne. 1960. Colour reactions given by sugars and diphenylamine-aniline spray reagents on paper chromatograms. *J. Chromatogr.* **4**, 206-213.
9. Bannikova, G. E., S. A. Lopatin, V. P. Varlamov, B. B. Kuznetsov, I. V. Kozina, M. L. Miroshnichenko, N. A. Chernykh, T. P. Turova and E. A. Bonch-Osmolovskaya. 2008. The thermophilic bacteria hydrolyzing agar: characterization of thermostable agarase. *Appl. Biochem Microbiol.* **44**, 366-371.
10. Belas, R., D. Bartlett, and M. Silverman. 1988. Cloning and gene replacement mutagenesis of a *Pseudomonas atlantica* agarase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 30-37.
11. Berteau, O., I. McCort, N. Goasdonuè, B. Tissot, and R. Daniel. 2002. Characterization of a new  $\alpha$ -L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyzes the hydrolysis of  $\alpha$ -L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*). *Glycobiology* **4**, 273-282.
12. Bibb, M. J., G. H. Jones, R. Joseph, M. J. Buttner, and J. M. Ward. 1987. The agarase gene (dagA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2): affinity purification and characterization of the cloned gene product. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2089-2096.
13. Boudet, A. M., S. Kajita, J. Grima-Pettenati, and D. Goffner. 2003. Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* **8**, 576-581.
14. Bulgakov, V. P., M. Kusaykin, G. K. Tchernoded, T. N. Zvyagintseva, and Y. N. Zhuravlev. 2002. Carbohydrase ac-

- tivities of the rolC-gene transformed and non-transformed ginseng cultures. *Fitoterapia* **73**, 638-643.
15. Cantarel, B. L., P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, and B. Henrissat. 2009. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl. Acids Res.* **37**, D233-D238.
  16. Chen, H. M. and X. J. Yan. 2005. Antioxidant activities of agaro-oligosaccharides with different degrees of polymerization in cell-based system. *Biochim Biophys. Acta* **1722**, 103-111.
  17. Chen, H., X. Yan, P. Zhu, and J. Lin. 2006. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of agaro-oligosaccharides *in vitro* and *in vivo*. *Nutr. J.* **5**, 31.
  18. Correc, G., J. H. Hehemann, M. Czjzek, and W. Helbert. 2011. Structural analysis of the degradation products of porphyran digested by *Zobellia galactanivorans*  $\beta$ -porphyranase A. *Carbo Polym* **83**, 277-283.
  19. Dong, J., S. Hashikawa, T. Konishi, Y. Tamaru, and T. Araki. 2006. Cloning of the novel gene encoding beta-agarase C from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303, and characterization of the gene product. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6399-6401.
  20. Dong, J., Y. Tamaru, and T. Araki. 2007. Molecular cloning, expression, and characterization of a beta-agarase gene, agaD, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **71**, 38-46.
  21. Dong, J., Y. Tamaru, and T. Araki. 2007. A unique beta-agarase, AgaA, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain PO-303. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1248-1255.
  22. Duckworth, M. and J. R. Turvey. 1969. The specificity of an agarase from a *Cytophaga* species. *Biochem. J.* **113**, 693-696.
  23. Duckworth, M. and J. R. Turvey. 1969. The action of a bacterial agarase on agarose, porphyran and alkali-treated porphyran. *Biochem. J.* **113**, 687-692.
  24. Duckworth, M. and W. Yaphe. 1970. Thin-layer chromatographic analysis of enzymic hydrolysates of agar. *J. Chromatogr.* **49**, 482-487.
  25. Dygert, S., H. L. Li, D. Florida, and J. A. Thoma. 1965. Determination of reducing sugar with improved precision. *Anal. Biochem.* **13**, 367-374.
  26. Ekborg, N. A., L. E. Taylor, A. G. Longmire, B. Henrissat, R. M. Weiner, and S. W. Hutcheson. 2006. Genomic and proteomic analyses of the agarolytic system expressed by *Saccharophagus degradans* 2-40. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3396-3405.
  27. Erasmus, J. H., P. A. Cook, and V. E. Coyne. 1997. The role of bacteria in the digestion of seaweed by the abalone *Haliotis midae*. *Aquaculture* **155**, 377-386.
  28. Fernandez, L. E., O. G. Valiente, V. Mainardi, J. L. Bello, H. Velez, and A. Rosado. 1989. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria domingensis*. *Carbohydr. Res.* **190**, 77-83.
  29. Flament, D., T. Barbeyron, M. Jam, P. Potin, M. Czjzek, B. Kloareg, and G. Michel. 2007. Alpha-agarases define a new family of glycoside hydrolases, distinct from beta-agarase families. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4691-4694.
  30. Fu, W., B. Han, D. Duan, W. Liu, and C. Wang. 2008. Purification and characterization of agarases from a marine bacterium *Vibrio* sp. F-6. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 915-922.
  31. Fu, X. T., C. H. Pan, H. Lin, and S. M. Kim. 2009. Gene cloning, expression, and characterization of a beta-agarase, agaB34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 257-264.
  32. Fu, X. T. and S. M. Kim. 2010. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar. Drugs* **8**, 200-218.
  33. Giordano, A., G. Andreotti, A. Tramice, and A. Trincone. 2006. Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnol. J.* **1**, 511-530.
  34. Gray, F., J. S. Kenney, and J. F. Dunne. 1995. Secretion capture and report web: use of affinity derivatized agarose microdroplets for the selection of hybridoma cells. *J. Immunol. Methods* **182**, 155-163.
  35. Gross, M. 2008. Algal biofuel hopes. *Curr. Biol.* **18**, R46-R47.
  36. Ha, S. C., S. Lee, J. Lee, H. T. Kim, H. J. Ko, K. H. Kim, and I. G. Choi. 2011. Crystal structure of a key enzyme in the agarolytic pathway,  $\alpha$ -neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**, 238-244.
  37. Hahn-Hagerdal, B., M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi. 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* **24**, 549-556.
  38. Hatada, Y., Y. Ohta, and K. Horikoshi. 2006. Hyperproduction and application of alpha-agarase to enzymatic enhancement of antioxidant activity of porphyran. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9895-9900.
  39. Hehemann, J. H., G. Correc, T. Barbeyron, W. Helbert, M. Czjzek, and G. Michel. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**, 908-912.
  40. Henshaw, J., A. Home-Bitschy, A. L. van Bueren, V. A. Money, D. N. Bolam, M. Czjzek, N. A. Ekborg, R. M. Weiner, S. W. Hutcheson, G. J. Davies, A. B. Boraston, and H. J. Gilbert. 2006. Family 6 carbohydrate binding modules in  $\beta$ -agarases display exquisite selectivity for the non-reducing termini of agarose chains. *J. Biol. Chem.* **281**, 17099-17107.
  41. Hodgson, D. A. and K. F. Chater. 1981. A chromosomal locus controlling extracellular agarase production by *Streptomyces coelicolor* A3(2), and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1. *J. Gen. Microbiol.* **124**, 339-348.
  42. Hofsten, B. and M. Malmqvist. 1975. Degradation of agar by gram-negative bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 150-158.
  43. Horn, S. J., I. M. Aasen, and K. Ostgaard. 2000. Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 249-254.
  44. Hosoda, A. and M. Sakai. 2006. Isolation of *Asticcacaulis* sp. SA7, a novel agar-degrading alphaproteobacterium. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **70**, 722-725.
  45. <http://news.mk.co.kr/newsRead.php?rss=Y&sc=30100012&year=2011&no=272703>
  46. [http://www.cazy.org/GH118\\_characterized.html](http://www.cazy.org/GH118_characterized.html)

47. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/158.html>
48. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/81.html>
49. <http://www.bioin.or.kr/upload/report/1248424350079.pdf>
50. <http://www.miryangagar.com/main.php>
51. Hu, B., Q. H. Gong, Y. Wang, Y. Ma, J. B. Li, and W. G. Yu. 2006. Prebiotic effects of neoagarooligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe* **12**, 260-266.
52. Hunger, W. and D. Claus. 1978. Reisolation and growth conditions of *Bacillus agar-exedens*. *Ant. van Leeuwen*. **44**, 105-113.
53. Jam, M., D. Flament, J. Allouch, P. Potin, L. Thion, B. Kloreg, M. Czjzek, W. Helbert, G. Michel, and T. Barbeyron. 2005. The endo- $\beta$ -agarases AgaA and AgaB from the marine bacterium *Zobellia galactanivorans* two paralogue enzymes with different molecular organizations and catalytic behaviours. *Biochem J.* **385**, 703-713.
54. Jang, M. K., O. H. Lee, K. H. Yoo, D. G. Lee, and S. H. Lee. 2007. Secretory overexpression of  $\beta$ -agarase in *Bacillus subtilis* and antibacterial activity of enzymatic products. *J. Life Sci.* **17**, 1601-1604.
55. Jang, M. K., S. W. Lee, D. G. Lee, N. Y. Kim, K. H. Yu, H. J. Jang, S. Kim, A. Kim, and S. H. Lee. 2010. Enhancement of the thermostability of a recombinant  $\beta$ -agarase, AgaB, from *Zobellia galactanivorans* by random mutagenesis. *Biotechnol. Lett.* **32**, 943-949.
56. Jang, M. K., D. G. Lee, N. Y. Kim, K. H. Yu, H. J. Jang, S. W. Lee, H. J. Jang, Y. J. Lee, and S. H. Lee. 2009. Purification and characterization of neoagarotetraose from hydrolyzed agar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1197-1200.
57. Jiao, G., G. Yu, J. Zhang, and H. S. Ewart. 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* **9**, 196-223.
58. Jiao, X. D., W. Dang, Y. H. Hu, and L. Sun. 2009. Identification and immunoprotective analysis of an *in vivo*-induced *Edwardsiella tarda* antigen. *Fish Shellfish Immunol.* **27**, 633-638.
59. Johansen, J. E., P. Nielsen, and C. Sjøholm. 1999. Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1231-1240.
60. John, R. P., G. S. Anisha, K. M. Nampoothiri, and A. Pandey. 2011. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.* **28**, 384-410.
61. Kang, N. Y., Y. L. Choi, Y. S. Cho, B. K. Kim, B. S. Jeon, J. Y. Cha, C. H. Kim, and Y. C. Lee. 2003. Cloning, expression and characterization of a beta-agarase gene from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. SK38. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1165-1170.
62. Kazłowski, B., K. Kazłowska, C. L. Pan, and Y. T. Ko. 2011. Evaluation of HPSEC-ELSD method for precise measurement of  $\beta$ -agarase activity. *Biomed Chromatogr.* **25**, 570-578.
63. Kennedy, J., B. Flemer, S. A. Jackson, D. P. Lejon, J. P. Morrissey, F. O'Gara, and A. D. Dobson. 2010. Marine metagenomics: New tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Mar. Drugs* **8**, 608-628.
64. Kim, B. C., H. Poo, K. H. Lee, M. N. Kim, D. S. Park, H. W. Oh, J. M. Lee, and K. S. Shin. 2012. *Simidua areninigræ* sp. nov., a novel agarolytic bacterium isolated from sea sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press)
65. Kim, D. K., Y. R. Jang, K. H. Kim, M. N. Lee, A. R. Kim, E. J. Jo, T. H. Byun, E. T. Jeong, H. J. Kwon, B. W. Kim, and E. W. Lee. 2011. Isolation and culture properties of a thermophilic agarase-producing strain, *Microbulbifer* sp. SD-1. *Fish Aquat. Sci.* **14**, 186-191.
66. Kim, H. T., S. Lee, K. H. Kim, and I. G. Choi. 2012. The complete enzymatic saccharification of agarose and its application to simultaneous saccharification and fermentation of agarose for ethanol production. *Bioresour. Technol.* (in press)
67. Kim, H. T., S. Lee, D. Lee, H. S. Kim, W. G. Bang, K. H. Kim, and I. G. Choi. 2010. Overexpression and molecular characterization of Aga50D from *Saccharophagus degradans* 2-40: an exo-type beta-agarase producing neoagarobiose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 227-234.
68. Kirimura, K., N. Masuda, Y. Iwasaki, H. Nakagawa, R. Kobayashi, and S. Usami. 1999. Purification and characterization of a novel  $\beta$ -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 436-441.
69. Kittl, R. and S. G. Withers. 2010. New approaches to enzymatic glycoside synthesis through directed evolution. *Carbohydr. Res.* **345**, 1272-1279.
70. Kloreg, B. and R. Quatrano. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **26**, 259-315.
71. Knutsen, S. H., D. E. Myslabodski, B. Larsen, and A. I. Usov. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botan. Mar.* **37**, 163-169.
72. Kobayashi, R., M. Takisada, T. Suzuki, K. Kirimura, and S. Usami. 1997. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 162-163.
73. Kovalchuk, S. N., E. V. Sundukova, M. I. Kusaykin, K. V. Guzev, S. D. Anastiuk, G. N. Likhatskaya, E. V. Trifonov, E. A. Nurminski, V. B. Kozhemyako, T. N. Zvyagintseva, and V. A. Rasskazov. 2006. Purification, cDNA cloning and homology modeling of endo-1,3-beta-D-glucanase from scallop *Mizuhopecten yessoensis*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **143**, 473-485.
74. Lakshmikanth, M., S. Manohar, Y. Souche, and J. Lalitha. 2009. Extracellular  $\beta$ -agarase LSL-1 producing neoagarobiose from a newly isolated agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp., AG LSL-1. *Process Biochem.* **44**, 999-1003.
75. 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, 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.
76. Lee, D. G., M. K. Jang, O. H. Lee, N. Y. Kim, S. A. Ju, and S. H. Lee. 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.
77. Lee, D. G., N. Y. Kim, M. K. Jang, O. H. Lee, and S. H. Lee. 2007. Isolation and characterization of a marine bacterium *Thalassomonas* sp. SL-5 producing  $\beta$ -agarase. *J. Life Sci.* **17**,

- 70-75.
78. Lee, D. G., O. H. Lee, H. J. Jang, M. K. Jang, K. H. Yoo, and S. H. Lee. 2008. Isolation and characterization of a marine derived bacterium *Glaciicola* sp. SL-12 producing  $\beta$ -agarase. *J. Life Sci.* **18**, 58-62.
  79. Lee, S., D. G. Lee, M. K. Jang, M. J. Jeon, H. J. Jang, and S. H. Lee. 2011. Improvement in the catalytic activity of  $\beta$ -agarase AgaA from *Zobellia galactanivorans* by site-directed mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 1116-1122.
  80. Lee, S., K. H. Kim, and I. G. Choi. 2010. Structural and biochemical approaches to design a synthetic agarolytic pathway: From agar to D-galactose and anhydro-L-galactose. *J. Bacteriol.* **150S**.
  81. Li, J., F. Han, X. Lu, X. Fu, C. Ma, Y. Chu, and W. Yu. 2007. A simple method of preparing diverse neoagaro-oligosaccharides with beta-agarase. *Carbohydr Res.* **342**, 1030-1033.
  82. Liao, L., X. W. Xu, X. W. Jiang, Y. Cao, N. Yi, Y. Y. Huo, Y. H. Wu, X. F. Zhu, X. Q. Zhang, and M. Wu. 2011. Cloning, expression, and characterization of a new beta-agarase from *Vibrio* sp. strain CN41. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 7077-7079.
  83. Lin, B., G. Lu, Y. Zheng, W. Xie, S. Li, and Z. Hu. 2012. *Aquimarina agarilytica* sp. nov., a novel agarolytic species isolated from red alga. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press)
  84. Lin, B. K., M. Q. Zhong, M. Gao, J. S. Lun, G. M. Liu, and Z. Hu. 2008. A novel marine agarase-producing bacterium isolated from the surface of *Porphyra haitanensis*. *J. Biotechnol.* **136S**, S531.
  85. Lu, X., Y. Chu, Q. Wu, Y. Gu, F. Han, and W. Yu. 2009. Cloning, expression and characterization of a new agarase-encoding gene from marine *Pseudalteromonas* sp. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1565-1570.
  86. Ma, C., X. Lu, C. Shi, J. Li, Y. Gu, Y. Ma, Y. Chu, F. Han, Q. Gong, and W. Yu. 2007. Molecular cloning and characterization of a novel beta-agarase, AgaB, from marine *Pseudalteromonas* sp. CY24. *J. Biol. Chem.* **282**, 3747-3754.
  87. Mardanov, A. V., N. V. Ravin, V. A. Svetlitchnyi, A. V. Beletsky, M. L. Miroshnichenko, E. A. Bonch-Osmolovskaya, and K. G. Skryabin. 2009. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4580-4588.
  88. Mavromatis, K., B. Abt, E. Brambilla, A. Lapidus, A. Copeland, S. Deshpande, M. Nolan, S. Lucas, H. Tice, J. F. Cheng, C. Han, J. C. Detter, T. Woyke, L. Goodwin, S. Pitluck, B. Held, T. Brettin, R. Tapia, N. Ivanova, N. Mikhailova, A. Pati, K. Liolios, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, Y. J. Chang, C. D. Jeffries, M. Rohde, M. Göker, J. Bristow, J. A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, H. P. Klenk, and N. C. Kyrpides. 2010. Complete genome sequence of *Coralimargarita akajimensis* type strain (04OKA010-24). *Stand. Genomic Sci.* **2**, 290-299.
  89. McCandless, E. L. and J. S. Craigie. 1979. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**, 41-53.
  90. Michel, G., P. Nyval-Collen, T. Barbeyron, M. Czjzek, and W. Helbert. 2006. Bioconversion of red seaweed galactans: a focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 23-33.
  91. Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
  92. Montanier, C. Y., M. A. Correia, J. E. Flint, Y. Zhu, A. Baslé, L. S. McKee, J. A. Prates, S. J. Polizzi, P. M. Coutinho, R. J. Lewis, B. Henrissat, C. M. Fontes, and H. J. Gilbert. 2011. A novel, noncatalytic carbohydrate-binding module displays specificity for galactose-containing polysaccharides through calcium-mediated oligomerization. *J. Biol. Chem.* **286**, 22499-22509.
  93. Morita, T., H. J. Lim, and I. Karube. 1995. Enzymatic hydrolysis of polysaccharides in water-immiscible organic solvent, biphasic systems. *J. Biotechnol.* **38**, 253-261.
  94. Morrice, L. M., M. W. McLean, F. B. Williamson, and W. F. Long. 1983. beta-Agarases I and II from *Pseudomonas atlantica* Purifications and some properties. *Eur. J. Biochem.* **135**, 553-558.
  95. Mosier, N., C. Wyman, B. E. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* **96**, 673-686.
  96. Nedashkovskaya, O. I., M. Suzuki, J. S. Lee, K. C. Lee, L. S. Shevchenko, and V. V. Mikhailov. 2009. *Pseudozobellia thermophila* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59(Pt 4)**, 806-810.
  97. Nelson, N. 1954. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375-380.
  98. Ng, K. W., L. E. Kugler, S. B. Doty, G. A. Ateshian, and C. T. Hung. 2009. Scaffold degradation elevates the collagen content and dynamic compressive modulus in engineered articular cartilage. *Osteo Cartil.* **17**, 220-227.
  99. Leon, O., L. Quintana, G. Peruzzo, and J. C. Slebe. 1992. Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4060-4063.
  100. Oh, C., M. de Zoysa, Y. K. Kwon, S. J. Heo, A. Affan, W. K. Jung, H. S. Park, J. Lee, S. K. Son, K. T. Yoon, and D. H. Kang. 2011. Complete genome sequence of the agarase-producing marine bacterium strain s89, representing a novel species of the genus *Alteromonas*. *J. Bacteriol.* **193**, 5538.
  101. Oh, C., C. Nikapitiya, Y. Lee, I. WhfRheang, S. J. Kim, D. H. Kang, and J. Lee. 2010. Cloning, purification and biochemical characterization of beta agarase from the marine bacterium *Pseudalteromonas* sp. AG4. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 483-494.
  102. Oh, Y. H., C. Jung, and J. Lee. 2011. Isolation and characterization of a novel agarase-producing *Pseudalteromonas* spp. bacterium from the guts of spiny turban shells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 818-821.
  103. Ohta, Y., Y. Hatada, M. Miyazaki, Y. Nogi, S. Ito, and K. Horikoshi. 2005. Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -agarase from a *Thalassomonas* sp. *Curr. Microbiol.* **50**, 212-216.

104. Ohta, Y., Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, Y. Hatada, S. Ito, and K. Horikoshi. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1073-1081.
105. Ohta, Y., Y. Hatada, S. Ito, and K. Horikoshi. 2005. High-level expression of a neoagarobiose-producing  $\beta$ -agarase gene from *Agarivorans* sp. JAMB-A11 in *Bacillus subtilis* and enzymatic properties of the recombinant enzyme. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **41**, 183-191.
106. Ohta, Y., Y. Hatada, Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, M. Akita, Y. Hidaka, S. Goda, S. Ito, and K. Horikoshi. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequence of a thermostable  $\beta$ -agarase from a novel species of deep-sea *Microbulbifer*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 505-514.
107. Ohta, Y., Y. Hatada, Y. Nogi, Z. Li, S. Ito, and K. Horikoshi. 2004. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 beta-agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 266-275.
108. Osoegawa, K., P.-Y. Woon, B. Zhao, E. Frengen, M. Tateno, J. J. Catanese, and P. J. de Jong. 1998. An improved approach for construction of bacterial artificial chromosome libraries. *Genomics* **52**, 1-8.
109. Parro, V., R. P. Mellado, and C. R. Harwood. 1998. Effects of phosphate limitation on agarase production by *Streptomyces lividans* TK21. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**, 107-113.
110. Parro, V. and R. P. Mellado. 1994. Effect of glucose on agarase overproduction in *Streptomyces*. *Gene* **145**, 49-55.
111. Potin, P., C. Richard, C. Rochas, and B. Kloareg. 1993. Purification and characterization of the  $\alpha$ -agarase from *Alteromonas agarolyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B. *Eur. J. Biochem.* **214**, 599-607.
112. Rhee, Y. J., C. R. Han, W. C. Kim, D. Y. Jun, I. K. Rhee, and Y. H. Kim. 2010. Isolation of a novel freshwater agarolytic *Celvibrio* sp. KY-YJ-3 and characterization of its extracellular beta-agarase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1378-1385.
113. Rose, T. M., E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrovski, C. M. McCallum, and S. Henikoff. 1998. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucl. Acids Res.* **26**, 1628-1635.
114. Sadasivam, S. and A. Manickam. 2007. Biochemical methods. pp. 1-19, New age international publishers, New Delhi, India.
115. Schroeder, C. D., M. A. Jaffer, and V. E. Coyne. 2003. Investigation of the role of a  $\beta$ (1-4) agarase produced by *Pseudalteromonas gracilis* B9 in eliciting disease symptoms in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Microbiol.* **149**, 2919-2929.
116. Shieh, W. Y. and W. D. Jean. 1998. *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov., sp. nov., a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. *Can. J. Microbiol.* **44**, 637-645.
117. Shin, M. H., D. Y. Lee, G. Wohlgemuth, I. G. Choi, O. Fiehn, and K. H. Kim. 2010. Global metabolite profiling of agarose degradation by *Saccharophagus degradans* 2-40. *J. Biotechnol.* **27**, 156-168.
118. Singh, A., P. S. Nigam, and J. D. Murphy. 2011. Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels. *Bioresour. Technol.* **102**, 10-16.
119. Skea, G. L., D. O. Mountfort, and K. D. Clements. 2007. Contrasting digestive strategies in four New Zealand herbivorous fishes as reflected by carbohydrase activity profiles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **146**, 63-70.
120. Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* **160**, 61-68.
121. Sugano, Y., H. Kodama, I. Terada, Y. Yamazaki, and M. Noma. 1994a. Purification and characterization of a novel enzyme, alpha-agarooligosaccharide hydrolase (alpha-NAOS hydrolase), from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Bacteriol.* **176**, 6812-6818.
122. Sugano, Y., H. Nagae, K. Inagaki, T. Yamamoto, I. Terada, and Y. Yamazaki. 1995. Production and characteristics of some new  $\beta$ -agarases from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Ferment. Technol.* **79**, 549-554.
123. Sugano, Y., I. Terada, M. Arita, M. Noma, and T. Matsumoto. 1993. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1549-1554.
124. Sugano, Y., T. Matsumoto, and M. Noma. 1994. Sequence analysis of the agaB gene encoding a new beta-agarase from *Vibrio* sp. strain JT0107. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 105-108.
125. Sugano, Y., T. Matsumoto, H. Kodama, and M. Noma. 1993. Cloning and sequencing of agaA, a unique agarase 0107 gene from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3750-3756.
126. Suzuki, H., Y. Sawai, T. Suzuki, and K. Kawai. 2002. Purification and characterization of an extracellular alpha-neoagarooligosaccharide hydrolase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 456-463.
127. Suzuki, H., Y. Sawai, T. Suzuki, and K. Kawai. 2003. Purification and characterization of an extracellular beta-agarase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 328-334.
128. Tan, G. H., Y. Gao, M. Shi, X. Y. Zhang, S. P. He, Z. L. Chen, and C. C. An. 2005. SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucl. Acids Res.* **33**, e122.
129. Temuujin, U., W. J. Chi, Y. K. Chang, and S. K. Hong. 2012. Identification and biochemical characterization of Sco3487 from *Streptomyces coelicolor* A3(2), an exo- and endo-type  $\beta$ -agarase-producing neoagarobiose. *J. Bacteriol.* **194**, 142-149.
130. Trincone, A. 2011. Marine biocatalysts: Enzymatic features and applications. *Mar. Drugs* **9**, 478-499.
131. Turvey, J. R. and J. Christison. 1967. The enzymic degradation of porphyran. *Biochem. J.* **105**, 317-321.
132. Uetanabaro, A. P., C. Wahrenburg, W. Hunger, R. Pukall, C. Sproer, E. Stackebrandt, V. P. de Canhos, D. Claus, and D. Fritze. 2003. *Paenibacillus agarexcedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 1051-1057.
133. Ulrich, T. A., T. G. Lee, H. K. Shon, D. W. Moon, and S. Kumar. 2011. Microscale mechanisms of agarose-induced disruption of collagen remodeling. *Biomaterials* **32**, 5633-5642.
134. Vaaje-Kolstad, G., S. J. Horn, D. M. van Aalten, B. Synstad, and V. G. Eijsink. 2005. The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin

- degradation. *J. Biol. Chem.* **280**, 28492-28497.
135. Vallin, C., A. Ramos, E. Pimienta, C. Rodríguez, T. Hernández, I. Hernández, R. Del Sol, G. Rosabal, L. van Mellaert, and J. Anné. 2006. *Streptomyces* as host for recombinant production of *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *Tuberculosis (Edinb)* **86**, 198-202.
  136. Van der Meulen, H. J., W. Harder, and H. Veldkamp. 1974. Isolation and characterization of *Cytophaga flevensis* sp. Nov., a new agarolytic flexibacterium. *Ant. van Leeuwen.* **40**, 329-346.
  137. Vassella, E. and M. Boshart. 1996. High molecular mass agarose matrix supports growth of bloodstream forms of pleomorphic *Trypanosoma brucei* strains in axenic culture. *Mol. Biochem. Parasitol.* **82**, 91-105.
  138. Voget, S., C. Leggewie, A. Uesbeck, C. Raasch, K. E. Jaeger, and W. R. Streit. 2003. Prospecting for novel biocatalysts in a soil metagenome. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6235-6242.
  139. Wang, J., X. Jiang, H. Mou, and H. Guan. 2004. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. *J. Appl. Phycol.* **16**, 333-340.
  140. Wang, L., G. Verbruggen, K. F. Almqvist, D. Elewaut, C. Broddelez, and E. M. Veys. 2001. Flow cytometric analysis of the human articular chondrocyte phenotype *in vitro* *Ostea Carti.* **9**, 73-84.
  141. Widdick, D. A., R. T. Eijlander, J. M. van Dijk, O. P. Kuipers, and T. Palmer. 2008. A facile reporter system for the experimental identification of twin-arginine translocation (Tat) signal peptides from all kingdoms of life. *J. Mol. Biol.* **375**, 595-603.
  142. Xie, H., B. Han, W. Dong, Y. Yang, J. Chang, Y. Peng, and W. Liu. 2009. Isolation and characterization of a marine agarase. *Weí. Sheng. Wu. Xue. Bao* **49**, 896-901.
  143. Yang, J. I., L. C. Chen, Y. Y. Shih, C. Hsieh, C. Y. Chen, W. M. Chen, and C. C. Chen. 2011. Cloning and characterization of  $\beta$ -agarase AgaYT from *Flammeovirga yaeyamensis* strain YT. *J. Biosci. Bioeng.* **112**, 225-232.
  144. 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*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1933-1937.
  145. Yong, J. J., S. J. Park, H. J. Kim, S. K. Rhee. 2007. *Glaciicola agarilytica* sp. nov., an agar-digesting marine bacterium from the East Sea, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 951-953.
  146. Yu, G., H. Guan, A. S. Ioanoviciu, S. A. Sikkander, C. Thanawiroon, J. K. Tobacman, T. Toida, and R. J. Linhardt. 2002. Structural studies on kappa-carrageenan derived oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **337**, 433-440.
  147. Yu, R., J. Graf, and B. F. Smets. 2008. An improved cell recovery method for iron oxidizing bacterial (IOB) enrichments. *J. Microbiol. Methods* **72**, 235-240.
  148. Yun, E., M. Shin, J. J. Yoon, Y. Kim, I. G. Choi, and K. Kim. 2011. Production of 3,6-anhydro-L-galactose from agarose by agarolytic enzymes of *Saccharophagus degradans* 2-40. *Process Biochem* **46**, 88-93.
  149. Zhang, Q., H. Qi, T. Zhao, E. Deslandes, N. M. Ismaeli, F. Molloy, and A. T. Critchley. 2005. Chemical characteristics of a polysaccharide from *Porphyra capensis* (Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* **340**, 2447-2450.
  150. Zhang, W. W. and L. Sun. 2007. Cloning, characterization, and molecular application of a beta-agarase gene from *Vibrio* sp. strain V134. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2825-2831.
  151. Zhilina, T. N., G. A. Zavarzin, F. Rainey, V. V. Kevbrin, N. A. Kostrikina, and A. M. Lysenko. 1996. *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the Continental Soda Lakes in Central Asia and the East African Rift. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **46**, 305-312.
  152. Zhong, Z., A. Toukdarian, D. Helinski, V. Knauf, S. Sykes, J. E. Wilkinson, C. O'Bryne, T. Shea, C. DeLoughery, and R. Caspi. 2001. Sequence analysis of a 101-kilobase plasmid required for agar degradation by a *Microscilla* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5771-5779.

초록 : Agarase의 분류, 기원, 확보, 활성파악, 분리정제, 생산 및 응용

이동근 · 이상현\*

(신라대학교 의생명과학대학 제약공학과)

한천은 거대 홍조류의 세포벽 성분으로 agarase에 의해 가수분해된다. Agarase는 분해 양상에 따라  $\alpha$ -agarase (E.C. 3.2.1.158)와  $\beta$ -agarase (E.C. 3.2.1.81)로 나눌 수 있으며 아미노산 서열 유사성에 따라 GH (glycoside hydrolase) -16, -58, -86, -96, -118 로 나눌 수 있다. 많은 agarase들이나 그들의 유전자가 바다나 육지 환경의 세균 혹은 메타게놈에서 검출, 분리, 재조합 발견되었다. Agarase의 산물인 한천올리고당(agarooligosaccharides)과 네오한천올리고당(neoagarooligosaccharides)은 항암, 면역활성, 항산화, 장내유용세균활성화, 간보호, 항균, 미백, 보습의 효과 등 다양한 기능성이 보고되어 식품, 화장품, 의학 영역에서 광범위하게 이용될 수 있다. 또한 agarase는 연구영역에서 이용될 수 있다. 이 논문은 agarase의 검출원, 정제법, 검출법 그리고 응용영역에 대해 검토하였고, 한천대사에서 agarase의 역할, 대사산물의 기능 등도 고찰하였다.