

Characterization of Exolytic GH50A β -Agarase and GH117A α -NABH Involved in Agarose Saccharification of *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 and Possible Application to Mass Production of NA2 and L-AHG

Won Young Jang, Hee Kyoung Lee and Young Ho Kim*

Laboratory of Immunobiology, School of Life Sciences, BK21 FOUR KNU Creative BioResearch Group, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Received March 24, 2021 / Revised March 27, 2021 / Accepted March 27, 2021

Recently, we sequenced the entire genome of a freshwater agar-degrading bacterium *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 (KCTC13629BP) to explore genetic information encoding agarases that hydrolyze agarose into monomers 3,6-anhydro-L-galactose (L-AHG) and D-galactose. The KY-GH-1 strain appeared to possess nine β -agarase genes and two α -neoagarobiose hydrolase (α -NABH) genes in a 77-kb agarase gene cluster. Based on these genetic information, the KY-GH-1 strain-caused agarose degradation into L-AHG and D-galactose was predicted to be initiated by both endolytic GH16 and GH86 β -agarases to generate NAOS (NA4/NA6/NA8), and further processed by exolytic GH50 β -agarases to generate NA2, and then terminated by GH117 α -NABHs which degrade NA2 into L-AHG and D-galactose. More recently, by employing *E. coli* expression system with pET-30a vector we obtained three recombinant His-tagged GH50 family β -agarases (GH50A, GH50B, and GH50C) derived from *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 to compare their enzymatic properties. GH50A β -agarase turned out to have the highest exolytic β -agarase activity among the three GH50 isozymes, catalyzing efficient NA2 production from the substrate (agarose, NAOS or AOS). Additionally, we determined that GH117A α -NABH, but not GH117B α -NABH, could potently degrade NA2 into L-AHG and D-galactose. Sequentially, we examined the enzymatic characteristics of GH50A β -agarase and GH117A α -NABH, and assessed their efficiency for NA2 production from agarose and for production of L-AHG and D-galactose from NA2, respectively. In this review, we describe the benefits of recombinant GH50A β -agarase and GH117A α -NABH originated from *Cellvibrio* sp. KY-GH-1, which may be useful for the enzymatic hydrolysis of agarose for mass production of L-AHG and D-galactose.

Key words : Agarase gene cluster, agarose saccharification, *Cellvibrio* sp. KY-GH-1, GH117A α -NABH, GH50A β -agarase

서 론

한천은 해양 홍조류의 세포벽 다당류이며 아가로오스와 아가로펙틴의 두 가지 성분의 혼합물이다. 아가로오스는 α -1,3-연결된 3,6-anhydro-L-galactose (L-AHG)와 β -1,4-연결된 D-galactose의 교차적인 잔기로 구성된다. 아가로펙틴은 동일한 반복 단위를 가지고 있지만, L-AHG 잔기 일부는 L-galactose sulfate로, 그리고 D-갈락토오스 잔기는 pyruvic acid acetal 4,6-O-(1-carboxyethylidene)-D-galactose로 일부 대체되어 있다[10]. 한천은 미생물 분해작용에 내성을 지닌 안정적인 겔 매트릭스를 형성하기 때문에, 식품 산업 및 미생물 배양 배지

에서 겔화 소재로 널리 사용되고 있다.

현재까지 보고된 바에 따르면, 약 15속의 해양성 세균들과 7속의 비해양성 세균들의 경우는 한천 분해능이 있어서 한천을 유일한 탄소원으로 사용할 수 있다[1, 4, 13, 19, 31]. 한천을 탄소원으로 자화하기 위해, 한천 분해 세균은 다양한 한천 분해 효소들, 즉 아가레이즈들의 조합을 생성하고 이를 통해 한천을 다당류인 L-AHG와 D-갈락토오스로 가수분해한다. 아가레이즈는 절단 방식에 따라 두 가지 유형으로 분류된다. α -아가레이즈(EC 3.2.1.158)는 α -1,3-글리코시드 결합을 절단하는데 반해, β -아가레이즈(EC 3.2.1.81)는 β -1,4-글리코시드 결합을 절단한다[13, 19].

아가레이즈는 대부분 아가로오스를 가수분해하여 네오아가로올리고당(neoagaro-oligosaccharides, NAOSs)을 생산하는 엔도(endo)형 β -아가레이즈에 속한다. 이에 비해 아가로오스를 가수분해하여 아가로올리고당(agaro-oligosaccharides, AOSs)을 생성하는 α -아가레이즈들에 대한 보고는 매우 적다. 탄수화물 활성 효소(Carbohydrate-Active Enzymes, CAZyme) 데이터베이스에 수록된 세균성 아가레이즈들 간의 아미노산

*Corresponding author

Tel : +82-53-950-5378, Fax : +82-53-955-5522

E-mail : ykim@knu.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.

서열의 유사성을 기준으로 아가레이즈들을 여러 글리코시드 가수분해효소(glycoside hydrolase, GH) 패밀리로 분류할 수 있다. 즉, β -아가레이즈들은 GH16, GH50, GH86 및 GH118 과 같은 다양한 GH 패밀리로 분류되며[5, 9, 30], α -아가레이즈들은 GH96 및 GH117 패밀리로 분류된다. GH16, GH86 및 GH118 β -아가레이즈들은 각각 네오아가로테트라오스(NA4)/네오아가로헥사오스(NA6), NA6/네오아가로옥타오스(NA8), 및 NA8/네오아가로데카오스(NA10)를 생산하기 위해 아가로오스를 엔도(endo)형 가수분해 방식으로 절단한다. GH50 패밀리의 β -아가레이즈들은 엔도형 또는 엑소(exo)형 아가로오스 분해 활성을 통해 최종 생성물로 네오아가로비오스(NA2), NA4 또는 NA2/NA4를 생산한다[8, 13, 16, 28, 29]. GH96 α -아가레이즈들은 아가로오스를 주로 아가로테트라오스(A4)로 가수분해한다. GH117 α -네오아가로비오스 가수분해효소(α -NABH)는 NA2를 단량체인 L-AHG 및 D-갈락토오스로 가수분해한다[12, 15, 25].

한천 분해산물인 NAOS와 AOS는 항산화[7], 항종양[11, 26], 프리바이오틱[18], 항염증제[33], 항당뇨병 및 항비만[17] 활성이 있으며, NA2 및 L-AHG는 피부 보습 및 미백[22, 40], 항우식[39] 활성 등을 가진 것으로 보고되었다. 이와 같은 아가로오스 분해 산물의 다양한 생물학적 활성들은 아가로오스의 구성 단량체인 L-AHG의 존재와 관련이 있을 것으로 추정된다. 그러나 L-AHG 생물학적 활성에 대한 직접적인 증거를 제공할 수 있는 생체 내 연구를 수행하기에 충분한 양의 L-AHG가 아직 상업적으로 공급되지 않기 때문에, L-AHG의 상용화를 가능하게 하는 대량생산 기술의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

아가로오스로부터 L-AHG를 생산하기 위해 제안된 최근의 효소공정은 아가로오스를 NA2로 가수분해한 후 이를 L-AHG 및 D-갈락토오스로 최종 가수분해하기 위한 목적으로 아가로오스 기질에 GH50 β -아가레이즈와 GH117 α -NABH를 공동 처리하는 방법을 채택하고 있다[2, 32, 40]. 그러나 성공적인 효소공정으로 아가로오스를 당화시켜 단량체인 L-AHG 및 D-갈락토오스를 생산하기 위해서는 아가로오스를 NA2로 효율적으로 가수분해시키는 엑소형 GH50 β -아가레이즈 뿐만 아니라 NA2에 특이적으로 작용하여 L-AHG와 D-갈락토오스로 가수분해시키는 GH117 α -NABH의 개발이 절실히 필요한 실정이다.

본 총설에서는 아가로오스를 당화하여 단량체인 L-AHG 및 D-갈락토오스를 대량 생산하기 위한 효소공정에 성공적으로 활용될 수 있는, 담수 환경에서 분리한 한천 분해 세균 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주 유래의 제조할 GH50A β -아가레이즈 및 GH117A α -NABH가 지닌 효소학적 장점들에 대해 살펴보고자 한다.

Cellvibrio sp. KY-GH-1 균주의 유전체 염기서열 및 아가레이즈 유전자 클러스터 유전정보 분석

최근 DNA 염기서열 분석법의 발전 및 이에 따른 미생물 유전체학 분야의 눈부신 발전에 힘입어 한천 분해세균들의 경우에도 전체 유전체 염기서열이 분석되었으며, 그 결과로서 한천 분해세균들의 유전체 상에 존재하는 아가레이즈 유전자들에 대한 총체적인 이해를 할 수 있게 되었다. 본인 등은 담수 환경에서 분리한 한천 분해 세균 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 (KCTC13629BP) 균주가 생산하는 한천 분해 효소들 중에 아가로오스로부터 L-AHG 생산에 이용할 수 있는 엑소형 GH50 β -아가레이즈 및 NA2-특이적 GH117 α -NABH가 존재하는지를 탐색하기 위해 KY-GH-1 균주의 전체 유전체 염기서열을 분석하고 SMRT Analysis 소프트웨어(v2.3.0 HGAP.2)를 사용하여 유전체 어셈블리를 수행하였다. 그 결과, 하나의 콘티그로서 구성된 완전한 원형 유전체의 정보를 확보하였으며, 47.9% GC 함량의 5,762,391 bp 길이로 이루어져 있음을 확인하였다[23].

아울러 아가로오스를 당화하여 단량체인 L-AHG 및 D-갈락토오스를 생성시키는데 기여할 수 있는 다수의 아가레이즈들을 암호화하는 유전 정보를 발견하였다. 즉, KY-GH-1 균주의 유전체에는 ~77 kb 영역에 걸쳐 존재하는 아가레이즈 유전자 클러스터 내에 아가레이즈 유전자로 추정되는 4개의 GH16 패밀리의 β -아가레이즈, 3개의 GH50 패밀리의 β -아가레이즈, 2개의 GH86 패밀리의 β -아가레이즈 및 2개의 GH117 α -NABH 유전자들을 함유하고 있음을 확인하였다(Fig. 1 및 Table 1).

흥미롭게도 GH118 β -아가레이즈와 GH96 α -아가레이즈를 암호화하는 유전자들은 존재하지 않는 것으로 나타났다. 특히, 중국에서 분리된 비해양성 한천 분해 세균들인 *Cellvibrio* sp. PR1 [38]과 *Cellvibrio* sp. BR (GenBank Accession No. AICM00000000.1) 경우에는 GH118 β -아가레이즈와 GH96 α -아가레이즈를 암호화하는 유전자들뿐만 아니라 GH16 β -아가레이즈의 유전자도 존재하지 않는 것으로 보고되었다(Fig. 2). 또한, 해양성 한천 분해 세균들의 경우에도 *Thalassotalea agarivorans* DSM19706 [34]와 *Gilvamarinus agarilyticus* JEA5 [27]의 유전체에는 다수의 β -아가레이즈 유전자들과 함께 GH96 α -아가레이즈 유전자가 존재하였으나 *Agarivorans gilvovus* WH0801 [41]와 *Saccharophagus degradans* 2-40 [36]의 유전체에는 다수의 β -아가레이즈 유전자들만 존재하는 것으로 나타났다.

만약 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주가 엔도형 GH16 β -아가레이즈, 엔도형 GH86 β -아가레이즈, 엑소형 GH50 β -아가레이즈, 및 GH117 α -NABH를 모두 발현하여 한천 분해 효소계를 구성한다면, 이에 의한 다당류 아가로오스의 단량체 L-AHG 및 D-갈락토오스로의 분해 경로는 엔도형 GH16 β -아가레이즈 및 엔도형 GH86 β -아가레이즈에 의해 시작되어 아가로오스로부터 먼저 NA4, NA6 및 NA8 등이 생성되면 이어서 이들 기질에 대해 엑소형 GH50 β -아가레이즈가 추가로 작용하여

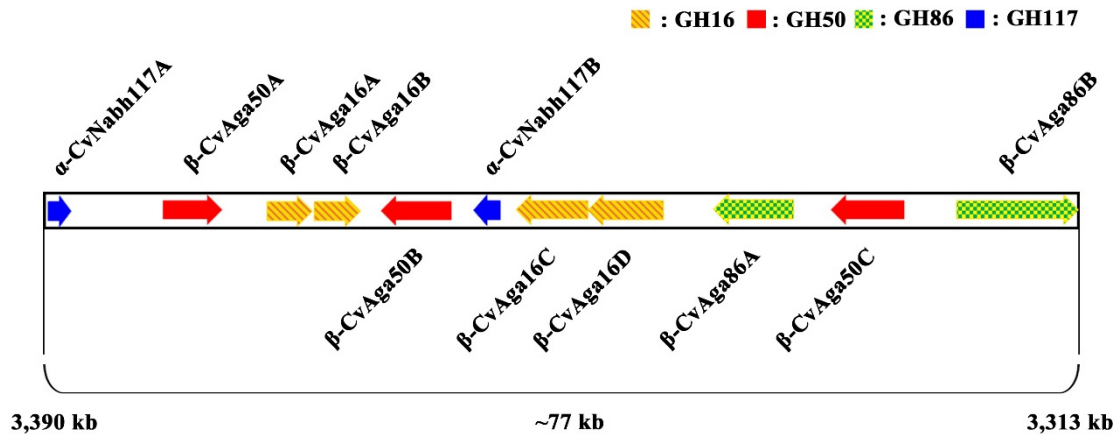


Fig 1. Structural organization of the *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 agarase gene cluster (~77 kb) encoding nine β -agarases and two α -neoagarobiose hydrolases (α -NABHs).

Table 1. Predicted agarose genes in the genome of *Cellvibrio* sp. KY-GH-1

Gene name	Mode of activity	Nucleotide length (bp)	Amino acid length	Protein size (kDa)	Major products
GH16A β -agarase	endolytic- β -agarase	1,434	477	52.0	NA4, NA6
GH16B β -agarase	endolytic- β -agarase	1,794	597	63.8	NA4, NA6
GH16C β -agarase	endolytic- β -agarase	1,773	590	64.3	NA4, NA6
GH16D β -agarase	endolytic- β -agarase	2,997	998	108.1	NA4, NA6
GH50A β -agarase	exolytic- β -agarase	2,397	798	89.5	NA2
GH50B β -agarase	exolytic- β -agarase	2,319	772	87.9	NA2
GH50C β -agarase	exolytic- β -agarase	2,313	770	87.7	NA2
GH86A β -agarase	endolytic- β -agarase	2,136	711	78.6	NA6, NA8
GH86B β -agarase	endolytic- β -agarase	4,503	1,504	160.3	NA6, NA8
GH117A α -NABH	α -NABH	1,095	364	40.9	L-AHG, D-galactose
GH117B α -NABH	α -NABH	1,179	392	44.2	L-AHG, D-galactose

NA2를 생성시킬 것이며, 마지막으로 GH117 α -NABHs의 작용에 의해 NA2가 단량체인 L-AHG 및 D-갈락토오스로 분해되는 순서로 진행될 것으로 예상되었다(Fig. 3).

Escherichia coli 단백질 발현계를 이용한 KY-GH-1 균주 유래 3개의 GH50 패밀리 β -아가레이즈 및 2개의 GH117 α -NABH 재조합 효소단백질들의 발현 및 효소 활성 비교

한천 분해 세균 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주의 유전체 상의 아가레이즈 유전자 클러스터 내에 존재하고 있는 3개의 GH50 패밀리 아가레이즈 유전자들(GH50A, GH50B, GH50C)과 2개의 GH117 패밀리 α -NABH 유전자들(GH117A α -NABH, GH117B α -NABH)에 의해 암호화되는 각 효소 단백질을 확보하기 위해 이들 유전자들을 *E. coli* 단백질 발현계와 pET-30a 벡터 플라스미드를 이용하여 His-tagging된 재조합 효소단백질들로 발현시킨 후 정제하여 각 효소들의 활성을 비교하였다. 그 결과, GH50A β -아가레이즈가 3개의 동위효소들(isozymes) 중에서 가장 강력한 엑소형 β -아가레이즈 활성을 발휘하는 것으로 나타났으나 GH50B β -아가레이즈와 GH50C β -아

가레이즈는 효소활성이 상대적으로 미약하게 나타났다[24]. 한편, 2개의 GH117 α -NABH 동위효소들 중 GH117A α -NABH는 NA2를 L-AHG 및 D-갈락토오스로 가수분해시키는 강한 효소 활성을 나타내는 반면, GH117B α -NABH는 NA2에 대한 효소 활성이 거의 나타나지 않았다[20]. 이러한 결과는, 한천 분해 세균인 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1의 아가로오스의 가수분해에 필요한 엑소형 GH50 패밀리 β -아가레이즈로서는 GH50A β -아가레이즈가, 또한 아가로오스의 가수분해에 필요한 GH117 패밀리 α -NABH로서는 GH117A α -NABH가 주된 효소임을 나타낸다.

Table 2에 나타난 바와 같이, 정제된 재조합 GH50A β -아가레이즈는 25~50°C의 온도범위와 pH 6.0~10.0 범위에서 높은 효소활성이 나타났으며, 35°C 이하의 온도에서 그리고 pH 7.0~9.0 범위에서 안정한 것으로 나타났다. 이에 비해 정제된 재조합 GH117A α -NABH는 30~35°C의 온도범위와 pH 7.0~7.5 범위에서 높은 효소활성을 보였으며, 35°C 이하의 온도에서 그리고 pH 7.0~7.5 범위에서 안정성을 보였다. 아울러 이들 정제된 재조합 GH50A β -아가레이즈와 GH117A α -NABH의

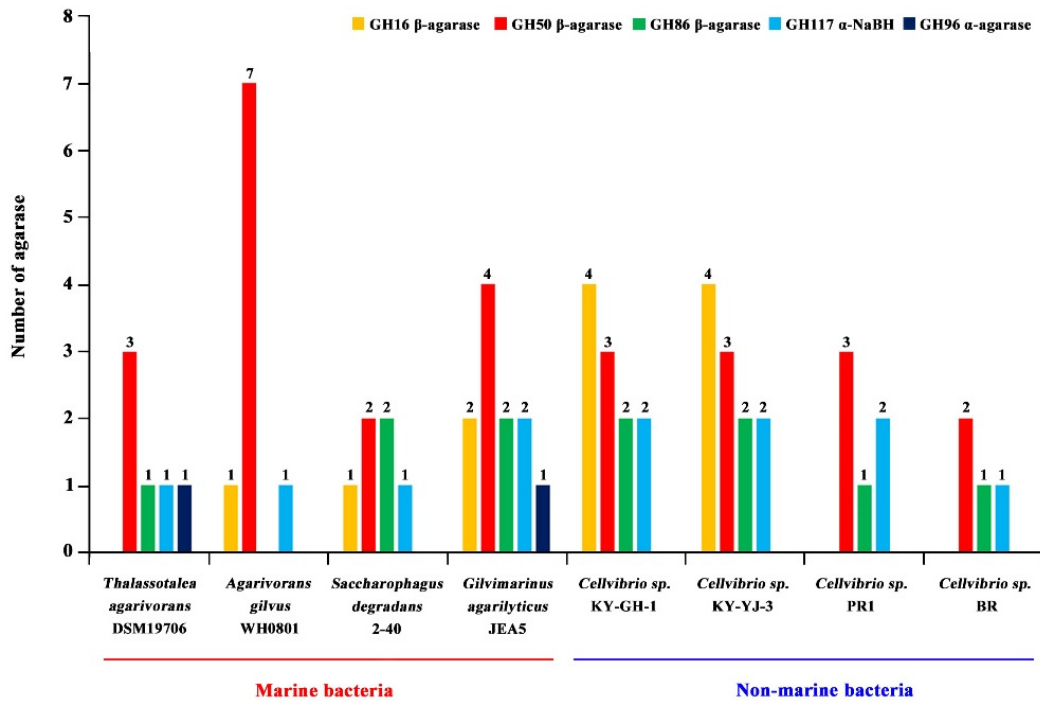


Fig. 2. Distribution of predicted agarose-degrading enzyme genes in the genomes of marine agarolytic bacteria and non-marine agarolytic bacteria.

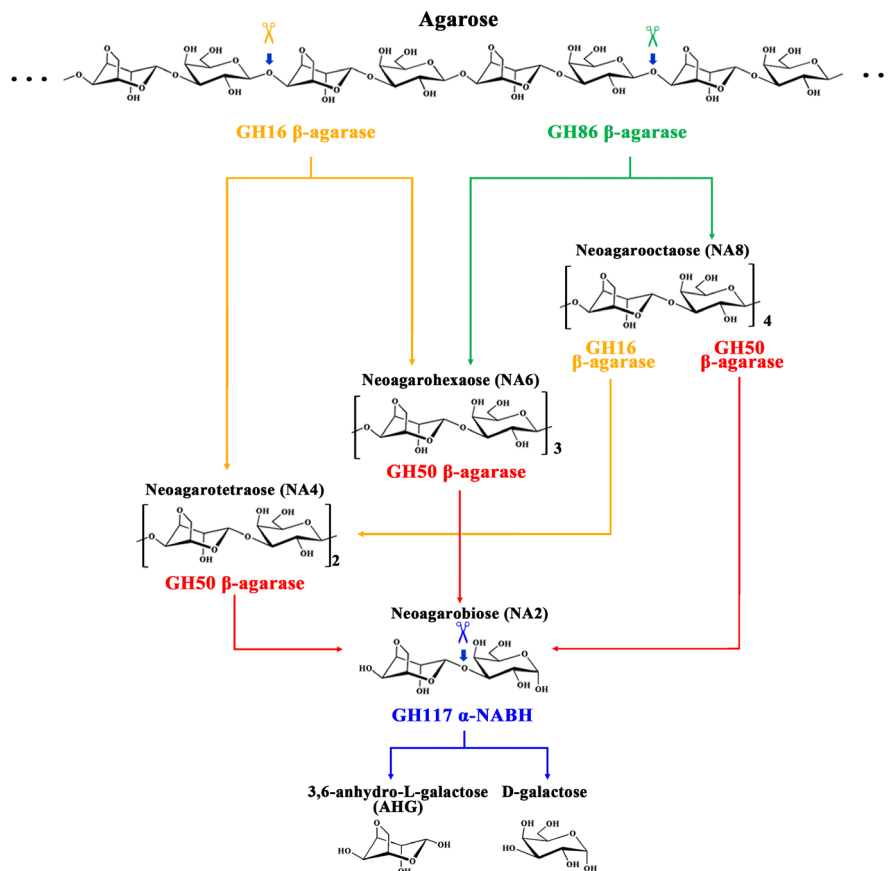


Fig. 3. Schematic diagram of enzymatic process by which *Cellvibrio sp.* KY-GH-1 degrades agarose.

Table 2. Enzymatic characteristics of recombinant GH50A β -agarase and GH117A α -NABH from *Cellvibrio* sp. KY-GH-1

	Temperature ($^{\circ}$ C)		pH		Kinetic parameters			
	Optimum	Stability	Optimum	Stability	Km	Vmax	Kcat	Kcat/Km
GH50A β -agarase	25~50	≤ 35	6.0~10.0	7.0~9.0	26.5 mg/ml	16.9 U/mg	25.2 s ⁻¹	1.2 $\times 10^5$ s ⁻¹ M ⁻¹
GH117A α -NABH	30~35	≤ 35	7.0~7.5	7.0~7.5	16.0 mM	20.8 U/mg,	14.2 s ⁻¹	8.9 $\times 10^2$ s ⁻¹ M ⁻¹

아가로오스 및 NA2 기질에 대한 각각의 효소반응속도 상수들인 Km, Vmax, Kcat 및 Kcat/Km 값을 측정된 결과, 이들 효소들의 각 기질에 대한 친화력 및 반응속도는 아가로오스 기질로부터 NA2를 대량생산하는 효소 공정이나 NA2기질로부터 L-AHG 및 D-갈락토오스를 대량생산하는 효소 공정에 유용하게 활용될 수 있음을 시사하였다.

한편, 정제된 GH50A β -아가레이즈의 효소 활성은 5 mM EDTA에 의해 전혀 영향을 받지 않았지만, 5 mM MnCl₂ 또는 5 mM MnSO₄의 존재 하에서 1.7~1.8 배까지 향상되었고 SH 환원제로 알려진 tris(2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP)를 5~10 mM 첨가할 경우에도 1.2~1.4배까지 활성이 증가하였다. 이러한 GH50A β -아가레이즈 효소 활성을 증진시키는 Mn²⁺ 및 TCEP의 효과는 농도 의존적으로 나타났다. 특히, 5 mM MnSO₄와 10 mM TCEP가 동시에 첨가되는 경우, GH50A β -아가레이즈 효소 활성이 최대 2.5 배까지 상승하는 것으로 나타났다. 이를 통해 GH50A β -아가레이즈 활성에 대한 Mn²⁺ 및 TCEP의 시너지 효과가 있음을 확인하였다. 비록 GH117A α -NABH 효소활성은 5 mM EDTA의 존재 하에서는 활성의 85%가 억제되어, 5 mM EDTA의 영향을 전혀 받지 않는 것으로 나타난 GH50A β -아가레이즈의 경우와는 현저한 차이를 보인 반면, Mn²⁺ 및 TCEP의 첨가 시에는 GH50A β -아가레이즈와 동일하게 활성이 농도 의존적으로 증가하였으며, 5 mM MnSO₄ 및 10 mM TCEP를 첨가할 경우 활성이 각각 1.5배 및 1.7배로 향상되었다. 또한 5 mM MnSO₄와 10 mM TCEP가 동시에 첨가될 경우에는 효소 활성이 2.4배 까지 현저하게 증가되는 시너지 효과도 확인되었다.

일반적으로 해양성 세균 유래 β -아가레이즈들의 효소활성은 보통 Mg²⁺와 Na⁺의 존재에 의존적이다[6, 16, 37]. 그러나 담수 환경에서 분리된 한천 분해 세균인 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주 유래의 GH50A β -아가레이즈와 GH117A α -NABH의 효소 활성은 MgCl₂ 및 NaCl에 의해 영향을 받지 않았다. 오히려 Mn²⁺ 혹은 환원제 TCEP의 첨가에 의해 활성이 증가되었으며, 특히 Mn²⁺과 TCEP를 동시에 첨가할 경우 효소 활성이 2배 이상 증가되는 특성이 공통적으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 비해양성의 담수 환경에 서식하는 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주 유래의 한천 분해 효소들이 적절한 활성을 나타내기 위해 망간 이온을 필요로 하며, 효소 활성이 효소 단백질의 SH 그룹의 산화를 방지하는 환원제 TCEP에 의해 촉진될 수

있음을 시사한다.

재조합 GH50A β -아가레이즈 및 재조합 GH117A α -NABH의 기질 분해 양상

Cellvibrio sp. KY-GH-1 균주 유래의 재조합 GH50A β -아가레이즈의 기질 분해 기전을 조사하기 위해, 아가로오스 또는 NA2~NA18의 NAOS 혼합물을 기질로 하여 GH50A β -아가레이즈 효소를 시간 별로 처리하여 준비된 가수분해생성물을 박층 크로마토그래피(TLC) 및 액체 크로마토그래피/ 텐덤질량분석기(LC-MS/MS)로 분석한 결과, GH50A β -아가레이즈는 아가로오스의 엑소형 가수분해를 통해 효소반응개시로부터 NA2를 주로 생성하였다[24]. 또한, NA6 혹은 NA6보다 더 큰 DP를 갖는 NAOS가 NA2를 생성시키는 효소작용에 선호되는 기질임을 확인하였다. 뿐만 아니라 GH50A β -아가레이즈는 아가로오스를 초산과 같은 약산의 처리로 액화시켜 얻은 다양한 중합도(degrees of polymerization, DPs)의 AOS 혼합물도 가수분해하여 최종적으로는 NA2를 주생성물로 그리고 AOS의 비환원성 말단을 처음 가수분해할 때 절단되어 생성되는 아가로트리오스(A3)를 부생성물로 생성시키는 것으로 확인되었다(Fig. 4).

최근까지 보고된 GH50 패밀리의 β -아가레이즈들 중에서 AOS의 비환원 말단에서 A3를 먼저 분해하여 제거한 다음, 비환원성 말단에서 엑소형으로 NA2를 연속적으로 분해하여 생성시키는 효소는 보고된 바가 없다. 따라서 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주 유래의 GH50A β -아가레이즈는 이러한 반응을 촉매할 수 있는 최초의 효소라고 할 수 있다. 또한 대부분의 보고된 GH50 패밀리의 β -아가레이즈들은 엑소형 및 엔도형 가수분해작용을 통해 아가로오스 기질로부터 NA4 또는 NA2/NA4를 생성하지만[8, 13, 14, 16, 28], *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주 유래 GH50A β -아가레이즈와 같이 엑소형 가수분해작용을 통해 아가로오스에서 NA2만을 주로 생성하는 경우는 비교적 드문 실정이다. 따라서 담수 환경 한천 분해 세균 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1에서 유래하는 GH50A β -아가레이즈의 효소학적 성질은 알려진 GH50 패밀리의 β -아가레이즈들 중에서도 독특하며, 아가로오스, NAOS뿐만 아니라 AOS도 엑소형으로 가수분해하여 NA2를 주요 산물로 최종 생산할 수 있는 매우 유용한 효소 소재로 사료된다.

재조합 GH117A α -NABH의 NA2 가수분해 활성을 TLC로

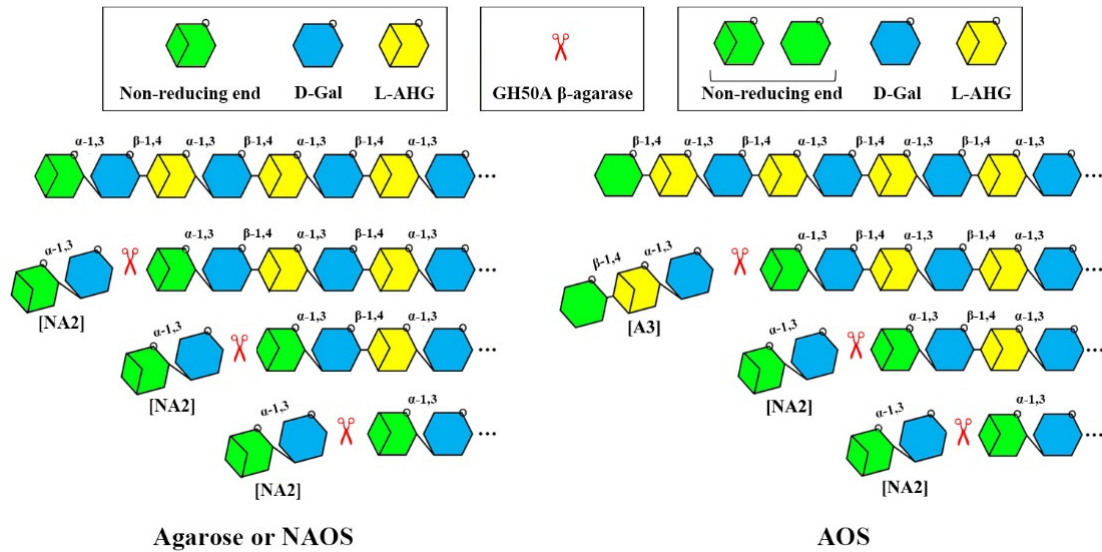


Fig. 4. Degradation mode of agarose, NAOS, or AOS by GH50A β -agarase.

조사했을 때에도 GH117A α -NABH는 NA2를 L-AHG와 D-갈락토오스로 완전히 가수분해하였지만, NA4 및 NA6에 대해서는 효소 활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 5) [20]. 또한 NA2~NA18의 NAOS 혼합물을 기질로 하여 재조합 GH117A α -NABH를 처리한 후 TLC로 조사하였을 때에도,

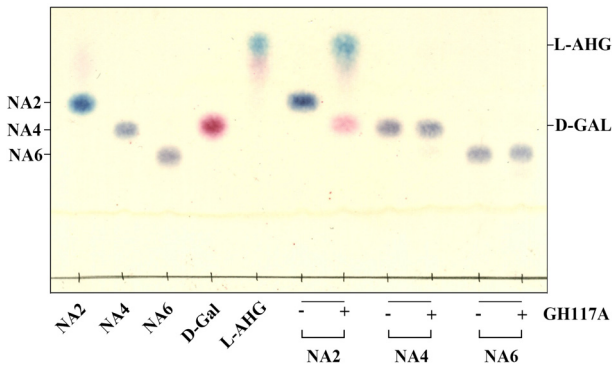


Fig. 5. Analysis of GH117A α -NABH-catalyzed hydrolysates of authentic NA2, NA4, or NA6 by TLC. NA2 (0.4%) was incubated with purified GH117A α -NABH (10 μ g/ml) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 35 $^{\circ}$ C for 30 min. Equivalent amounts of individual reaction mixtures were analyzed by TLC. TLC analysis for individual samples was performed using Silica Gel 60 aluminum plates (F254 Merck, Darmstadt, Germany) and developed with n-butanol-ethanol-H₂O [3:2:2 (v/v)]. Saccharides were visualized with ethanol solution containing 0.2% (w/v) naphthoresorcinol and 10% (v/v) H₂SO₄, and then heating at 80 $^{\circ}$ C. NA2, NA4, and NA6 were purchased from Carbosynth Ltd. (Berkshire, UK). D-galactose was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). L-AHG was purified from GH117A α -NABH-catalyzed hydrolysates of NA2 [20].

NA2는 L-AHG와 D-갈락토오스로 분해되는 반면, NA4~NA18 등의 NAOS들은 GH117A α -NABH에 의해 분해되지 않는 것으로 나타났다. 이러한 연구결과는 NA2가 GH117A α -NABH 가수분해 작용에 특화된 유일한 기질임을 보여준다.

최근까지의 여러 연구보고들을 통해, α -NABH를 포함한 GH117 패밀리의 α -NAOSH는 NA2를 기질로 가수분해하여 단량체인 L-AHG와 D-갈락토오스를 생성할 뿐만 아니라, NA4 혹은 NA6에도 작용하여 L-AHG와 A3 혹은 L-AHG와 아가로펜타오스(A5)를 생성하는 것으로 알려졌다[3, 15, 35]. 특히, *Streptomyces coelicolor* A3 (2) 유래의 α -NAOSH 경우는 2~14의 DP의 NAOS를 기질로 인식하고 이들 각 NAOS의 비환원성 말단에서 첫 번째 α -1,3-글리코시드 결합만을 가수분해하여 L-AHG와 함께 잔여물인 AOS를 생성시키는 것으로 보고되었다[21]. 그러나 *Cellvibrios* sp. KY-GH-1 유래의 재조합 GH117A α -NABH는 NA2에 대해 기질 특이성을 나타내는 특징이 있기 때문에, 기존의 보고된 GH117 패밀리의 α -NABH 효소들과는 뚜렷이 구별된다. 따라서, 아가로오스로부터 단량체인 L-AHG와 D-갈락토오스를 대량생산하고자 하는 효소 공정에 *Cellvibrios* sp. KY-GH-1 유래의 재조합 GH50A β -아가레이즈와 혼합하여 사용할 경우, L-AHG의 생산효율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

최적 반응 조건에서 GH50A β -아가레이즈 처리에 의한 기질(아가로오스 혹은 AOS)의 분해 및 NA2의 수율

재조합 GH50A β -아가레이즈가 아가로오스로부터 NA2의 대량 생산에 적합한 효소인지를 추가적으로 조사하기 위해 최적의 반응 조건(5 mM MnSO₄, 10 mM TCEP, 35 $^{\circ}$ C, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5)에서 0.4% 아가로오스를 GH50A β -아가레이즈로 가수분해 시킨 후 NA2의 수율을 조사하였다. 최적의

반응 조건에서 4시간 동안 처리하면서 0.4% 아가로오스로부터 환원당을 최대한 생산하는 데 필요한 GH50A β -아가레이즈의 농도를 DNS 방법으로 측정한 결과, 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 나타났다. 동일한 조건에서 12시간 동안 처리했을 때 환원당의 최대 생산에 필요한 효소의 농도는 5 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다. 이러한 결과를 토대로, 0.4% 아가로오스 기질을 GH50A β -아가레이즈(20 $\mu\text{g/ml}$)로 4시간 동안 최적 조건에서 처리한 후 반응 생성물을 동결건조하였고, 건조된 시료를 3차 증류수에 녹인 후 Bio-Gel P-2 컬럼(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 분자체 크로마토그래피(molecular sieve chromatography)를 수행하여 효소 가수분해물에 함유된 NA2를 정제하였다. 이 때 아가로오스로부터의 NA2의 회수율은 ~54%로 나타났다.

한편, GH50A β -아가레이즈가 AOS에서 NA2 생산을 위한 효율적인 효소인지 여부를 조사하기 위해 0.4% 아가로오스의 실험과 동일한 반응조건에서 AOS를 GH50A β -아가레이즈로 처리하여 NA2 생산수율을 조사하였다. 이때 아가로오스를 약한 산으로 처리하여 AOS 혼합물로 전환시키기 위해, 먼저 아가로오스를 3 M 아세트산 용액에 1% 농도로 첨가한 후 3시간 동안 80°C에서 처리하였다. 이를 5 M NaOH를 사용하여 pH를 7.0에 근사하게 중화시켜 동결 건조한 후, 얻어진 고체 분말을 95% (v/v)의 차가운 에탄올로 3회 세척하여 아세트산 나트륨염을 제거하였으며, 이를 회전증발기로 건조하여 AOS 분말을 확보하였다. 1.0% AOS를 20 $\mu\text{g/ml}$ GH50A β -아가레이즈로 최적의 반응조건에서 4시간 동안 처리한 후, 반응 생성물을 동결 건조하였다. 건조된 시료를 3차 증류수에 녹인 후 Sephadex G-10 컬럼(GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)으로 분자체 크로마토그래피를 수행하여, 효소 가수분해물에 함유된 NA2를 정제하였다. 이 때 AOS로부터의 NA2의 회수율은 ~61%로 나타났다.

최적 반응 조건에서 GH117A α -NABH 처리에 의한 NA2 분해 및 L-AHG의 수율

제조합 GH117A α -NABH가 NA2로부터 L-AHG 생산에 효율적인 효소인지 알아보기 위해, GH117A α -NABH가 L-AHG와 D-갈락토오스로 완전히 가수분해시킬 수 있는 NA2의 최대 농도를 조사하였다. 서로 다른 농도(2.0%, 3.0%, 4.0% 및 5.0%)의 NA2를 최적의 반응 조건(5 mM MnSO_4 및 10 mM TCEP, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 35°C)에서 GH117A α -NABH (40 $\mu\text{g/ml}$)로 14시간 동안 처리한 결과, NA2의 L-AHG 및 D-갈락토오스로의 완전한 가수분해는 2.0~5.0% 농도의 NA2에서 모두 확인되었다.

한편, 5% NA2를 GH117A α -NABH (40 $\mu\text{g/ml}$)로 최적의 반응조건으로 14시간 동안 처리한 후, 효소 반응물을 동결 건조한 뒤 건조된 시료를 3차 증류수에 녹이고 Sephadex G-10 컬럼을 사용한 분자체 크로마토그래피를 수행하여 정제한 결

과, NA2 기질로부터 이론적 최대 수율의 ~92%에 해당하는 L-AHG를 회수할 수 있었다.

결론

담수 한천 분해 세균 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1에서 유래한 제조합 GH50A β -아가레이즈는 아가로오스 기질에 작용하여 주된 가수분해산물로서 NA2를 생성하였다. 효소 활성은 pH 6.0~10.0, 20~50°C에서 최대 활성의 80% 이상을 나타내었으며, Mn^{2+} 와 환원제 TCEP의 공존으로 2.5배 향상되었지만 5 mM EDTA의 영향은 받지 않았다. 아가로오스 기질에 대한 GH50A β -아가레이즈의 K_m , V_{max} , K_{cat} 및 K_{cat}/K_m 값은 각각 26.5 mg/ml, 16.9 U/mg, 25.2 s^{-1} , 및 $1.2 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 로 나타났다. GH50A β -아가레이즈는 여러 중합도(DPs)의 NAOS 혼합물(NA2~NA18)을 기질로 가수분해하여 NA2를 생성하며, NA2 생성을 위한 기질로서는 NA4보다 NA6~NA18을 더 선호하였다. 또한 GH50A β -아가레이즈에 의한 NA2의 생산을 위한 기질로서는 아가로오스를 엔도형 β -아가레이즈로 전처리하여 제조한 NAOS 혼합물(NA6~NA18)이 아가로오스 혹은 약산인 아세트산으로 아가로오스를 전처리하여 제조한 다양한 DPs의 AOS 혼합물에 비해 더 선호됨을 확인되었다. GH50A β -아가레이즈의 효소학적 특성은 아가로오스를 ~54% 수율로 NA2로 전환하는 단일공정 또는 GH16/GH86/GH118과 같은 엔도형 β -아가레이즈들과의 복합처리 공정에 매우 유용할 수 있음을 보여주었다.

Cellvibrio sp. KY-GH-1 균주 유래의 제조합 GH117A α -NABH는 최대 5%의 NA2를 단량체인 L-AHG 및 D-갈락토오스로 완전히 가수분해하였다. 기질인 NA2를 제외하고는 NA4~NA18들 중에서 어느 것도 GH117A α -NABH의 가수분해작용을 받지 않았으며, 이를 통해 GH117A α -NABH의 효소작용은 NA2에 특화되어 있음을 확인하였다. 기질 NA2에 대한 GH117A α -NABH 효소의 가수분해작용의 최적 온도와 pH는 각각 35°C와 7.5였다. GH117A α -NABH 효소의 활성은 35°C까지, 그리고 pH 7.0~7.5 범위에서는 안정한 반면 35°C 이상 및 pH 7.0~7.5 범위를 넘어서면 불안정한 것으로 나타났다. GH117A α -NABH 효소 활성은 5 mM MnSO_4 및 10 mM TCEP가 공존할 경우에 2.4배 향상되었다. NA2 기질에 대한 GH117A α -NABH 효소의 K_m , V_{max} , K_{cat} 및 K_{cat}/K_m 값은 각각 16.0 mM, 20.8 U/mg, 14.2 s^{-1} 및 $8.9 \times 10^2 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 이었다. 특히, 5 mM MnSO_4 및 10 mM TCEP가 공존할 경우 NA2 기질에 대한 GH117A α -NABH의 K_m , V_{max} , K_{cat} 및 K_{cat}/K_m 값이 각각 5.8 mM, 33.7 U/mg, 23.0 s^{-1} 및 $4.0 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 인 것으로 나타났다. 이러한 제조합 α -NABH의 효소학적 특성은 이당류인 NA2를 단량체인 L-AHG 및 D-갈락토오스로 분해시키는 1단계 효소공정을 통한 L-AHG의 대량 생산에 유용할 수 있음을 시사한다.

아울러 이러한 연구결과를 종합해 볼 때, GH50A β -아가레이즈와 GH117A α -NABH를 복합 처리하는 효소 공정은 단당류인 L-AHG 및 D-갈락토오스를 생산하는 아가로오스 바이오매스의 당화공정에 매우 유용할 것으로 기대된다.

또한, 미국 국립보건원(NIH) GenBank 데이터베이스에 수록되어 있는 GH50 패밀리의 β -아가레이즈들 중에서 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 유래 GH50A β -아가레이즈와 아미노산 서열에서 높은 수준의 상동성(62.7~96.9%)을 보이는 9개의 β -아가레이즈들 뿐만 아니라 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 유래 GH117A α -NABH와 아미노산 서열에서 높은 수준의 상동성(76.5~97.5%)을 보이는 8개의 α -NABH들 대부분은 현재까지 효소학적 특성에 대해 연구조사가 수행되지 않았기 때문에 본 총설에서 제시하는 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 균주의 GH50A β -아가레이즈 및 GH117A α -NABH에 대한 연구 결과들은 이들 효소들과 높은 상동성을 나타내는 기타 GH50A β -아가레이즈들 및 GH117A α -NABH들에 대한 통찰력을 제공할 수 있다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Agbo, J. A. C. and Moss, M. O. 1979. The Isolation and characterization of agarolytic bacteria from a lowland river. *J. Gen. Microbiol.* **115**, 355-368.
- Alkotaini, B., Han, N. S. and Kim, B. S. 2017. Fusion of agarase and neoagarobiose hydrolase for mono-sugar production from agar. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**, 1573-1580.
- Ariga, O., Okamoto, N., Harimoto, N. and Nakasaki, K. 2014. Purification and characterization of α -neoagarooligosaccharide hydrolase from *Cellvibrio* sp. OA-2007. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 48-51.
- Bannikova, G. E., Lopatin, S. A., Varlamov, V. P., Kuznetsov, B. B., Kozina, I. V., Miroshnichenko, M. L., Chernykh, N. A., Turova, T. P. and Bonch-Osmolovskaia, E. A. 2008. The thermophilic bacteria hydrolyzing agar: Characterization of thermostable agarase. *Appl. Biochem. Microbiol.* **45**, 366-371.
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. and Henrissat, B. 2009. The carbohydrate-active EnZyme database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res.* **37**, D233-338.
- Charrier, J. G. and Anastasio, C. 2012. On dithiothreitol (DTT) as a measure of oxidative potential for ambient particles: evidence for the importance of soluble transition metals. *Atmos. Chem. Phys.* **12**, 11317-11350.
- Chen, H. M. and Yan, X. J. 2005. Antioxidant activities of agaro-oligosaccharides with different degrees of polymerization in cell-based system. *Biochi. Biophys. Acta* **1722**, 103-111.
- Chen, Z. W., Lin, H. J., Huang, W. C., Hsuan, S. L., Lin, J. H. and Wang, J. P. 2018. Molecular cloning, expression, and functional characterization of the β -agarase AgaB-4 from *Paenibacillus agarexedens*. *AMB Exp.* **8**, 49.
- Chi, W. J., Chang, Y. K. and Hong, S. K. 2012. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 917-930.
- Duckworth, M. and Yaphe, W. 1971. The structure of agar. Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**, 189-197.
- Enoki, T., Tominaga, T., Takashima, F., Ohnogi, H., Sagawa, H. and Kato, I. 2012. Anti-tumor-promoting activities of agaro-oligosaccharides on two-stage mouse skin carcinogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 1145-1149.
- Flament, D., Barbeyron, T., Jam, M., Potin, P., Czjzek, M., Kloareg, B. and Michel, G. 2007. α -Agarases define a new family of glycoside hydrolases, distinct from β -agarase families. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4691-4694.
- Fu, X. T. and Kim, S. M. 2010. Agarase: review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Mar. Drugs* **8**, 200-218.
- Fu, X. T., Lin, H. and Kim, S. M. 2008. Purification and characterization of a novel β -agarase, AgaA34, from *Agarivorans albus* YKW-34. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 265-273.
- Ha, S. C., Lee, S., Lee, J., Kim, H. T., Ko, H. J., Kim, K. H. and Choi, I. G. 2011. Crystal structure of a key enzyme in the agarolytic pathway, α -neoagarobiose hydrolase from *Saccharophagus degradans* 2-40. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **412**, 238-244.
- Han, W., Cheng, Y., Wang, D., Wang, S., Liu, H., Gu, J., Wu, Z. and Li, F. 2016. Biochemical characteristics and substrate degradation pattern of a novel exo-type β -agarase from the polysaccharide-degrading marine bacterium *Flammeovirga* sp. strain MY04. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 4944-4954.
- Hong, S. J., Lee, J. H., Kim, E. J., Yang, H. J., Park, J. S. and Hong, S. K. 2017. Anti-obesity and anti-diabetic effect of neoagarooligosaccharides on high-fat diet-Induced obesity in mice. *Mar. Drugs* **15**, 90
- Hu, B., Gong, Q., Wang, Y., Ma, Y., Li, J. and Yu, W. 2006. Prebiotic effects of neoagaro-oligosaccharides prepared by enzymatic hydrolysis of agarose. *Anaerobe* **12**, 260-266.
- Jahromi, S. T. and Barzkar, N. 2018. Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 6847-6863.
- Jang, W. Y., Kwon, M. J., Kim, K. Y. and Kim, Y. H. 2021. Enzymatic characterization of a novel recombinant 1,3- α -D-galactosidase specific for neoagarobiose hydrolysis into monosaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- Jiang, C., Liu, Z., Sun, J. and Mao, X. 2020. Characterization of a novel α -neoagarobiose hydrolase capable of preparation of medium- and long-chain agaro-oligosaccharides. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 470.
- Kobayashi, R., Takisada, M., Suzuki, T., Kirimura, K. and Usami, S. 1997. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 162-163.

23. Kwon, G. H., Kwon, M. J., Park, J. E. and Kim, Y. H. 2019. Whole genome sequence of a freshwater agar-degrading bacterium *Cellvibrio* sp. KY-GH-1. *Biotechnol. Rep.* **23**, e00346.
24. Kwon, M. J., Jang, W. Y., Kim, G. M. and Kim, Y. H. 2020. Characterization and application of a recombinant exolytic GH50A β -agarase from *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 for enzymatic production of neoagarobiose from agarose. *ACS Omega* **5**, 29453-29464.
25. Lee, C. H., Lee, C. R. and Hong, S. K. 2019. Biochemical characterization of a novel cold-adapted agarotetraose-producing α -agarase, AgaWS5, from *Catenovulum sediminis* WS1-A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 8403-8411.
26. Lee, M. H., Jang, J. H., Yoon, G. Y., Lee, S. J., Lee, M. G., Kang, T. H. and Park, Y. M. 2017. Neoagarohexaose-mediated activation of dendritic cells via Toll-like receptor 4 leads to stimulation of natural killer cells and enhancement of antitumor immunity. *BMB Rep.* **50**, 263-268.
27. Lee, Y., Lee, S. J., Park, G. H., Heo, S. J., Umasutha, N., Kang, D. and Oh, C. 2015. Draft genome of agar-degrading marine bacterium *Gilvamarinus agarilyticus* JEA5. *Mar. Genomics* **21**, 13-14.
28. Li, G., Sun, M., Wu, J., Ye, M., Ge, X., Wei, W., Li, H. and Hu, F. 2015. Identification and biochemical characterization of a novel endo-type β -agarase AgaW from *Colmella* sp. strain LGH. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 10019-10029.
29. Liang, Y., Ma, X., Zhang, L., Li, F., Liu, Z. and Mao, X. 2017. Biochemical characterization and substrate degradation mode of a novel exotype β -agarase from *Agarivorans gilvus* WH0801. *J. Agric. Food Chem.* **65**, 7982-7988.
30. Michel, G., Nyval-Collen, P., Barbeyron, T., Czjzek, M. and Helbert, W. 2006. Bioconversion of red seaweed galactans. A focus on bacterial agarases and carrageenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 23-33.
31. Rhee, Y. J., Han, C. R., Kim, W. C., Jun, D. Y., Rhee, I. K. and Kim, Y. H. 2010. Isolation of a novel freshwater agarolytic *Cellvibrio* sp. KY-YJ-3 and characterization of its extracellular β -agarase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1378-1385.
32. Wang, Q., Sun, J., Liu, Z., Huang, W., Xue, C. and Mao, X. 2018. Coimmobilization of β -agarase and α -neoagarobiose hydrolase for enhancing the production of 3,6-anhydro-L-galactose. *J. Agric. Food Chem.* **66**, 7087-7095.
33. Wang, W., Liu, P., Hao, C., Wu, L., Wan, W. and Mao, X. 2017. Neoagaro-oligosaccharide monomers inhibit inflammation in LPS-stimulated macrophages through suppression of MAPK and NF- κ B pathways. *Sci. Rep.* **7**, 44252.
34. Wang, Y., Liu, T., Ming, H., Sun, P., Cao, C., Guo, M., Du, J., Zhou, C. and Zhu, W. 2018. *Thalassotalea atypica* sp. nov., isolated from seawater, and emended description of *Thalassotalea eurytherma*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**, 271-276.
35. Watanabe, T., Kashimura, K. and Kirimura, K. 2017. Purification, characterization and gene identification of a α -neoagarooligosaccharide hydrolase from an alkaliphilic bacterium *Cellvibrio* sp. WU-0601. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic* **133**, S328-336.
36. Weiner, R. M., Taylor II, L. E., Henrissat, B., Hauser, L., Land, M., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Saunders, E. H., Longmire, A. G., Zhang, H., Bayer, E. A., Gilbert, H. J., Larimer, F., Zhulin, I. B., Ekborg, N. A., Lamed, R., Richardson, P. M., Borovok, I. and Hurcheson, S. 2008. Complete genome sequence of the complex carbohydrate-degrading marine bacterium, *Saccharophagus degradans* strain 2-40T. *PLoS Genet.* **4**, e1000087.
37. Xie, W., Lin, B., Zhou, Z., Lu, G., Lun, J., Xia, C., Li, S. and Hu, Z. 2013. Characterization of a novel β -agarase from an agar-degrading bacterium *Catenovulum* sp. X3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 4907-4915.
38. Xie, Z., Lin, W. and Luo, J. 2017. Comparative phenotype and genome analysis of *Cellvibrio* sp. PR1, a xylanolytic and agarolytic bacterium from the Pearl River. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 6304248.
39. Yun, E. J., Lee, A. R., Kim, J. H., Cho, K. M. and Kim, K. H. 2017. 3,6-Anhydro-L-galactose, a rare sugar from agar, a new anticariogenic sugar to replace xylitol. *Food Chem.* **221**, 976-983.
40. Yun, E. J., Lee, S., Kim, J. H., Kim, B. B., Kim, H. T., Lee, S. H., Pelton, J. G., Kang, N. J., Choi, I. G. and Kim, K. H. 2013. Enzymatic production of 3,6-anhydro-L-galactose from agarose and its purification and *in vitro* skin whitening and anti-inflammatory activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 2961-2970.
41. Zhang, P., Rui, J., Du, Z., Xue, C., Li, X. and Mao, X. 2016. Complete genome sequence of *Agarivorans gilvus* WH0801 (T), an agarose-producing bacterium isolated from seaweed. *J. Biotechnol.* **219**, 22-23.

초록 : *Cellvibrio* sp. KY-GH-1의 아가로오스 당화 관련 엑소형 GH50A β -아가레이즈와 GH117A α -NABH의 특성 및 NA2와 L-AHG 양산에의 적용 가능성

장원영 · 이희경 · 김영호*

(경북대학교 자연과학대학 생명과학부)

최근, 본 연구진은 담수 환경 유래 한천 분해 세균인 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 (KCTC13629BP)의 전체 유전체 염기 서열을 분석하여 아가로오스를 L-AHG 및 D-갈락토오스로 가수분해시키는 아가레이즈들을 암호화하는 유전 정보를 탐색하였다. 그 결과, KY-GH-1 균주는 유전체 상의 약 77 kb 길이의 아가레이즈 유전자 클러스터 내에 9개의 β -아가레이즈 유전자들과 2개의 α -네오아가로비오스 가수분해효소(α -NABH) 유전자들을 지닌 것으로 나타났다. 이러한 유전자 정보를 바탕으로 KY-GH-1 균주가 한천을 탄소원으로 자화하기 위해 단량체인 L-AHG와 D-갈락토오스로 분해시키는 공정은, 엔도형 GH16 β -아가레이즈, 엔도형 GH86 β -아가레이즈 등에 의해 개시되어 NA4, NA6, NA8 등을 생성시킨 후, 이들에 대해 엑소형 GH50 β -아가레이즈가 추가로 작용하여 NA2를 생성시키고, 이어서 GH117 α -NABH가 작용하여 생성된 NA2를 단량체 L-AHG와 D-갈락토오스로 분해함으로써 종결되는 것으로 예측되었다. 대장균 발현 시스템과 PET-30a 벡터를 함께 사용하여, KY-GH-1 균주 유래의 GH50 패밀리의 β -아가레이즈 유전자들(GH50A, GH50B, GH50C)과 GH117 패밀리의 α -NABH 유전자들(GH117A α -NABH, GH117B α -NABH)을 발현시켜 His-태그 재조합 효소단백질들로 확보하여, 이들 효소단백질을 이용하여 효소 활성을 비교 분석한 결과, 재조합 GH50A β -아가레이즈가 세 개의 GH50A 패밀리의 β -아가레이즈 동위효소들 중에서 가장 높은 엑소형 β -아가레이즈 활성을 나타내며, 또한 재조합 GH117A α -NABH가 NA2를 L-AHG와 D-갈락토오스로 강력하게 가수분해할 수 있으나 재조합 GH117B α -NABH는 NA2 가수분해 활성이 없음을 확인하였다. 연이어 GH50A β -아가레이즈 및 GH117A α -NABH의 효소 특성을 추가로 조사하였다. 아울러 이들 각 효소가 나타내는, 아가로오스를 분해하여 NA2를 생성시키는 효율성과 NA2를 분해하여 L-AHG 및 D-갈락토오스를 생성시키는 효율성을 평가하였다. 본 총설에서는, L-AHG 및 D-갈락토오스의 양산을 위한 아가로오스의 효소적 가수분해에 성공적으로 활용될 수 있을 것으로 기대되는, 담수 유래 한천 분해 세균 *Cellvibrio* sp. KY-GH-1 유래의 재조합 GH50A β -아가레이즈 및 GH117A α -NABH의 장점들에 대해 기술한다.