

# 해양미생물 *Cellulophga* sp. J9-3이 생산하는 베타-아가레이즈의 분리 및 생화학적 특성

김다솜<sup>1</sup>, 김종희<sup>2</sup>, 지원재<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국립생물자원관 미생물자원과

<sup>2</sup>서울대학교 영양학과

Received: May 23, 2021 / Revised: July 5, 2021 / Accepted: July 7, 2021

## Purification and Biochemical Characterization of $\beta$ -agarase Produced by Marine Microorganism *Cellulophga* sp. J9-3

Da Som Kim<sup>1</sup>, Jong-Hee Kim<sup>2</sup>, and Won-Jae Chi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microorganism Resources Division, National Institute of Biological Resource, Incheon 22689, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Seoul University, Seoul 02192, Republic of Korea

*Cellulophga* sp. J9-3, is a gram-negative, aerobic marine bacterium belonging to the family *Flavobacteriaceae*. In addition to cellulose degradability, the J9-3 strain is also capable of hydrolyzing agar in the solid and liquid medium, and the production of agarase in the presence of agarose can be remarkably induced by the bacterium. From the cell culture broth of *Cellulophga* sp. J9-3, ammonium sulfate precipitation and three kinds of column chromatography were successively performed to purify a specific agarase protein, the AgaJ93. Purified AgaJ93 showed the strongest hydrolyzing activity towards agarose (approximately 22%), and even displayed activity towards starch. AgaJ93 hydrolyzed agarose into neoagarotetraose and neoagarohexaose via various oligosaccharide intermediates, indicating that AgaJ93 is an endo-type  $\beta$ -agarase. AgaJ93 showed maximum activity at a pH of 7.0 and temperature of 35 °C. Its activity increased by more than six times in the presence of  $\text{Co}^{2+}$  ions. The N-terminal sequence of AgaJ93 showed 82% homology with the heat-resistant endo-type  $\beta$ -agarase Aga2 of *Cellulophaga* sp. W5C. However, the biochemical properties of the two enzymes were different. Therefore, AgaJ93 is expected to be a novel agarase, different from the previously reported  $\beta$ -agarases.

**Keywords:** *Cellulophga* sp. J9-3, neoagarotetraose, neoagarohexaose, agarose, agar

## 서론

한천(agar)은 해조류 세포벽의 주요 성분이며, 아가로스(agarose)와 포피란(porphyrin)의 두 가지 galactan을 포함한다[1, 2]. 특히, *Gelidium*과 *Gracilaria* 속과 같은 홍조류 유래 한천은 주로 아가로스로 구성되어 있는데, 이는 agarobiose (4-O- $\beta$ -d-galactopyranosyl-3,6-anhydro-l-galactose) 단위체가  $\alpha$ -1,3 결합으로 연결된 반복된 이당류의 선형 사슬로 구성된다[3].

한천은 오랫동안 식품이나 식품성형을 위한 첨가제로 사

용해 온 안전한 식품 소재이며, 미생물 배양용 배지, 화합물의 담체, 크로마토그래피용 담체, 바이오플라스틱 소재 등으로 그 유용성이 증대하고 있다[4, 5]. 최근에는 아가로스를 효소적으로 분해한 올리고당들의 다양한 생물학적 활성이 보고되고 있다[6–9]. 또한, 아가로스의 효소적 분해 최종산물인 D-galactose나 3,6-anhydro-l-galactose 등의 활용에 관한 연구도 활발히 수행되고 있다[10, 11]. 따라서, 아가로스의 효소적 분해공정 개발은 한천 바이오메스의 산업적 이용에 가장 중요하다.

아가로스의 효소적 분해경로는 두 가지 경로가 대표적이다[2].  $\alpha$ -agarolytic 경로는  $\alpha$ -1,3 결합을 선택적으로 절단하는  $\alpha$ -agarase에 의해 주도되며, 환원말단에 3,6-anhydro-l-galactose를 갖는 일련의 agarooligosaccharides를 만들어 낸다.  $\beta$ -agarolytic 경로는  $\beta$ -1,4 결합을 선택적으로 절단하는

### \*Corresponding author

Tel.: +82-32-590-7371, Fax: +82-32-590-7230

E-mail: wjchi76@korea.kr

$\beta$ -agarase에 의해 주도되며, 환원말단에 D-galactose를 갖는 일련의 neoagarooligosaccharides를 만들어 낸다. 지금까지 보고된 agarase의 대부분은  $\beta$ -agarase에 속하며,  $\alpha$ -agarase는 5건만이 보고되어 있다[5]. 따라서, 미생물에 의한 한천 대사는 대부분  $\beta$ -agarase가 관여하는  $\beta$ -agarolytic 경로에 의한 것으로 예상할 수 있다.

그동안 다양한 미생물로부터 많은  $\beta$ -agarase가 보고되었다. 이 중에는 고온성[12], 저온성[13], 내염성[14], 호산성[15], 호알칼리성[16] 등 효소적 특징이 구분되는 효소들이 다수 있지만, 산업화에 적용된 효소의 예는 아직까지 보고된 바 없다. 따라서, 한천의 산업적 이용을 위해서는 더욱 다양한 효소의 발굴이 요구되고 있다. 본 연구진은 제주도 해수에서 분리한 *Cellulophga* sp. J9-3 균주의 생리학적 특징과 본 균이 생산하는 cellulase의 효소적 특성에 관하여 보고한 바 있다[17]. 이후의 계속된 연구를 통해, *Cellulophga* sp. J9-3 균주가 생산하는 agarase의 특성에 관하여 본 논문에 정리하였다. 홍조류 세포벽에는 셀룰로오스가 약 20% 함유되어 있다는 점에서, cellulase와 agarase를 모두 생산할 수 있는 *Cellulophga* sp. J9-3 균주는 홍조류 바이오메스 분해 및 이용에 아주 적합한 균주일 것으로 예상된다.

## 재료 및 방법

### 미생물 배지 및 배양

*Cellulophga* sp. J9-3 (KACC 92201P)은 제주도 해수에서 분리하여 동정하였고, 균주의 분류학적 특성과 cellulase 생산능력에 관하여는 이미 보고한 바 있다[17]. *Cellulophga* sp. J9-3 균주의 agarase 생산능력을 조사하기 위해, 균주를 Marine agar 2216 (MA) (Difco, USA) 배지에 접종하여 28°C에서 48시간동안 배양한 후, Lugol's Iodine 용액(0.05 M Iodine in 0.12 M KI)으로 염색하여 콜로니 주위에 형성된 분해환을 관찰하였다. 균주의 계대 및 배양에는 MA와 Marine broth 2216 (MB) (Difco) 배지를 사용하였다.

### *Cellulophga* sp. J9-3 균주의 성장곡선 및 효소 생산 분석

*Cellulophga* sp. J9-3 균주를 50 ml MB 배지(250-ml flask)에 접종하여 28°C에서 24시간 진탕 배양(200 rpm) 하였다. 배양액 1 ml를 새로운 MB 배지 100 ml에 접종하고, 동일 조건에서 104시간동안 배양하면서 일정한 시간 간격으로 배양액을 3 ml씩 샘플링 하였다. 배양액 샘플은 분광광도계로 600 nm에서의 탁도(OD<sub>600</sub>)를 측정하여 성장곡선을 완성하였다. 또한, 배양액을 10,000 ×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여, DNS 법[18]으로 세포외부로 분리된 agarase의 활성을 측정하였다.

### Agarase 효소의 정제

*Cellulophga* sp. J9-3를 0.2% agar가 포함된 MB 배지 1 L에 접종하여 상기와 동일조건에서 48시간 배양하였다. 배양액을 10,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상등액에 ammonium sulfate (75%)를 첨가하였다. 12시간 동안 냉장고에서 단백질을 침전시킨 후, 배양액을 10,000 ×g에서 60분간 원심분리하여 침전물만을 취하여 완충액 A (50 mM Tris-Cl, pH 7.5) 50 ml에 현탁 하였다. 단백질 현탁액을 동일한 완충액으로 12시간 동안 4°C에서 투석하여 탈염 한 후, 10,000 ×g에서 30분간 원심분리하고, 상등액을 0.22 μm syringe filter (Millipore, USA)로 여과하여 단백질 농축액 (75 ml)을 준비하였다.

단백질 농축액으로부터 agarase를 정제하기 위해 DEAE-sepharose FF음이온 교환 크로마토그래피(GE Healthcare, USA)를 수행하였다. 컬럼(15 mm × 140 mm, Econo-Pac, BioRad, USA)에 레진을 2 ml 채우고, 완충액 A로 평형화 시킨 레진에 단백질을 흡착시킨 후, 동일 완충액에 100, 200, 300, 400, 500 mM NaCl을 함유한 용액(각 용액의 volume = 20 ml)으로 단계적으로 단백질을 용출시켰다(유속 = 1 ml/min). DNS 법으로 용출액의 agarase 활성을 측정한 결과, 활성은 레진에 결합하지 않고 통과한 샘플에서 검출되었으며, 따라서 통과 샘플로부터 agarase의 2차 정제를 수행하였다. 2차 정제를 위해 Sulfopropyl (SP)-sepharose cation exchange chromatography (컬럼 volume = 2 ml, GE Healthcare)를 수행하였고, 이동상은 완충액 A를 사용하였다. 흡착한 단백질의 용출에는 100–500 mM NaCl (100 mM 간격)을 함유한 완충액 A를 단계적으로 사용하였다(각 용액의 volume = 20 ml, 유속 = 1 ml/min). DNS 법으로 agarase 활성을 측정한 결과, 100 mM NaCl 용출분획에서 활성이 검출되었다. 활성 분획을 amicon ultracentrifugal filter (Millipore; 10 kDa cut off)로 농축 후, Superdex 75 gel permeation chromatography (GE Healthcare)로 agarase의 3차 정제를 수행하였다. 이동상은 100 mM NaCl이 첨가된 완충액 A를 (유속 = 0.5 ml/min)를 사용하였고, 총 24 fraction (1 ml/fraction)을 분획하였다. 각 분획에 대해 DNS 법으로 agarase 활성을 측정하였고, 활성이 확인된 분획은 0.1% sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통하여 순도를 확인하였다[19]. 정제된 단백질은 PVDF막(Millipore)에 전기적으로 transfer 하였다. Transfer 완충액 조성(1,000 ml)은 glycine 14.4 g, Tris base 3.03 g, MeOH 200 ml이며, transfer는 48 mA에서 4시간 수행하였다. 막에 transfer된 단백질은 Edman degradation 법에 의한 N-말단 아미노산 서열을 분석(사용기기: ABI492 precise protein sequencer, USA)에

**Table 1. Summary of purification for agarase AgaJ93.**

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold
Culture supernatant	880.0	3431.1	203083.1	59.2	1.0
Ammonium sulfate precipitation	75.0	279.7	46562.6	166.5	2.8
DEAE-sepharose FF chromatography	7.5	31.4	5457.1	173.7	2.9
SP-sepharose chromatography	7.5	23.4	5562.7	237.8	4.0
Superdex 75 chromatography	2.0	5.5	1567.9	283.1	4.8

사용하였다. 아미노산 서열분석은 서울대학교 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원(NICEM)에 의뢰하여 진행하였다.

### Agarase의 생화학적 특성 분석

Gel permeation chromatography에서 얻은 agarase 활성을 보이는 9–11번 분획은 SDS-PAGE에서 단일 단백질 밴드를 보였다. 따라서, 활성 분획을 amicon ultracentrifugal filter (10 kDa cut off)를 이용하여 완충액 A로 치환하여 효소의 특성 분석에 사용하였다. 사용한 효소액의 단백질 농도는 2.75 mg/ml은 agarase의 specific activity는 283.1/mg이다(Table 1).

효소의 기질 특이성을 확인하기 위해서 0.3%의 agarose, starch (Sigma-Aldrich, USA), carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich), birchwood xylan (Megazyme, USA), beechwood xylan (Megazyme)을 기질로 첨가하여, DNS 법으로 각 기질에 대한 효소의 가수분해 활성을 측정하였다. 효소반응은 표준조건(완충액 A, 37°C, 30분)에서 수행하였다. 그 결과, 아가로스가 최적의 기질로 판단되어, 이 후의 실험은 0.3% 아가로스 기질에 대해서만 진행하였다.

효소반응 최적 온도 조건 결정을 위해, 효소반응(완충액 A, 30분)을 30–70°C 구간에서 5°C 간격으로 구분하여 진행하였다. 효소의 온도안정성 결정은 효소액을 30–70°C (5°C 간격)에서 60분 동안 방치 후, 표준조건에서 효소활성을 측정하였다. 효소의 최적 pH는 효소반응액을 pH 6.0–10.0 (pH 0.5 간격) 범위에서 준비하고, 37°C에서 30분간 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 사용된 완충액은 50 mM MOPS (pH 6.0–7.0), 50 mM Tris-Cl (pH 7.0–9.0), 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0–10.0)이다. 효소의 상대활성은 최대값을 나타내는 시료의 활성을 100%로 정하고, 이에 대한 상대값으로 환산하여 계산하였다.

효소반응에 영향을 미치는 금속이온 및 계면활성제의 효과를 알아보기 위해서 최종농도 1 mM의  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 와 1%의 SDS를 각각 효소반응액에 첨가하여, 표준조건에서 효소활성을 측정하였다. 효소의 상대활성은 무첨가 대조군의 활성을 100%로 하고,

이에 대한 상대값으로 환산하여 계산하였다.

### 효소반응물의 분석

정제된 단백질에 의한 agarose의 가수분해산물을 분석하기 위해서, 완충액 A에 녹인 0.3% 아가로스(volume = 130  $\mu\text{l}$ )에 효소액 20  $\mu\text{l}$ 를 섞은 후, 37°C에서 24시간 반응을 유도하였다. 반응물 5  $\mu\text{l}$ 를 Silica gel 60 plate (Merck, USA)에 스폿팅하고 이동상 용매(n-부탄올:아세트산:증류수 = 2:1:2)로 thin-layer chromatography (TLC)를 실시하였다. 비교를 위한 표준품은 5 mM neoagaoibiose, neoagarotetraose, neoagarohexaose (DyneBio, Korea)를 사용하였다. 전개 후, 발색시약(에탄올:황산 = 9:1)을 골고루 스프레이하고, 120°C에서 가열하여 반응 산물의 발색을 확인하였다[20].

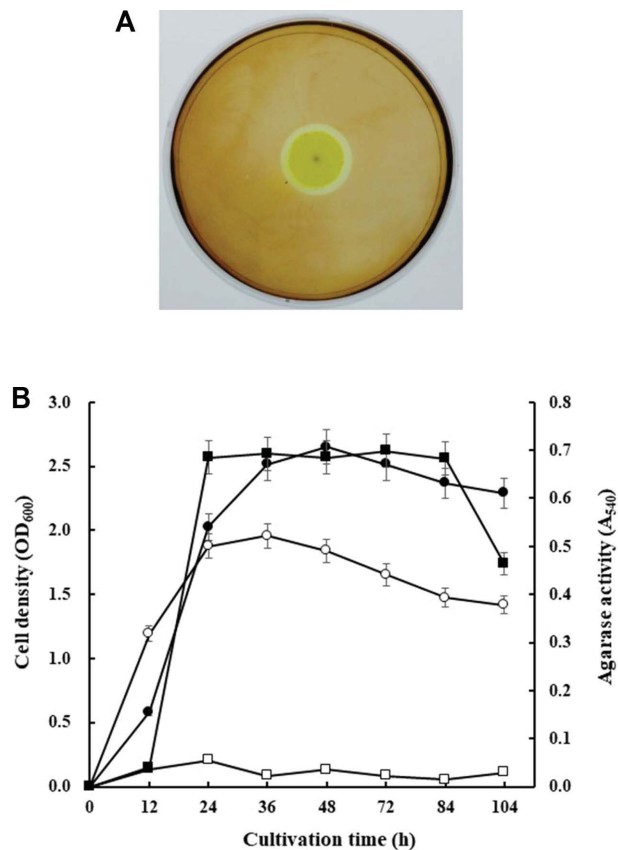
TLC 분석결과, 2개의 최종 분해산물이 검출되었으며, 이들을 각각 TLC 판에서 긁어내어 100% methanol로 추출한 후, 서울대학교 NICEM에서 Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer (Autoflex III; Bruker, USA)로 분석을 수행하여 분자량을 확인하였다.

### 결과 및 고찰

#### *Cellulophaga* sp. J9의 한천 분해 활성

본 연구진은 *Cellulophaga* sp. J9-3가 cellulose를 분해하여 cellobiose를 생산하는 cellulase 생산능력을 갖는 미생물로 발표한 바 있다[17]. 그러나, 다양한 다당체에 대한 미생물의 분해 능력 시험 결과, J9-3 균주가 강한 agarase 활성도 갖는 사실을 확인하였다(Fig. 1A). 균주 J9-3은 agar가 함유된 고체배지에서 Lugol 염색시에 콜로니 주변에 강한 agar 분해 활성을 보였으며, 이로부터 J9-3 균주가 agarase를 세포외로 분비할 것으로 예상하였다.

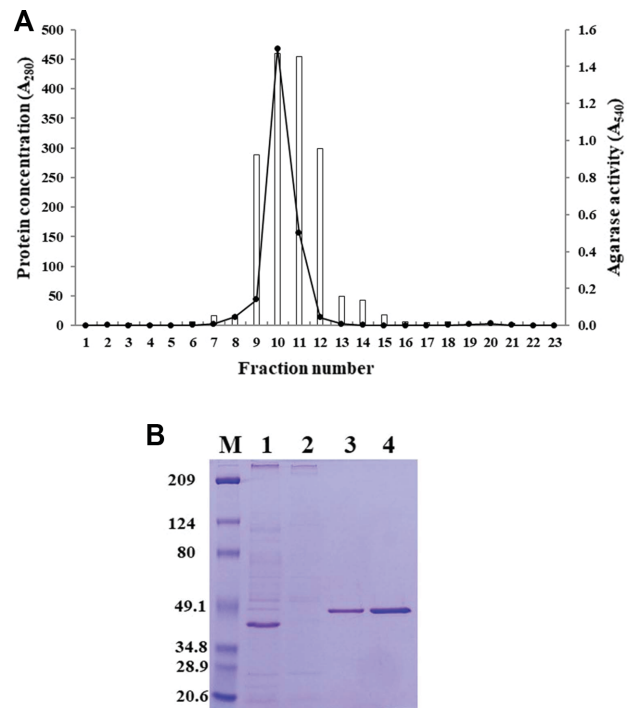
실제, MB 액체배지에 J9-3 균주를 배양했을 때, 균체를 제거한 배양액에서 강한 agarase 활성이 관찰되었으며, 이는 *Cellulophaga* sp. J9-3이 세포외부로 agar 분해효소를 분비한다는 사실을 뒷받침한다(Fig. 1B). *Cellulophaga* sp. J9-3의 MB 배지에서의 성장은 접종 24시간 후 stationary phase



**Fig. 1. Production of extracellular agarase by *Cellulophaga* sp. J9-3.** (A) Detection of agarase activity on Marine Agar plate. The plate was stained with Lugol's Iodine solution. (B) Cell growth and agarase production depending on cultivation time in Marine broth (MB). Cell density (OD<sub>600</sub>) in MB (○) and MB + 0.2% agarose (●), agarase activity (A<sub>540</sub>) in MB (□) and MB + 0.2% agarose (■).

(OD<sub>600</sub> = 1.876)에 진입하여 36시간에 최대 성장(OD<sub>600</sub> = 1.956)을 보였고, 이후 배양 후기까지 천천히 감소하였다. 반면에 0.2% 아가로스 첨가한 MB 배지에서는, 접종 후 36시간 후에 stationary phase (OD<sub>600</sub> = 2.516)에 진입하여 48시간에 최대 성장(OD<sub>600</sub> = 2.652)을 보였고, 배양 후기까지 천천히 감소하였다. 즉, *Cellulophaga* sp. J9-3은 아가로스의 첨가에 의해서 균의 성장이 약 1.3배 증가되었으며, 최대성장 시간도 12시간 늦어지는 현상을 보였다(Fig. 1B).

특히, *Cellulophaga* sp. J9-3은 MB 배지에서는 agarase 활성이 거의 나타나지 않는 반면 (최대활성 A<sub>540</sub> = 0.055), 0.2% 아가로스를 첨가된 배지의 배양액에서의 효소활성은, 24시간부터 급격히 증가하여 84시간까지 (A<sub>540</sub> = 0.685–0.699) 유지한 후, 서서히 감소하였다. 이는 *Cellulophaga* sp. J9-3의 agarase 효소 생산이 다른 한천분해 미생물에서 보고된 것



**Fig. 2. Purification of an extracellular agarase AgaJ93 from the culture broth of *Cellulophaga* sp. J9-3.** (A) Gel permeation chromatogram in the final step of agarase purification process. The protein concentration was measured at 280 nm (line) and agarase activity of each fraction was determined by DNS method at 540 nm (bar). (B) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of protein samples during purification. Lane M, protein molecular weight markers; 1, 75% ammonium sulfate precipitate; 2, Sample passing through DEAE-Sepharose Fast Flow column chromatography; 3, Sample after SP-Sepharose column chromatography; 4, Dialyzed sample after Superdex 75 column chromatography.

처럼 아가로스 기질의 첨가로 유도될 수 있음을 시사하며, 결과적으로 약 12.7배의 현저한 효소 생산 증가를 보였다 (Fig. 1B).

### *Cellulophaga* sp. J9 배양액으로부터 agarase AgaJ93의 정제

*Cellulophaga* sp. J9-3의 액체배양액으로부터 agarase를 정제하기 위해, 세포를 제거하고 얻은 배양액만을 ammonium sulfate로 침전시켜 단백질을 농축하였다. 이로부터 음이온 교환수지인 DEAE-sepharose FF를 이용하여 1차 정제를 시도한 결과, agarase 활성은 resin에 결합하지 않고 통과한 분획에서만 관찰되었다. 통과한 분획을 7.5 ml로 농축하여 양이온 교환수지인 SP-sepharose 컬럼을 이용하여 2차 정제를 시도한 결과, 100 mM NaCl 분획물에서 높은 효소활성

이 관찰되었다. 이 분획물을 1 ml로 농축하여 Superdex-75 gel permeation chromatography를 실시한 결과, 9–12번 분획에서 높은 효소활성이 관찰되었다(Fig. 2A). 이들 분획물을 SDS-PAGE로 분석하여 단일 단백질 밴드를 보인 분획만을 선택하였고, 해당 단백질을 AgaJ93으로 명명하여 실험에 사용하였다(Fig. 2B). AgaJ93의 각 정제 단계별 수율을 Table 1에 정리하였다.

### *Cellulophaga* sp. J9 유래 agarase AgaJ93의 정보학

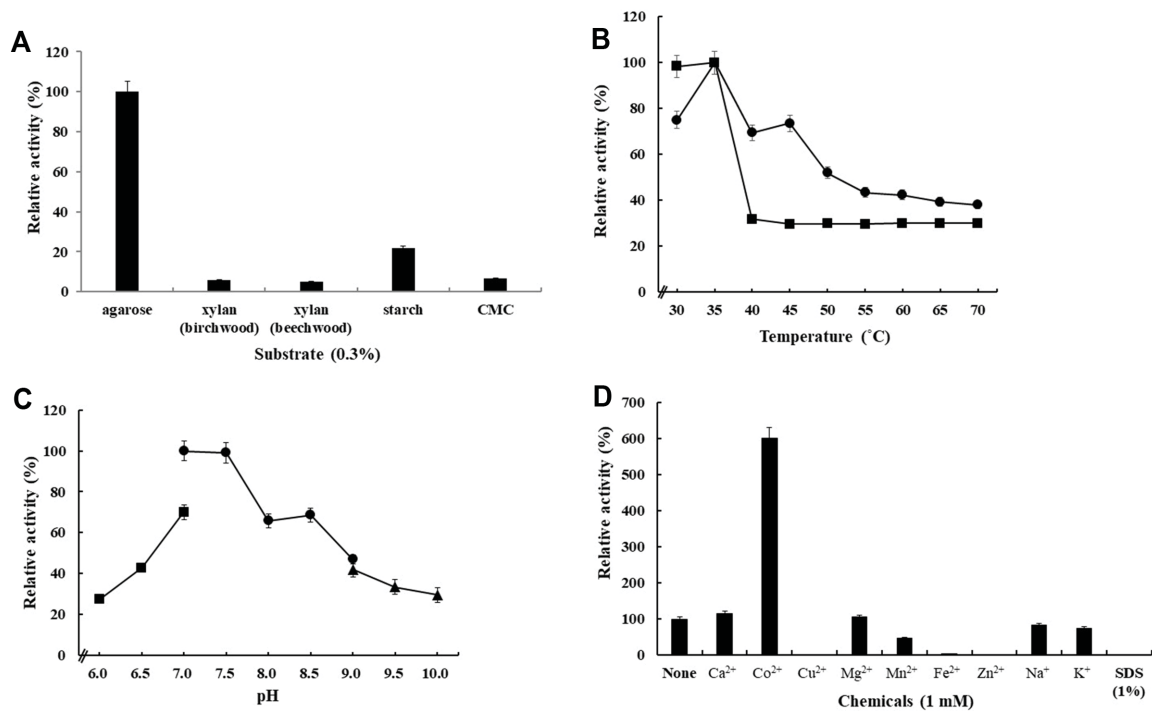
순수 정제한 AgaJ93 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 해독한 결과, S-P-N-N-W-P-T-P-G-G-T-V로 결정되었다. N-말단 아미노산 서열을 토대로 BlastP program [21]으로 상동성이 있는 단백질을 검색한 결과, 다양한 기능의 단백질들과 상동성을 보였다. 이 중에서 가수분해 관련 단백질은 *Cellulophaga* sp. W5C의  $\beta$ -agarase (82% identity with T-P-N-N-W-P-G-P-G-P-T-V), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*의 polyvinylalcohol dehydrogenase (90% identity with S-P-N-N-W-P-T-A-G-G), *Candidatus roseilinea* sp. NK\_OTU-006의 glycoside hydrolase family 31 protein

(75% identity with D-P-N-N-W-P-D-P-A-G-M-V) 등이 있다. 이중, 균주 J9-3과 같은 속의 *Cellulophaga* sp. W5C의  $\beta$ -agarase (ATI14839)는 480개의 아미노산으로 구성되어 있는 glycoside hydrolase 16 family에 속하는 agarase이다 [22]. 하지만 이들 단백질에서 발견된 상동서열은, N-말단 아미노산이 아닌 단백질 내부 아미노산 서열에 해당하였으며, 따라서 AgaJ93 단백질은 검색된 단백질과는 다른 아미노산 서열을 갖을 것으로 판단하였다.

### Agarase AgaJ93 효소의 생화학적 특성

기질 특이성, 최적온도, 온도안정성, 최적 pH, 금속 ion 및 detergent 효과 등 효소의 특성 분석 실험을 위해 정제된 AgaJ93를 50 mM Tris-Cl buffer (pH 7.5)로 50배 희석하여 사용하였다.

Agarose, birchwood xylan, beechwood xylan, starch, CMC 등의 기질에 대한 AgaJ93의 가수분해 반응을 측정된 결과, AgaJ93은 아가로스에 특이적으로 강한 활성을 보였지만, starch에 대해서도 아가로스 대비 약 22% 정도의 활성을 보였다(Fig. 3A). 그 외 기질에 대해서는 활성을 보이지

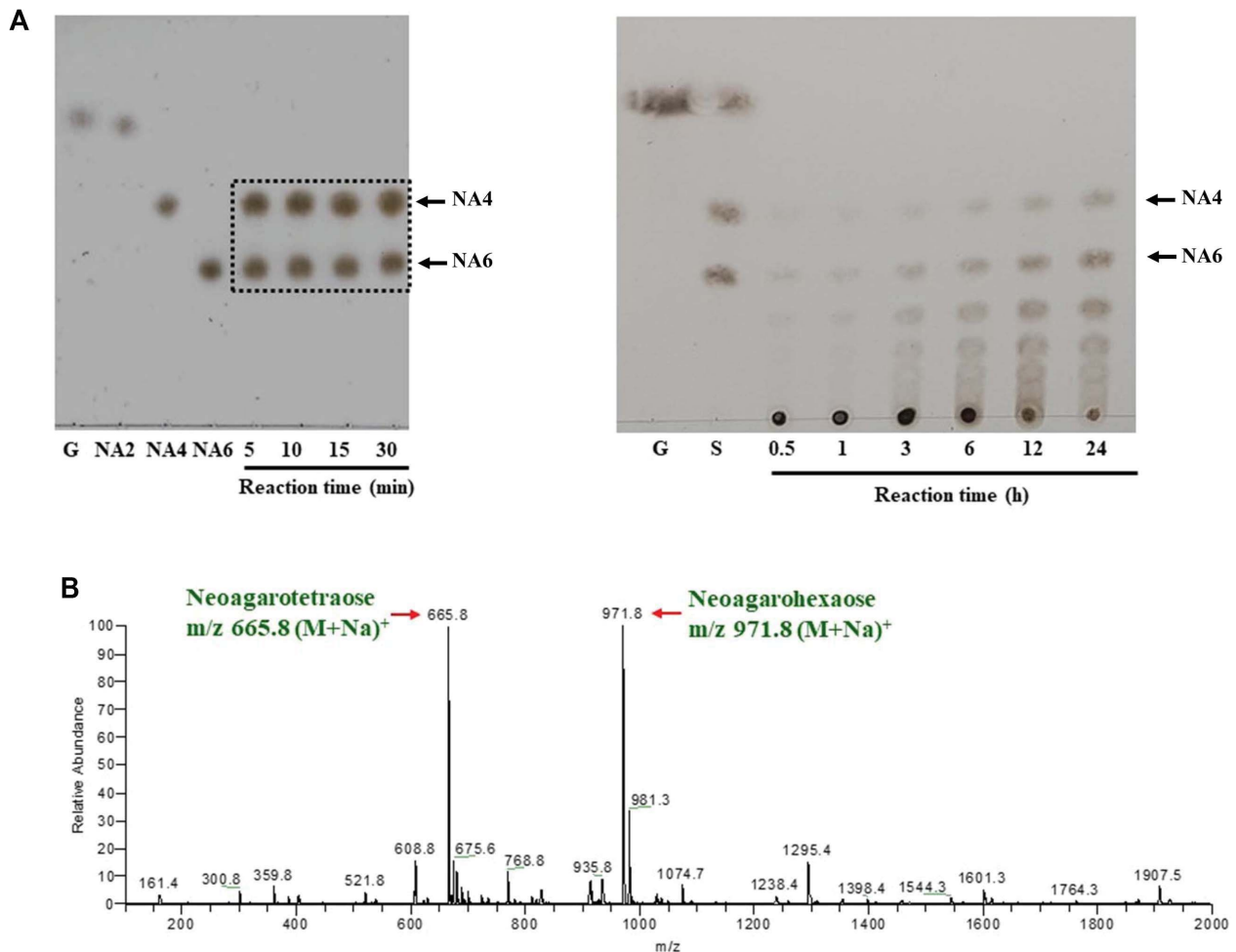


**Fig. 3. Biochemical characterization of the purified extracellular agarase, AgaJ93.** (A) Substrate specificity of AgaJ93 toward various polysaccharides. (B) Effect of temperature on AgaJ93 agarase activity toward agarose. ●, optimum temperature; ■, thermostability. (C) Effect of pH on AgaJ93 agarase activity toward agarose. ■, 50 mM MOPS (pH 6.0–7.0); ●, 50 mM Tris-Cl (pH 7.0–9.0); ▲, 50 mM glycine-NaOH (pH 9.0–10.0). (D) Effect of metal ions and SDS on AgaJ93 agarase activity toward agarose. The final concentration of each chemical used is indicated under the figure. The maximum enzyme activity in (A)–(C) and the enzyme activity without chemicals in (D) was set to 100% when calculating relative activities. All data shown are mean values from at least three replicate experiments.

않았다. AgaJ93는 35°C에서 가장 높은 agarase 효소활성을 보였다. 30°C, 40°C, 45°C에서는 각각 최대활성 대비 약 75%, 69%, 74%의 비교적 높은 활성을 보인 반면, 50°C 이상의 온도에서는 52% 이하의 낮은 활성을 보였다(Fig. 3B). AgaJ93의 온도안정성 비교 결과, 35°C까지는 안정하게 활성을 유지하지만, 40°C 이상에서는 대부분의 활성을 잃고 약 27% 정도의 활성만이 유지되었다(Fig. 3B). 특히, 50°C에서는 5분 경과 후 효소활성을 거의 상실하였다(data not shown). AgaJ93 효소는 pH 7.0~7.5 부근에서 최대활성을 보였고, 중성 pH 이외의 구간에서는 활성이 감소하여 pH 6.0과 10.0

에서는 최대활성 대비 27% 정도의 활성만을 나타냈다(Fig. 3C). 이러한 결과로부터, AgaJ93는 중성 pH 조건에서 활성을 갖는 중온성 효소로 판단된다.

AgaJ93 효소반응에 영향을 미치는 금속이온 및 계면활성제의 효과를 조사한 결과, 효소활성은  $\text{Co}^{2+}$ 를 첨가한 반응에서 미처리구 대비 6배 높은 활성 증가를 보였다. 반면,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ 과 SDS를 첨가한 반응에서는 효소활성이 완전히 감소하였다.  $\text{Mn}^{2+}$ 을 첨가한 반응에서는 효소활성이 45%의 감소하였고,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ 은 미미한 증가 효과를,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 은 약간의 감소 효과를 나타냈다(Fig. 3D).



**Fig. 4. Analysis of the agarose hydrolysates by agarase AgaJ93.** (A) Thin layer Chromatogram of the agarose hydrolysate by agarase AgaJ93 depending on reaction time. The purified AgaJ93 was used 55 µg (left panel) or 1.1 µg (right panel) in 150 µl of total reaction volume. When a low concentration of enzyme is used (right panel), oligosaccharides larger than neogarotetraose or neogaroheptaose appear as intermediates at the beginning of the reaction. However, if the reaction time is prolonged or if a high concentration of enzyme is used as shown in the left panel, neogarotetraose and neogaroheptaose are produced as final products. G, D-glucose; NA2, neogarobiose; NA4, neogarotetraose; NA6, neogaroheptaose; S, NA2 + NA4 + NA6. (B) MALDI-TOF mass spectrum of the agarose hydrolysate by agarase AgaJ93. The peaks for molecular ions at  $m/z$  of 665.8 ( $M + \text{Na}$ )<sup>+</sup> and 971.8 ( $M + \text{Na}$ )<sup>+</sup> corresponding to neogarotetraose and neogaroheptaose, respectively, are indicated by arrows.

### AgaJ93 효소에 의한 아가로스 분해산물 분석

AgaJ93 효소와 아가로스를 기질로 하는 효소반응물을 TLC로 분석한 결과, AgaJ93은 아가로스를 분해하여 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 최종산물로 생산하는 것으로 예상되었다(Fig. 4A, left panel). 또한, 50배로 희석한 AgaJ93 효소액을 사용하여 시간에 따른 아가로스의 효소반응 산물을 TLC로 분석하였을 때, neoagarooctaose나 neoagarodecaose와 같이 더 큰 크기의 올리고당이 반응 초기에 생산되고, 반응시간에 따라 neoagarotetraose와 neoagarohexaose로 가수분해가 진행됨을 확인하였다(Fig. 4A, right panel). 이와 같은 결과는 AgaJ93 효소가 endo-type의 베타-아가레이즈임을 의미한다.

효소반응물을 MALDI-TOF mass spectrometer로 분석한 결과, 두개의 주요한 피크가  $m/z$  665.8 과  $m/z$  971.8에서 검출되었으며, 이는 각각 neoagarotetraose와 neoagarohexaose의 sodium-adducted form ( $M+Na$ )<sup>+</sup>의 분자량에 정확히 일치한다(Fig. 4B). 이러한 결과를 종합하면, AgaJ93 효소는 아가로스의  $\beta$ -1,4 glycosidic 결합을 분해하여 대략 50대 50의 비율로 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 생산하는 endo-type  $\beta$ -agarase인 것으로 판단된다.

특이하게도, AgaJ93은 아가로스 활성시험에 사용하는 인공기질인 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -d-galactopyranoside와 *p*-nitrophenyl- $\beta$ -d-galactopyranoside 기질 모두에 활성을 전혀 보이지 않았다(data not shown). 이와 같은 경우는 아주 드문 예로 해양미생물 *Gayadomonas joobiniege* G7가 생산하는 agarase에서 보고된 바 있다[23]. 따라서, AgaJ93은 아주 특이한 효소학적 성격을 갖을 것으로 예상된다.

지금까지, *Cellulophaga* 속으로부터 3 개의 agarase가 동정되었다[14, 22, 24]. AgaJ93의 N-terminal sequence를 이용한 homology 비교 결과, AgaJ93은 *Cellulophaga* sp. W5C의 내열성 endo-type  $\beta$ -agarase Aga2와 82%의 상동성을 보였다[22]. Aga2는 AgaJ93과 같이 아가로스를 분해하여 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 생산하는 endo-type  $\beta$ -agarase이지만, 효소 활성 최적조건이 45°C, pH 8.0이며, 45°C 이상에서도 열안정성을 보이는 내열성 효소라는 점에서 크게 다르다. 이외에, N-말단 아미노산 서열이 AgaJ93과 일치하는 아가레이즈는 보고된 적이 없으며, 어느 정도 상동성이 있는 것으로 열거한 단백질의 경우도 해당 서열이 N-말단이 아닌 내부에 위치하는 아미노산 서열로 분석되었다. 따라서, AgaJ93은 *Cellulophaga* 속이나 기타 한천 분해미생물에서 보고된  $\beta$ -agarase들과는 다른 아미노산 서열과 효소적 특성을 갖는 신규의 agarase일 것으로 예상되며, 유전체 분석을 통해 유전자를 확보하여 효소 특성에 관한 구체적인 연구가 이루어지길 기대한다.

### 요 약

*Cellulophaga* sp. J9-3은 셀룰로스 분해능력을 갖으며, *Flavobacteriaceae* 과에 속하는 그람-음성 호기성 해양 세균이다. 또한, J9-3 균주는 고체 및 액체 배지에서 한천을 가수 분해 할 수 있으며, 배지에 첨가한 아가로스(agarose)에 의해 아가레이즈(agarase)의 생산이 현저하게 유도되는 특성을 보였다. *Cellulophaga* sp. J9-3의 세포 배양액으로부터, 황산암모늄 침전 및 3 단계의 컬럼 크로마토그래피를 연속적으로 수행하여, 한 개의 agarase 단백질, AgaJ93을 순수하게 정제하였다. 정제된 AgaJ93은 아가로스에 대한 분해 활성이 가장 강하였으며, starch에 대해서도 아가로스 대비 약 22% 정도의 분해 활성을 나타냈다. AgaJ93은 아가로스를 분해하여 사이즈가 큰 올리고당 중간체를 경유하여, 최종산물로 네오아가로테트라오스와 네오아가로헥사오스까지 분해함을 확인하였으며, 이는 AgaJ93이 endo-type  $\beta$ -아가레이즈임을 의미한다. AgaJ93은 pH 7.0, 35°C에서 최대 활성을 나타냈고,  $Co^{2+}$  이온에 의해 6배 이상의 활성증가를 보였다. AgaJ93의 N-terminal sequence 분석 결과, AgaJ93은 *Cellulophaga* sp. W5C의 내열성 endo-type  $\beta$ -아가레이즈 Aga2와 82%의 상동성을 보였으나, 두 효소의 생화학적 특성이 달랐다. 따라서, AgaJ93은 기존에 보고된  $\beta$ -아가레이즈들과는 다른 신규의 아가레이즈일 것으로 예상된다.

### Acknowledgments

This research was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR202102109).

### Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

### References

1. Knutsen SH, Myslabodski DE, Larsen B, Usov AI. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina* **37**: 163-170.
2. Chi WJ, Chang YK, Hong SK. 2012. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**: 917-930.
3. Duckworth M, Yaphe W. 1971. Structure of agar: Part I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**: 189-197.
4. Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. 2010. Transfer of carbohydrate-active enzymes from

- marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature* **464**: 908-912.
5. Park SH, Lee CR, Hong SK. 2020. Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**: 2815-2832.
  6. Wang W, Liu P, Hao C, Wu L, Wan W, Mao X. 2017. Neoagarooligosaccharide monomers inhibit inflammation in LPS-stimulated macrophages through suppression of MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. *Sci. Rep.* **7**: 44252.
  7. Kang DR, Yoon GY, Cho J, Lee SJ, Lee SJ, Park HJ, *et al.* 2017. Neoagarooligosaccharides prevent septic shock by modulating A20- and cyclooxygenase-2-mediated interleukin-10 secretion in a septic-shock mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **486**: 998-1004.
  8. Hong SJ, Lee JH, Kim EJ, Yang HJ, Park JS, Hong SK. 2017. Anti-obesity and anti-diabetic effect of neoagarooligosaccharides on high-fat diet-induced obesity in mice. *Mar. Drugs* **15**: 90-102.
  9. Lee MH, Jang JH, Yoon GY, Lee SJ, Lee MG, Kang TH, *et al.* 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.
  10. Yun EJ, Lee S, Kim JH, Kim BB, Kim HT, Lee SH, *et al.* 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.
  11. Yun EJ, Yu S, Kim KH. 2017. Current knowledge on agarolytic enzymes and the industrial potential of agar-derived sugars. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**: 5581-5589.
  12. Minegishi H, Shimane Y, Echigo A, Ohta Y, Hatada Y, Kamekura M, *et al.* 2013. Thermophilic and halophilic  $\beta$ -agarase from a halophilic archaeon *Halococcus* sp. 197A. *Extremophiles* **17**: 931-939.
  13. Lee YR, Jung S, Chi WJ, Bae CH, Jeong BC, Hong SK, *et al.* 2018. Biochemical characterization of a novel GH86  $\beta$ -agarase producing neoagarohexaose from *Gayadomonas joobiniege* G7. *J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 284-292.
  14. Han Z, Zhang Y, Yang J. 2019. Biochemical characterization of a new  $\beta$ -agarase from *Cellulophaga algicola*. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 2143-2157.
  15. Jung S, Jeong BC, Hong SK, Lee CR. 2017. Cloning, expression, and biochemical characterization of a novel acidic GH16  $\beta$ -agarase, AgaJ11, from *Gayadomonas joobiniege* G7. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **181**: 961-971.
  16. Chen X, Lin H, Jin M, Zeng R, Lin M. 2019. Characterization of a novel alkaline  $\beta$ -agarase and its hydrolysates of agar. *Food Chem.* **295**: 311-319.
  17. Kim DS, Chi W-J, Hong S-K. 2019. Molecular characterization of an endo- $\beta$ -1,4-glucanase, CelA<sub>J93</sub>, from the recently isolated marine bacterium, *Cellulophaga* sp. J9-3. *Appl. Sci.* **9**: 4061-4073.
  18. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
  19. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
  20. Temuujin U, Chi WJ, Lee SY, Chang YK, Hong SK. 2011. Overexpression and biochemical characterization of DagA from *Streptomyces coelicolor* A3(2): an endo-type  $\beta$ -agarase producing neoagarotetraose and neoagarohexaose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**: 749-759.
  21. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang A, Miller W, *et al.* 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
  22. Ramos KRM, Valdehuesa KNG, Nisola GM, Lee WK, Chung WJ. 2018. Identification and characterization of a thermostable endolytic  $\beta$ -agarase Aga2 from a newly isolated marine agarolytic bacteria *Cellulophaga omnivescoria* W5C. *N. Biotechnol.* **40**: 261-267.
  23. Jung S, Lee CR, Chi WJ, Bae CH, Hong SK. 2017. Biochemical characterization of a novel cold-adapted GH39  $\beta$ -agarase, AgaJ9, from an agar-degrading marine bacterium *Gayadomonas joobiniege* G7. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **101**: 1965-1974.
  24. Ramos KRM, Valdehuesa KNG, Bañares AB, Nisola GM, Lee WK, Chung WJ. 2020. Overexpression and characterization of a novel GH16  $\beta$ -agarase (Aga1) from *Cellulophaga omnivescoria* W5C. *Biotechnol. Lett.* **42**: 2231-2238.