

The Isolation of Agarolytic *Agarivorans* sp. HY-1 and the Characterization of Its Agarase

Dong-Geun Lee¹, Ha-Yeon Cho¹, Andre Kim^{1,2} and Sang-Hyeon Lee^{1*}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 46958, Korea

²Hankook Liposome, Co. LTD, Busan 46958, Korea

Received February 6, 2022 / Revised February 9, 2022 / Accepted February 9, 2022

In this study, the growth characteristics of an agar-degrading bacterium isolated from seawater samples collected from Yeongheungdo, Incheon, and the characteristics of its agarase were analyzed. The 16S rRNA gene sequence of the isolated strain was 95% similar to that of the genus *Agarivorans*, and thus the isolated strain was named *Agarivorans* sp. HY-1. When *Agarivorans* sp. HY-1 was cultured in a marine broth 2216 medium at 27°C and 250 rpm, it showed maximum growth on day 1 and showed maximum enzymatic activity on day 2. A crude enzyme solution was prepared from secreted agarase in the culture medium. The extracellular agarase of the *Agarivorans* sp. HY-1 strain showed maximal activity at 40°C and pH 7.0 (20 mM Tris-HCl) with 591.91 U/l. The agarase exhibited relative activities of 64, 91, 100, 97, 89, and 60% at 20, 30, 40, 50, 60, and 70°C, respectively. At pH 5, 6, 7, and 8, the relative activities were 79, 95, 100, and 55%, respectively. Furthermore, the agarase exhibited >86% residual activity at 20, 30, and 40°C for 2 hr and >44% residual activity at 50°C after 2 hr. A TLC analysis confirmed that *Agarivorans* sp. HY-1 produced α -agarase. As the degradation products of α -agarase have anticancer and antioxidant effects, *Agarivorans* sp. HY-1 and its agarase may well prove useful.

Key words : Agarase, *Agarivorans* sp., agar-degrading bacterium, extracellular agarase

서 론

한천(agar)은 우뚝가사리 등 홍조류의 세포벽에 포함된 다당류 성분으로 중성다당류인 agarose와 산성다당류인 agaropectin 등으로 구성되어 있다[3]. 아가로스(agarose)는 한천의 약 70%를 차지하며 α (1→3) 결합으로 연결되어 있는 β -D-galactose와 β (1→4) 결합으로 연결되어 있는 3,6-anhydro- α -L-galactose가 번갈아 연결되어 있는 중성다당류이다[3].

한천은 젤리나 양갱 또는 다이어트 식품의 원료로 널리 사용되고 있으며 응고력이 세고 세균의 작용으로 잘 분해되지 않기 때문에 정제 후에 분자생물학 실험과 미생물배지의 재료로도 쓰이고 있다[3].

한천 자체나 정제산물 외에 한천분해로 생성되는 한천올리고당은 많은 기능이 보고되어 있어 한천올리고당 생산을 위한 많은 연구가 진행되어 왔다[5, 7, 9]. 한천올리고당을 한천으로부터 분해할 수 있는 방법에는 한천분해효소를 이용하는 효소가수분해법과 산가수분해법이 있다[6]. 산가수분해법은

반응을 하고 난 후에 부산물이 생기고, 중화과정을 거쳐야 하며, 생성된 한천올리고당의 기능이 떨어지는 문제점이 있다 [6]. 이로 인해 다당체의 특정부위에 효소가 특이적으로 작용하면서 선택적으로 한천을 분해하는 효소가수분해법이 더 유용한 것으로 알려져 있다.

한천분해효소로는 α -agarase와 β -agarase 두 종류가 있다 [2]. Agarooligosaccharides는 α -agarase를 이용한 분해산물로 이는 항암 활성화와 항산화 효과를 가지고 있는 것으로 알려졌다[1]. Neoagarooligosaccharides는 β -agarase를 이용한 분해산물로 대식세포 활성화, 전분노화 방지, 세균성장 억제, 미백 효과, 보습효과 등의 많은 유용한 기능을 나타내는 것으로 알려졌다[4].

본 연구진도 α -agarase와 β -agarase와 생산 균주에 대한 보고를 하였고[5, 8] agarase를 생산하는 연구를 지속적으로 수행하였다. 본 연구에서는 α -agarase를 생산하는 새로운 균주와 그 균주가 생산하는 α -agarase의 효소활성에 대해 보고하고자 하였다.

재료 및 방법

한천분해 균주의 분리 및 동정

인천시 영흥도에서 한천분해활성을 가지는 세균의 분리를 위한 시료를 채취하였으며, Marine broth 2216 배지(Difco, USA)에 1.5% (w/v)의 한천을 첨가한 Marine agar배지에 시

*Corresponding author

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

E-mail : slee@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

료액을 도달한 후 27°C에서 배양하면서 한천분해활성으로 Marine agar 배지를 함몰시키는 HY-1 균주를 3차례 이상 순수 분리하여 선별하였다. 순수분리된 균체를 대상으로 Wizard Genomic DNA isolation Kit (Promega, Cat.#: A1120)를 사용하여 genomic DNA를 획득하고, 16S rRNA 유전자 단편을 증폭하기 위한 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. PCR primer로는 1492R (5'-TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3')와 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')를 사용하였으며, 증폭된 DNA 단편은 PCR/Gel Combo Kit (Nucleo Gen, Siheung, Korea)로 정제하였다. DNA 염기서열 분석은 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에서 수행하였다. 분석된 염기서열은 BLAST를 사용하여 보고된 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열과 유사도를 검토하였으며, ClustalX (ver. 2.1) 프로그램으로 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 Neighbor-joining method와 Bootstrap method (n=1,000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

배양시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소활성 측정

초대배양으로 Marine broth 2216 배지 4 ml에 순수분리한 HY-1 균주를 접종한 후 27°C, 250 rpm에서 하루 동안 진탕배양하였다. 이후 Marine broth 2216 배지 50 ml에 0.2% (w/v)의 agar를 첨가한 후 초대배양액을 접종한 후 27°C, 250 rpm에서 진탕배양하면서 24시간마다 일부 배양액을 채취하여 시간에 따른 한천분해 균주의 생육과 효소의 활성을 측정하였다. 균주의 생육은 분광광도계로 600 nm에서 측정하였고 효소활성은 조효소액을 제조하고 효소활성을 측정하였다.

조효소액의 제조

배양액을 원심분리하여(3,000×g, 4°C, 15 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액 15 ml를 Snake Skin Dialysis Tubing (Thermo Scientific, USA)에 넣고 1,000 ml 비커에 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액 900 ml 첨가하고, 4°C의 냉장실에 2시간 정치하는 것을 2번 반복한 후 세번째에는 12시간 이상 투석을 시행하였다. 투석이 완료된 조효소액은 membrane filter (0.45 µm, Milipore, USA)를 통과시킨 후에 4°C에서 냉장 보관하였다.

효소활성 측정

Agarase 활성은 DNS법을 이용하여 측정하였다. DNS법은 3,5-dinitrosalicylic acid method의 변형법으로 환원당을 측정하는 방법이다[1]. DNS solution은 NaOH 13.2 g, 3,6-dinitrosalicylic acid 7.07 g, sodium sulfate 5.53 g, potassium tartrate (Rochelle salt) 204 g, phenol 5.07 g을 증류수 1,000 ml에 녹여서 제조하였다. 최종농도 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 완충용액을 중탕 가열한 후 반응온도까지 냉각하고 반응수조

를 이용하여 온도를 유지하면서 기질용액 1 ml에 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 1 ml의 효소 반응액에 3 ml의 DNS solution을 첨가하여 100°C에서 10분간 가열한 후 550 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준적정곡선으로 D-galactose를 사용하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1 µM의 galactose를 생산하는 한천분해 효소의 양을 1 unit (U)으로 나타내었다.

반응온도에 따른 한천분해 효소의 활성측정

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해효소의 활성을 비교하였다. 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 사용하였다. 기질용액을 중탕 가열한 후 20-70°C의 온도별로 냉각한 후 효소활성을 측정하였다.

pH에 따른 한천분해 효소의 활성측정

pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 20 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.0-5.0), 20 mM Tris-HCl 완충용액(pH 5.0-8.0), 20 mM GTA (3,3-dimethyl-glutamic acid, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) 완충용액(pH 8.0-9.0)을 이용하였다. 각 완충용액에 최종농도 0.2% (w/v)의 agarose를 첨가하고 40°C에서 효소활성을 측정하였다.

한천분해 효소의 열안정성 측정

조효소액을 이용하여 온도별 노출시간에 따른 한천분해효소의 잔존활성을 비교하였다. 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 이용하였다. 조효소액 0.5 ml를 첨가하여 각 온도별로 0.5, 1.0, 1.5, 2.0시간 열처리한 후, 40°C에서 효소활성을 측정하였다. 측정된 효소활성은 열처리하지 않은 효소활성과 비교하였다.

한천가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

조효소액을 이용한 agarose의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 조효소액과 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 40°C에서 0, 0.25, 0.5, 1, 6, 12, 24시간 반응시킨 후, Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 수행하였다. n-Butanol/acetic acid/H₂O (2/1/1 (v/v/v))를 이용하여 전개시켰고, 10% (v/v) H₂SO₄로 가시화시켰다. 표준물질로는 D-galactose (Sigma) 및 neo-agarooligosaccharides [14]를 사용하였다. TLC에서 나타난 가수분해산물의 농도비율을 계산하기 위하여 Image J 1.44a (Wayne Rasband, Bethesda, USA)프로그램을 이용하여 측정하였다.

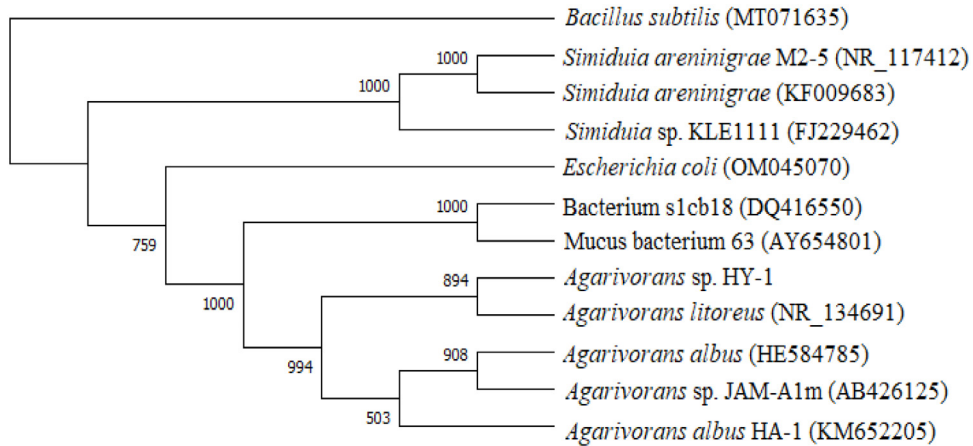


Fig. 1. Phylogenetic position of isolated *Agarivorans* sp. HY-1 based on almost complete 16S rRNA gene sequence. The number of branch nodes is a percentage of the bootstrap value, and the number in parenthesis after the strain name is the NCBI's registration number.

결과 및 고찰

한천분해균주의 분리 및 동정

인천 영흥도의 해수를 채취한 후 Marine agar 배지에 도말하여 한천분해 활성에 의해 배지를 함몰시키는 균주를 선발하였다. 선발된 균주는 백금이를 이용하여 3차례 이상 순수분리하고 추출된 Genomic DNA의 16S rRNA 유전자를 분석하니 *Agarivorans litoreus* 그리고 *Agarivorans albus*와 95%의 가장 높은 유사성을 나타내었다. 이에 분리 균주를 *Agarivorans* sp. HY-1으로 명명하였고 이 균주의 계통분류학적 위치를 Fig. 1에 나타냈다. Agarase를 생산하여 한천을 분해하는 *Agarivorans* 속 세균은 보고가 되어있다[7, 10].

시간에 따른 한천분해 균주의 효소활성과 생장 측정

0.2% (w/v)의 agar를 첨가한 Marine broth 2216 배지 50 ml에 순수분리한 *Agarivorans* sp. HY-1 균주를 접종하여 27°C, 250 rpm에 4일 동안 진탕배양하였다. 배양 시간에 따른 한천분해 균주의 생장과 효소활성을 Fig. 2에 나타냈다. 접종 후 1일까지 균의 수가 크게 증가하였으며, 이후 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 효소활성은 2일째가 가장 높았지만 오차범위 내에서 1일째와 3일째와 차이가 없었고 4일째는 오차범위를 벗어나서 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 최대활성은 591.91 units/l이었다. 이후 연구에서는 1일 동안 진탕배양한 후 생성된 효소액을 이용하였다.

온도에 따른 한천분해효소의 활성

각 온도별 한천분해 효소의 활성은 Fig. 3에 나타냈다. 실험에 사용된 효소의 한천분해활성은 40°C에서 최대 활성을 보였고, 40°C에서의 활성을 100%로 보았을 때, 20°C에서는 약 64%를 나타내었고, 30과 50°C에서는 90% 이상, 60°C에서는 약

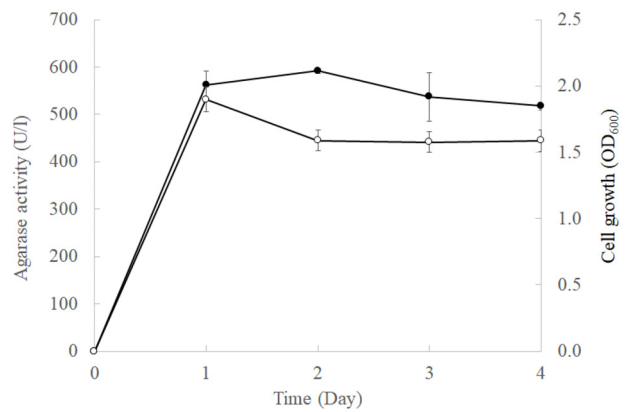


Fig. 2. Cell growths and agarase activities of *Agarivorans* sp. HY-1. (○ cell growth [OD₆₀₀], ● agarase activity [unit/l]).

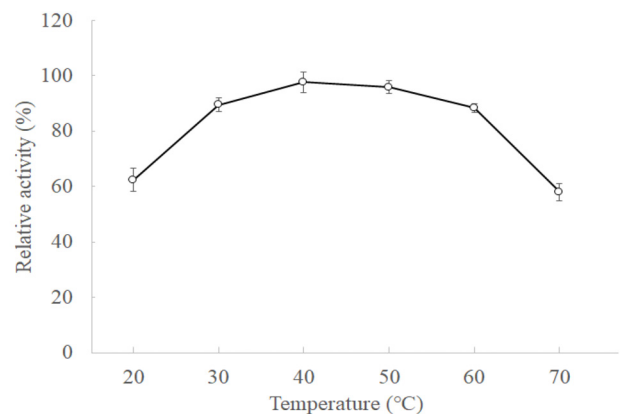


Fig. 3. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reaction was performed at 20, 30, 40, 50, 60, and 70°C for 30 minutes with 1 ml of 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0, 0.2% (w/v) agarose) and 0.5 ml of the raw enzyme solution. Error bars represent the standard deviation of 3 replicates.

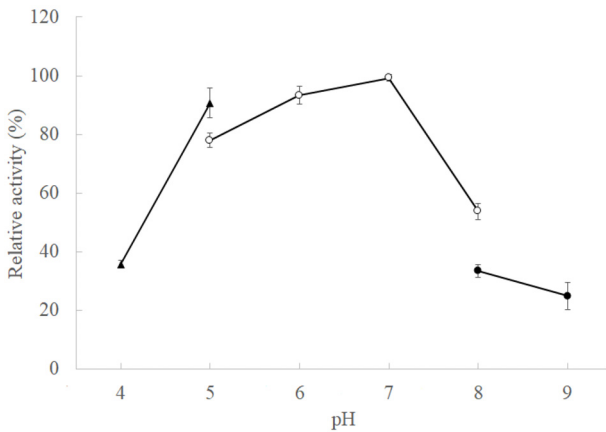


Fig. 4. Effects of pH on the agarase activity. Sodium acetate buffers (20 mM pH 4.0-5.0, ▲), Tris-HCl buffer (20 mM pH 5.0-8.0, ○) and GTA (3,3-dimethyl-glutamic acid, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) buffer (pH 8.0-9.0, ●) were used. Each buffer contained 0.2% (w/v) agarose. The reaction was carried out in 1 ml of buffer and 0.5 ml of raw enzyme solution for 30 minutes at 40°C. Error bars represent the standard deviation of 3 replicates.

89%, 70°C에서는 약 59%를 나타내었다. 다른 균주들의 한천분해효소의 최적 온도는 *Agarivorans gilvus* WH0801 [7], *Simidulia* sp. TM-2 [9], *Agarivorans albus* [10]에서 각각 30, 35, 40°C의 최적의 온도를 나타내었다. 본 연구와 동일한 *Agarivorans* 속 세균들이 생산하는 agarase의 최적온도가 균주마다 달랐다[7, 10].

최적온도에서의 pH별 한천분해효소의 활성

최적온도에서의 pH별 한천분해효소의 활성은 Fig. 4에 나타났다. pH 6-7의 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 높은 활성을 보였으며, 효소활성이 가장 높은 pH 7에서의 활성을 100%로 보았을 때, pH 5와 6에서 90% 이상의 활성을 보였다. pH 5에서는 20 mM sodium acetate 완충용액과 20 mM Tris-HCl 완충용액 중에 20 mM sodium acetate 완충용액에서 더 높은 활성을 나타냈으며, pH 8에서는 20 mM Tris-HCl 완충용액과 20 mM GTA 완충용액 중에 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 더 높은 활성을 나타냈다. 다른 균주들의 한천분해효소 최적 pH는 *Agarivorans gilvus* WH0801 [7]는 pH 6.0을 보였으며, *Simidulia* sp. TM-2 [9]은 pH 8.0을 보였다. *Agarivorans albus* [10]에선 pH 7.0을 보여, 다양한 최적pH를 보이는 것을 알 수 있다. 본 연구와 동일한 *Agarivorans* 속 세균이 생성하는 agarase의 최적 pH가 온도처럼 서로 다른 것을 알 수 있었다[7, 10].

한천분해효소의 열안정성

한천분해효소의 열안정성은 Fig. 5에 나타났다. 40°C에서 열처리없이 반응시킨 것을 100%로 보았을 때, 20, 30, 40°C에서는 해당 온도에 2시간 노출되었을 때 86% 이상의 활성을 보

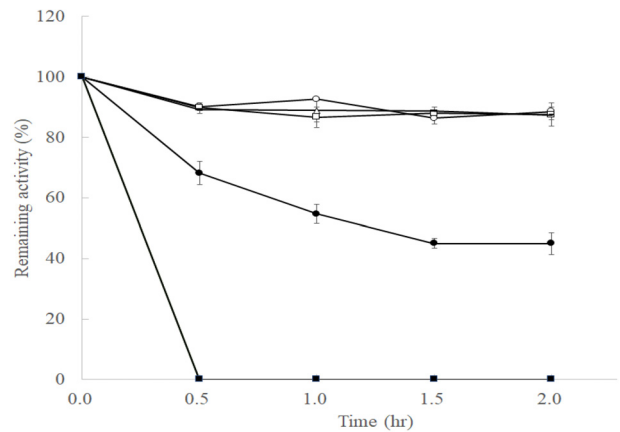


Fig. 5. Remaining activity of agarase after heat treatment. The live enzyme solution was pre-incubated at 20 (○), 30 (□), 40 (△), 50 (●), 60 (■) and 70°C (▲) for 0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 hr. The reaction was carried out at 50°C for 30 minutes in 1 ml of 20 mM Tris-HCl (pH 6.0) buffer containing 0.2% (w/v) agarose and 0.5 ml of heat-treated raw enzyme solution. Error bars represent the standard deviation of 3 replicates.

였다. 50°C에서는 시간에 따라 활성이 계속 떨어지는 것을 볼 수 있었으며, 2시간 노출되었을 때 44%의 잔존활성을 보였다. 60, 70°C에서는 활성이 급격히 떨어져 0.5시간부터 잔존활성을 보이지 않았다. 따라서 *Agarivorans* sp. HY-1가 생산하는 한천분해효소는 내열성을 가지고 있지 않다는 것을 확인할 수 있다.

한천가수분해산물의 TLC분석

Agarivorans sp. HY-1 균주를 2일 동안 배양하여 제조된 조효소액에 0.2% (w/v)의 agarose가 첨가된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 첨가하여 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 현재 한천분해효소에는 α-

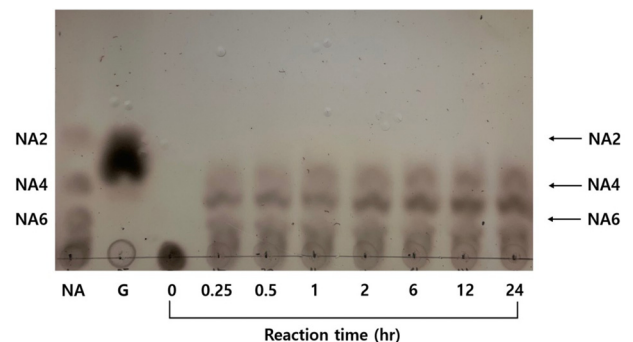


Fig. 6. TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reactions were carried out at 40°C in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer containing 0.2% agar and 0.5 ml of enzyme solution for 0, 0.25, 0.5, 1, 6, 12 and 24 hr. The reaction mixtures were developed by TLC. (NA, neoagarooligosaccharides;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

agarase와 β -agarase 두 가지가 존재한다고 알려져 있기 때문에 β -agarase의 산물인 neoagarooligosaccharides를 이용하여 한천분해효소의 산물을 추정된 후에 이 한천분해효소가 α -agarase와 β -agarase 중 어디에 속하는지 파악하였다. Fig. 6에서 NA4와 NA6 사이는 agarotriose로, NA6 아래는 agaropentaose로 판단되었다[11]. *Agarivorans* sp. HY-1 균주가 생산한 한천분해효소의 산물을 TLC로 분석한 결과를 보면 β -agarase가 아닌 α -agarase인 것을 알 수 있었다. α -Agarase의 분해산물은 항암 및 항산화 효과가 보고되어 있어[1], *Agarivorans* sp. HY-1 균주와 해당 균주가 생산하는 agarase는 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 교육부와 한국연구재단의 재원으로 지원을 받아 수행된 사회맞춤형 산학협력 선도대학(LINC+) 육성사업의 연구결과입니다.

The Conflict of Interest Statement

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

References

1. Fernandez, L. E., Valiente, O. G., Mainardi, V., Bello, J. L., Velez, H. and Rosado, A. 1989. Isolation and characterization of an antitumor active agar-type polysaccharide of *Gracilaria dominguis*. *Carbohydr. Res.* **190**, 77-83.
2. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/2/1/>
3. Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. and Ewart, H. S. 2011. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* **9**, 196-223.
4. 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.
5. Lee, S. J., Shin, D. Y., Kim, J. D., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2016. Characterization of α -agarase from *Alteromonas* sp. SH-1. *KSBB J.* **31**, 113-119.
6. Li, J., Han, F., Lu, S., Fu, X., Ma, C., Chu, Y. and Yu, W. 2007. A simple method of preparing diverse neoagarooligosaccharides with beta-agarase. *Carbohydr. Res.* **342**, 1030-1033.
7. Liu, N., Mao, X., Yang, M., Mu, B. and Wei, D. 2014. Gene cloning, expression and characterisation of a new β -agarase, AgWH50C, producing neoagarobiose from *Agarivorans gilvus* WH0801. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 1691-1698.
8. Min, K. C., Lee, C. E., Lee, D. G. and Lee, S. H. 2018. Isolation of *Agarivorans* sp. KC-1 and characterization of its thermotolerant β -agarase. *J. Life Sci.* **28**, 1056-1061.
9. Tawara, M., Sakatoku, A., Tiodjio, R. E., Tanaka, D. and Nakamura, S. 2015. Cloning and characterization of a novel agarase from a newly isolated bacterium *Simiduia* sp. strain TM-2 able to degrade various seaweeds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **177**, 610-623.
10. Yoon, S. Y., Lee, H. M., Kong, J. N. and Kong, K. H. 2017. Secretory expression and enzymatic characterization of recombinant *Agarivorans albus* β -agarase in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **47**, 1037-1042.
11. Yun, E. J., Yu, S., Kim, Y. A., Liu, J. J., Kang, N. J., Jin, Y. S. and Kim, K. H. 2021. *In vitro* prebiotic and anti-colon cancer activities of agar-derived sugars from red seaweeds. *Mar. Drugs* **19**, 213.

초록 : 한천분해 *Agarivorans* sp. HY-1의 분리와 한천분해효소의 특성

이동근¹ · 조하연¹ · 김안드레^{1,2} · 이상현^{1*}
(¹신라대학교 제약공학과, ²(주)한국리포솜)

본 연구에서는 인천시 영흥도에서 채취한 해수시료에서 분리한 한천분해세균의 생육특성과 균주가 생산하는 agarase 특성을 분석하였다. 분리된 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Agarivorans* 속 세균과 95% 유사하여, 분리된 균주를 *Agarivorans* sp. HY-1으로 명명하였다. *Agarivorans* sp. HY-1을 Marine broth 2216 배지에서 27°C, 250 rpm 조건으로 배양하니 생장은 1일차에, 효소활성은 2일차에 최대를 보였다. 조효소액은 균주 배양액에서 세포외로 분비되는 agarase로 준비하였다. *Agarivorans* sp. HY-1균주의 세포외 agarase는 40°C와 pH 7.0 (20 mM Tris-HCl)에서 최대의 활성을 보였다. 한천분해효소는 20, 30, 40, 50, 60 및 70°C에서 각 64, 91, 100, 97, 89 및 60%의 상대활성을 나타냈으며, pH 5, 6, 7 및 8에서는 79, 95, 100 및 55%의 활성을 나타냈다. 이 agarase는 20, 30, 40°C에서 2시간 열처리를 하였을 때 86% 이상의 잔존활성을 보였으며 50°C에서는 2시간 후 44% 이상의 잔존활성을 보였다. TLC 분석 결과, *Agarivorans* sp. HY-1은 α -agarase를 생산하는 것이 확인되었다. α -Agarase의 분해산물은 항암 활성 및 항산화 효과를 지니고 있으므로, *Agarivorans* sp. HY-1 균주와 agarase는 유용하게 이용할 수 있을 것으로 기대된다.