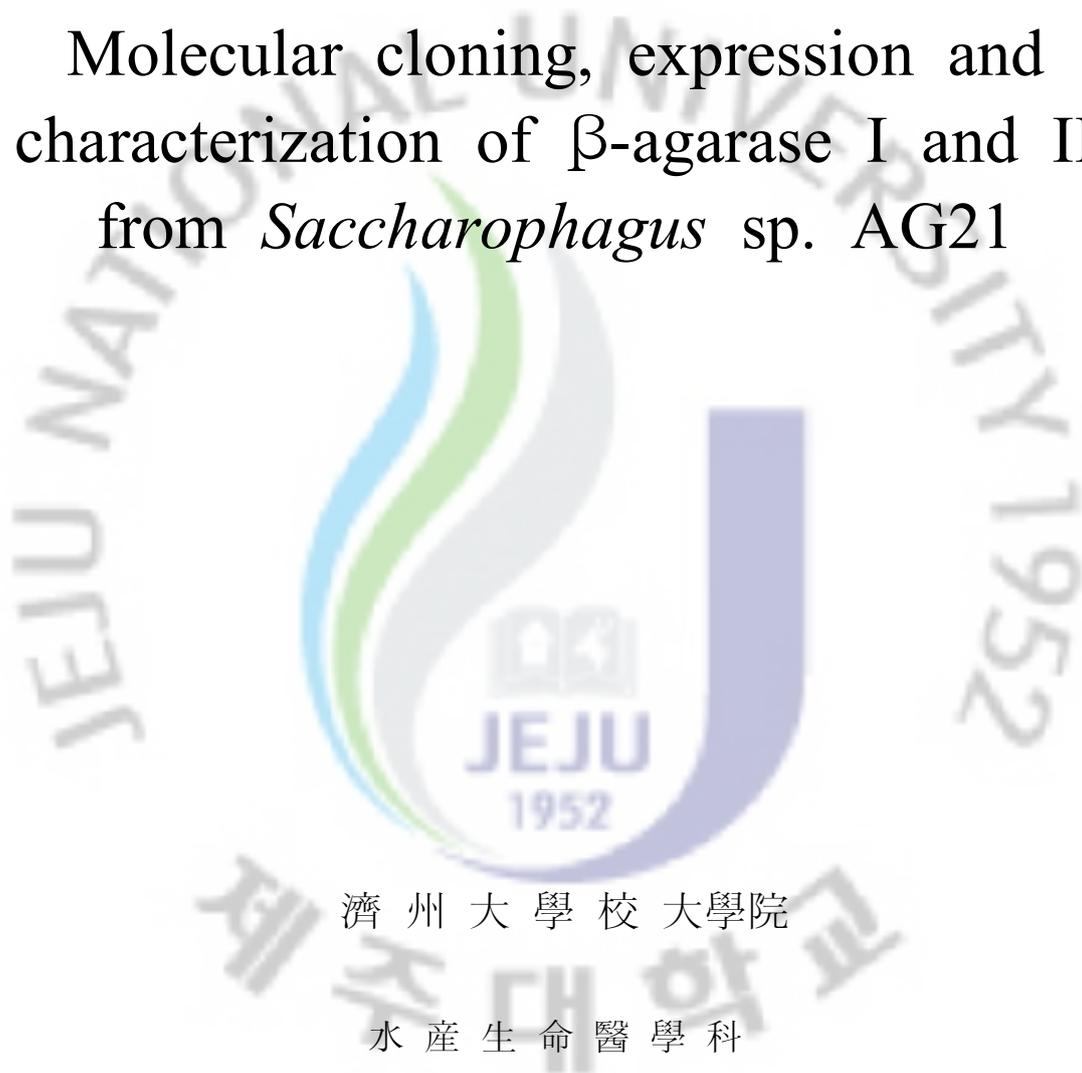


碩士學位論文

Molecular cloning, expression and
characterization of β -agarase I and II
from *Saccharophagus* sp. AG21



濟州大學校大學院

水產生命醫學科

李榮得

2009年2月

Molecular cloning, expression and characterization of β -agarase I and II from *Saccharophagus* sp. AG21

指導教授 李 濟 熙

李 榮 得

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2009 年 2 月

李榮得의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 허 문 수 ①

委 員 정 광 선 ①

委 員 이 제 희 ①

濟州大學校 大學院

2009 年 2 月

**Molecular cloning, expression and characterization of
 β -agarase I and II from *Saccharophagus* sp. AG21**

Youngdeuk Lee
(Supervised by professor Jehee Lee)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the
degree of Master of Science

Department of Aquatic life medicine

GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

February, 2009

목 차

목 차	I
표 목차	III
그림 목차	III
Abstract	IV
I. 서 론	1
II 재료 및 방법	4
1. 한천분해효소 분비 미생물의 분리 및 동정	4
1-1. 한천분해효소 분비 미생물의 분리 및 배양	4
1-2. 분리된 균주의 genomic DNA 분리	4
1-3. 16S rRNA 염기서열 분석	4
2. 한천분해효소를 coding 하는 유전자 서열 분석	5
2-1. Partial sequencing	5
2-2. 제한효소에 의한 genomic DNA의 절단	6
2-3. Casstte ligation	7
2-4. LA PCR을 위한 primer 제작	7
2-5. 1st LA PCR	8
2-5. 2nd LA PCR	8
3. Cloning을 위한 Saccharophagus sp. AG21의 agarase 유전자의 PCR	9
4. Agarase유전자의 cloning	10
4-1. Transformaion	11
5. <i>E. coli</i> 에서 한천분해효소의 발현과 정제	12
6. SDS-PAGE	13

7. 한천분해효소의 활성 측정	1 3
7-1. 최적온도	1 3
7-2. 열 안정성	1 3
7-3. 최적 pH	1 4
7-4. 금속 이온 효과	1 4
8. Thin layer chromatography를 통한 분해 패턴 확인	1 4
III. 결과	1 5
1. 한천분해효소 분비 미생물의 분리 및 동정	1 5
2. Agarase 서열 분석	1 9
3. 재조합 단백질 agaY1과 agaY2의 발현과 정제	2 2
4. Enzyme assay	2 5
4-1. 최적 온도	2 5
4-2. 열 안정성	2 6
4-3. 최적 pH	2 7
4-4. 금속이온 효과	2 8
5. 정제된 agarase의 분해 패턴 분석	3 0
IV. 고찰	3 3
V. 요약문	3 6
VI. 참고 문헌	3 8
감사의 글	4 2

표 목차

표 1. Degenerate PCR primer	6
표 2. Internal sequencing primer	6
표 3. LA PCR primer	9
표 4. 재조합 단백질 생산을 위한 Cloning primer	10

그림 목차

그림 1. Enzymology of agar digestion	2
그림 2. AG21의 배양 사진	15
그림 3. AgaY1의 단백질 서열 특성	16
그림 4. AgaY2의 단백질 서열 특성	17
그림 5. AgaY1의 핵산 및 아미노산 서열	19
그림 6. AgaY2의 핵산 및 아미노산 서열	21
그림 7. AgaY1 SDS-PAGE	23
그림 8. AgaY2 SDS-PAGE	24
그림 9. AgaY1의 최적 온도	25
그림 10. AgaY1의 열안정성	26
그림 11. AgaY1의 최적 pH	27
그림 12. AgaY1의 금속이온 효과	29
그림 13. AgaY1의 분해산물 TLC	31
그림 14. AgaY2의 분해산물 TLC	32

Abstract

Agarases are important glycoside hydrolases that are generally classified into hydrolase families 16, 50 and 86. Agarases are found to degrade agarose to frequently generate neoagarobiose, neoagarotetraose, or neoagarohexaose as the main products. In this study, we identified agar degrading bacteria *Saccharophagus* spp. from the sea water sample collected from Jeju Island marine environment. Two beta agarase genes were cloned from *Saccharophagus* sp. by LA-PCR and respective sequences were named as agaY1 and agaY2, respectively. The agaY1 and agaY2 consist of 1908, 2334 bp open reading frames encoding 636 and 778 amino acids, respectively. The predicted molecular mass of the agaY1, agaY2 were 69 kDa and 88 kDa, respectively. AgaY1 exhibited characteristic GH16- β -agarase domain and carbohydrate binding module. In contrast agaY2 showed characteristic GH42- β -agarase domain. ClustalW pair-wise comparison results revealed that agaY1 and agaY2 have only 12% amino acid identity.

The agaY1 and agaY2 recombinant agarases were purified using pMALTM protein fusion and purification system. Purified recombinant agaY1 and agaY2 agarases were used to hydrolyse the agar and resulted products were determined by thin layer chromatography (TLC). Results revealed that agaY1 could degrade agar mainly in totetraose and some hexaose components. In contrast, agaY2 could not able to degrade agar, however it could only degrade the tetraose and hexaoses. Therefore, based on the sequence and functional characterization agaY1 and agaY2 could be classified into beta agarase I and II, respectively. Recombinant agaY1 showed specific activity 5 U/ug. To further functional characterization of purified agaY1, we performed the enzymatic activity assay at different temperature and pH conditions. Results showed that agaY1 optimum temperature and thermal stability at 55 °C and 40°C, respectively. Also, it has optimum pH at 7.5. Additionally, responses on the enzymatic activity were evaluated using different metal ions. Results revealed that Fe⁺² have higher effect on the activity than K⁺² while Cu⁺² had not shown any

effect on agarase activity. Finally, two agarase genes cloned from *Saccharophagus* spp. have shown ability to hydrolysis agarose and other neoagarohexaose, neoagarotetraose.



I. 서론

한천은 홍조류의 세포벽을 구성하는 주요 물질로, 해양에 서식하는 홍조류에서 발견되는 한천은 agarose와 agaropectin으로 구성되어 있으며, 각각의 구성비는 agarose 70%, agaropectin 30%로 구성되어 있다. Agarose는 1→3결합으로 연결된 β -D-galactose 와 1→4결합으로 연결된 3,6-anhydro- α -L-galactose가 반복하여 존재하는 linear chain이다(Duckworth *et al.*, 1970). 이러한 한천의 미생물에 의한 분해는 agarase에 의하여 일어나는데, agarase는 주로 해양 세균에서 발견되어진다.(한국해양연구소, 1998). Agarase는 반응 기작에 기초하여 α -agarase 와 β -agarase라는 두 가지의 그룹으로 분류되며, α -1,3-linkages를 가수분해하여 agarooligosaccharide를 만드는 효소를 α -agarase, β -1,4 linkages 를 가수분해 하여 neoagarooligosaccharide를 만드는 효소는 β -agarse라고 불리며, β -agarase는 다시 β -agarase I, β -agarase II로 나뉜다(Belas *et al.*, 1989). β -agarase I은 주로 neoagarotetraose (NA4)를 생성하지만 neoagarohexaose (NA6)와 보다 큰 다당류 또한 조금씩 생성한다. 그리고 효소의 농도가 높으면 neoagarobiose도 생성하기도 한다. 일반적인 β -agarase II는 agarose를 분해하여 neoagarohexaose와 neoagarotetraose를 주로 생성하며, endo- 와 exo-lytic activity를 동시에 가져 neoagarobiose도 조금씩 생성한다(Morrice *et al.*, 1983; Groleau *et al.*, 1977). 마지막으로 α -agarolytic hydrolase는 neoagarobiose를 분해하여 monosaccharide인 D-galactose와 3,6-anhydro-L-galctose를 생성한다고 보고되었다(Belas *et al.*, 1989, Morrice *et al.*, 1983, Duckworth *et al.*, 1970; Day *et al.*, 1977). 여러 가지의 β -agarase들이 *Vibrio* sp. AP-2 (Aoki *et al.* 1990), *Pseudomonas* sp. W7 (Ha *et al.* 1997), *Pseudoalteromonas gracilis* B9 (Schroeder *et al.* 2003), *Bacillus cereus* ASK202 (Kim *et al.* 1999), *Zobellia galactanivorans* Dsij (Allouch *et al.* 2003)와 *Microbulbifer* sp. JAMB-A94 (Ohta *et al.* 2004) 등으로부터 정제되고 특성이 분석되었으며, 아미노산 서열의 유사도에 따라 β -agarase 는 glycoside hydrolase(GH)-16, GH-50, GH-86으로 분류 된다(Ohta *et al.* 2004). 대부분의 아미노산 서열에 기초하여 GH family로

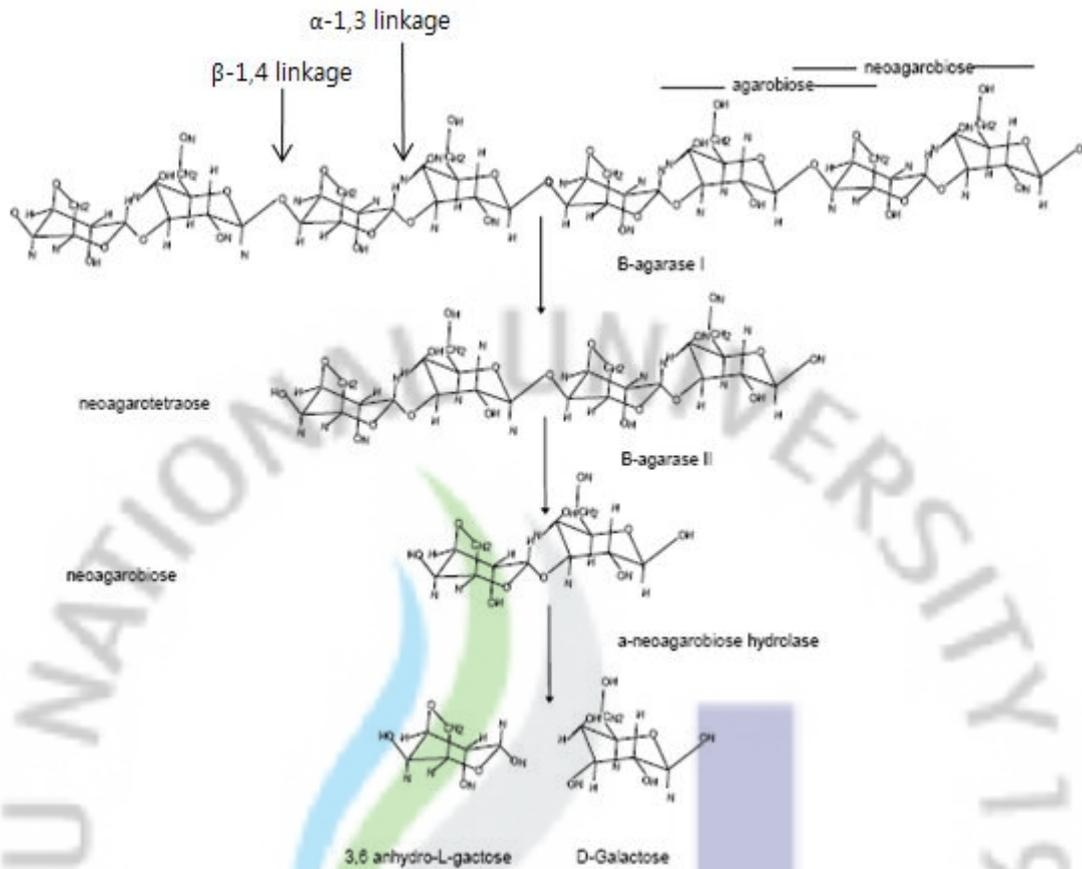


그림 1. Enzymology of agar digestion (from Belas, 1989)

분류되는 효소들은 비슷한 folding이 이루어지며, 분자적 기작 또한 일치하지만, agarase는 같은 GH group간 다양한 기질 특이성을 보인다(Allouch, 2003). GH-16 family는 agarose와 agarose 사이를 분해하면서 neogaro-oligosaccharide를 주로 생성한다(Allouch *et al.*, 2003). GH-16 group은 "polyspecific" family이다. 이 GH-16 group에 포함되는 효소들은 keratan-sulfate, B-1.3-glucan, mixed linkage B1.3, xyloglucan, 그리고 agarose등의 다양한 기질을 가수 분해하는 효소들로 이루어져있다(Allouch *et al.*, 2003). α -agarase system은 *alteromonas agarlyticus* strain GJ1B (Hassairi *et al.*, 2001), *Agarivorans* sp. JAMB-All (Ohta *et al.*, 2005)에서 보고되어졌다. 한편을 β -agarase에 의하여 분해된 산물은 neogaro-oligosaccharide, α -agarase에 의해 분해된 산물은 agar-oligosaccharide로 불려진다. 한편은 사람의 소화관내에서는 소화효소에 의

해 분해되지 않기 때문에 영양원으로 사용되지 않고, 혈중 콜레스테롤의 증가를 억제시키고 체내 콜레스테롤의 절대량을 감소시키는 기능을 가지고 있다. α -agarase에 의하여 생성되는 agarooligosaccharide는 apoptosis 유도 활성화, 항암 활성화(Kato, 2000), 항바이러스 활성화, 항산화 활성화(Chen *et al.*, 2005; Kato, 2000), 면역 조절 활성화(Yoshizawa *et al.*, 1995), 항알레르기 활성화, 항염증 활성화 등을 가진다고 보고되어져 있고, β -agarase에 의해 생성되는 neoagarooligosaccharide는 세균성장 억제(Kono *et al.*, 1989), 항산화 활성을 가지며, neoagarobiose는 보습 효과, 미백효과(Kobayashi *et al.*, 1997) 등의 효과를 가진다고 보고되어져 있다. 한천은 소화 효소에 의하여 분해되기 어려운 다당류 이므로 영양원으로 제공되지 않는으나, 제과 분야와 관련하여 젤리 등의 원료로 사용되었으며, 건강에 대한 관심의 증대와 함께 다이어트 식품으로도 이용되고 있다. 한천은 미생물 고체 배지와 실험실 시약등으로 분자 생물학 실험의 중요 재료로도 사용되고 있다. 제육가공에서 안정제로, 화장품이나 음식물에서는 겔화제로 사용되고 있으며, 제약분야에서도 사용되는 등 매우 다양한 산업분야에서 이용되고 있다. 이 논문에서는 한천분해활성을 보이는 균주를 분리하고, 분리된 균주로부터 두 가지 형태의 agarase의 염기서열을 분석하고, 특성을 분석하였다. 서열이 밝혀진 agarase를 발현 vector인 pMAL-c2x와 pET-16을 이용하여 발현 cell *E. coli* BL21을 이용하여 발현시키고, 정제 한 후 enzyme assay와 특성 분석을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 한천분해효소 분비 미생물의 분리 및 동정

1-1. 한천분해효소 분비 미생물의 분리 및 배양

제주 해안 지역으로부터 해조류, 해수, 무척추동물들을 채집 하여 멸균 해수에 희석 한 후 seawater agar (SWA; 멸균해수와 1.5 % 의 agar) 배지에 100 μ l씩 도말 한 후 30°C 에서 3~5 일간 배양하였다. 배양된 균 주 중에서 한천 분해양상을 나타내는 집락을 선별하였다. 한천 분해 양상을 보이는 균주들은 Marine agar plate (MA, Difco)에 배양하였다. 배양된 균주를 *Saccharophagus* sp. strain AG21 으로 명명 하였다.

1-2. 분리된 균주의 genomic DNA 분리

분리된 *Saccharophagus* sp. AG21 균주를 Marine broth에 0.3%의 한천을 첨가한 배지 4 ml에 접종하여 30°C에서 180 rpm으로 shaking하면서 36 시간 배양하여, 첨가된 한천이 완전히 분해될 때까지 배양하였다. 배양액을 E-tube에 넣어 4000 rpm에서 10분간 원심분리하여 pellet을 수집하고 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분리한 genomic DNA의 농도는 Spectrophotometer (Bio-RAD, England)를 이용하여 260 nm에서 optical density를 측정하였다.

1-3. 16S rRNA 염기 서열 분석

Saccharophagus sp. AG21 strain으로부터 분리된 genomic DNA를 주형으로 하고 Universal 16s rRNA primer 제작하여 각각의 미생물에 대한 16S rRNA 서열을 PCR을 통해 증폭시켰다. PCR 반응의 총 volume은 50 μ l로 하였으며 약 1 μ g의 genomic DNA를 template로 하여 100 pmole/ μ l 농도의 16s-27F primer (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 16s-1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 각각 1 μ l씩 첨가하고 2.5 mM의

dNTP 4 μ l와 10X Ex Taq polymerase buffer, 3 Unit의 Ex Taq DNA polymerase (Takara, Japan)를 혼합하였다. 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 5분 1회, denaturation 94°C에서 30초, annealing 50°C에서 30초, extension 72°C에서 1분 30초 간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 반응하였다. 반응 산물은 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 각각의 증폭된 산물은 PCR purification kit(bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였고 염기서열 분석을 의뢰 하였다. 밝혀진 염기서열은 기존의 NCBI database에 등록된 유전자서열들과 비교하여 분석하였다.

2. 한천분해 효소를 coding 하는 유전자 서열 분석

2-1.부분서열 분석

종 동정에 의해서 AG21이 *Saccharophagus* 속으로 밝혀졌고, *Saccharophagus degradans*와 가장 높은 유사도를 보여 *saccharophagus degradans* 2-40 의 agarase 서열 중에서 AgaB agarase (accession number : CP000282)과 aga50A (accession number : AY653535)을 이용하여 degenerated PCR primer를 제작하고 degenerate PCR 을 수행하였다. 반응 조건은 분리된 *Saccharophagus* sp. AG21로부터 분리된 genomic DNA 1 μ l와 10X Ex taq buffer 5 μ l, dNTP mixture(2.5mM) 4 μ l, forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l와 Ex taq polymerase (Takara, Japan) 0.25 μ l를 첨가하고 nuclease free water를 37.75 μ l 첨가하여 total volume을 50 μ l로 맞춰 주었다. 반응 조건은 94 °C에서 5분 반응 1회, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 4분 30초의 반응을 30회 반복 하였고, 마지막 extension 72°C에서 5 분간 반응 하였다. PCR 반응 후 PCR product는 1 % agarose gel에 전기영동하여 확인하고, 염기 서열 분석을 수행하였다. 사용된 primer 는 (표 1.)에 표기하였다. Degenerate PCR로부터 밝혀진 서열을 바탕으로 다 읽지 못한 내부 서열을 읽기 위하여 internal sequence primer(표.2)를 제작 하고 이를 이용하여 PCR을 수행하였다. 반응 조건은 *Saccharophagus* sp. AG21로부터 분리된 genomic DNA 1 μ l와 10X Ex taq buffer 5 μ l, dNTP mixture(2.5mM) 4 μ l, forward primer 1 μ l, reverse

primer 1 μl 와 Ex taq polymerase (Takara, Japan) 0.25 μl 를 첨가하고 nuclease free water를 37.75 μl 첨가하여 total volume을 50 μl 로 맞춰 주었다. 반응 조건은 94 °C에서 5분 반응 1회, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 4분 30초의 반응을 30회 반복 하였고, 마지막 extension 72°C에서 5 분간 반응 하였다.

primer	sequence	object
agaY1-d-F	5'- ATG AAA ACC ACC AAA TGC G -3'	agaY1 partial sequencing
agaY1-d-R	5'- TTA GTT GCT AAG CGT GAA N -3'	agaY1 partial sequencing
agaY2-d-F	5'- CGA TAA GCA GTT GGA TGT TAG -3'	agaY2 partial sequencing
agaY2-d-R	5'- TTA CTC GCC AAA ACG TN -3'	agaY2 partial sequencing

표 1. Degenerate PCR primer

primer	sequence	object
agaY1-I-F	5'-ATG GTG CCT ACG TAA CTG CTG TCT-3'	agaY1 internal sequencing
agaY1-I-R	5'-ACC GCT CAA CAG AAA CGT GGT TTG-3'	agaY1 internal sequencing
agaY2-I-F	5'-AGG CAT ATA AGT TCG CCG CTA CGA-3'	agaY1 internal sequencing
agaY2-I-R	5'-TTG CGC TTT GGT TGG GCT ATC TTC-3'	agaY1 internal sequencing

표 2. 내부 서열을 밝히기 위한 internal sequencing primer

2-2. 제한효소에 의한 *Saccharophagus sp. AG21*의 genomic DNA 의 절단

Agarase를 coding하는 유전자의 5'말단과 3'말단의 서열을 확인하기 위하여 LA PCR을 수행을 위해 제한효소로 AG21로부터 분리된 genomic DNA를 절단 하였다. AG21로부터 분리된 genomic DNA 30 μl 에 10X BamH I buffer 5 μl , 제한효소 BamH I 3 μl 를 첨가하고 증류수로 전체 volume 50 μl 를 맞춘 후 37°C water bath 에서 3시간 반응시켜 절단 하였다. 또한 genomic DNA 30 μl 에 10X EcoR I buffer 5 μl , 제한효소 BamH I 3 μl 를 첨가하고 증류수로 전체

volume 50 μ l를 맞춘 후 위와 같은 방법으로 반응 시켜 절단 하였다. 각각의 반응 산물에 3 M sodium acetate (pH 5.2) 5 μ l를 첨가 후 137.5 μ l의 차가운 ethanol을 첨가하여 -20°C에서 60분 동안 방치 한 후 4 °C 13000 rpm 에서 10분간 원심 분리한 후, 다시 차가운 70% ethanol을 처리하고 원심분리 한 후 건조 시켰으며, 20 μ l의 증류수에 elution 하였다.

2-3. Cassette ligation

BamH I과 EcoR I 제한효소로 절단된 AG21의 genomic DNA에 Sau3 1A cassette (5'HO-GTA CAT ATT GTC GTT AGA ACG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GA-3', 3-CAT GTA TAA CAG CAA TCT TGC GCA TTA TGC TGA GTG ATA TCC CTC TAG-OH 5)과 EcoR I cassette (5'HO-GTA CAT ATT GTC GTT AGA ACG CGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AG-3', 3'-CAT GTA TAA CAG CAA TCT TGC GCA TTA TGC TGA GTG ATA TCC CTC TCT TAA-OH5')을 부착하기 위하여 절단된 genomic DNA 7.5 μ l에 각각의 cassette 2.5 μ l, ligation mixture 10 μ l (takara)를 첨가하여 20°C에서 1시간 반응시켰다. 반응 산물에 3M sodium acetate (pH 5.2) 2 μ l를 첨가 후 50 μ l의 차가운 에탄올을 첨가하여 -20°C에서 60분 동안 방치 한 후 4 °C 13000 rpm 에서 10분간 원심 분리하고, 다시 차가운 70% 에탄올을 처리하고 원심분리 한 후 건조 시켰으며, 5 μ l의 증류수에 elution 하였다.

2-4. LA PCR 을 위한 primer 제작

LA-PCR에서 5' 부위의 증폭 시에는 forward primer로. LA PCR kit (Takara, Japan)의 C1 primer와 C2 primer를 사용하였고, reverse primer는 Degenerate PCR에 의하여 밝혀진 부분서열을 바탕으로 GSP1 (Gene Specific Primer 1), GSP2 (gene specific primer2)를 제작하여 사용하였다. 사용된 primer는 (표 3.)에 나타내었다. 3'부위의 증폭 시에는 degenerate PCR에 의해서 밝혀진 부분서열을 바탕으로 제작한 GSP1, GSP2를 forward primer로 하여 사용하였고, reverse primer로 C1 primer와 C2 primer를 사용하였다.

2-5. 1ST LA PCR

각각의 cassette이 ligation된 DNA 1 μl 를 증류수 33.5 μl 에 희석하여 DNA solution을 만들어 이를 94°C에서 10분간 denaturation 시켰다. DNA solution에 10X LA buffer II (Mg²⁺ plus) 5 μl , dNTP Pmixture (2.5mM) 8 μl , primer C1 1 μl , GSP1(표 3.) 1 μl 와 LA taq DNA polymerase (Takara, Japan) 0.5 μl 를 첨가하였다. 반응 조건은 94 °C에서 1분반응은 1회, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 4분 30초의 반응을 30회 반복 하였고, 마지막 extension 72°C에서 5 분간 반응 하였다. PCR 반응 후 PCR product는 1 % agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

2-6. 2ND LA PCR

1st PCR product 1 μl 에 증류수 33.5 μl , 10X LA buffer II (Mg²⁺ plus) 5 μl , dNTP mixture (2.5 mM) 8 μl , C2 primer 1 μl , GSP2(표 3.) 1 μl 와 LA taq DNA polymerase (Takara, Japan) 0.5 μl 를 첨가하여 total volume 50 μl 가 되도록 하였다. 반응 조건은 최초 denaturation 94 °C 2분 1회, denaturation 94°C 30초, annealing 55°C 30초, extension 72°C 4분 30초의 반응을 30회 반복 하였고, 마지막 extension 72°C에서 5 분간 반응 하였다. PCR 반응 후 PCR product는 1 % agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 확인된 agarase를 coding하는 PCR product는 gel purification kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 정제 하였다. 정제된 PCR product 3 μl , pGEM-T easy vector (Promega, USA) 1 μl 에 ligation mix(Takara, Japan)을 첨가하여 4°C에서 12시간 반응 시켜 ligation하였고, ligation 산물 10 μl 와 *E. coli* DH5a competent cell 100 μl 와 혼합하여 얼음에 30분 방치하고 42°C에서 1분 30초간 heat shock을 주어 형질 전환을 하였고, 1 ml의 LB broth에서 배양 후 배양액 70 μl 를 Selection plate (IPTG, X-gal, ampicillin 첨가)에 도말하고, 흰 집락을 선별하였다. 선별된 흰 집락을 ampicillin이 첨가된 LB broth에 inoculation하고 37°C에서 12시간 배양 후 plasmid mini extract kit (bioneer, Korea)을 이용하여 정제하고 염기서열 분석을 의뢰하였다.

primer	sequence	object
agaY1-5-1	5'-AAT CCA CCC AGC TCA ACC AGC ATA-3'	agaY1 5' GSP1
agaY1-5-2	5'-TGC CGA TTA CAC CAT TAC GGT TGC-3'	agaY1 5' GSP2
agaY1-3-1	5'-CAA ACC ACG TTT CTG TTG AGC GGT-3'	agaY1 3' GSP1
agaY1-3-2	5'-CAG GGC CAA GCC AAG CAT TGA TAA-3'	agaY1 3' GSP2
agaY2-5-1	5'-TCG TAG CGG CGA ACT TAT ATG CCT-3'	agaY2 5' GSP1
agaY2-5-2	5'-GCC ATC AAG AGG TGT TGT TCG CAA-3'	agaY2 5' GSP2
agaY2-3-1	5'-AAC GGT GCG TTG GAT TCT GGT TTG-3'	agaY2 3' GSP1
agaY2-3-2	5'-GGA AAT ACG TCG TTC GGC TGC AAA-3'	agaY2 3' GSP2
C1 primer	5'-GTA CAT ATT GTC GTT AGA ACG CGT AAT ACG ACT TCA-3'	cassette primer 1
C2 primer	5'-CGT TAG AAC GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3'	cassette primer 2

표 3. LA PCR primer

3. Cloniong을 위한 *Saccharophagus AG21*의 agarase 유전자의 PCR

AgaY1은 Nde I 제한효소 절단 부위 서열을 포함하는 forward primer agaY1-E-F (5'-GAG AGA CAT ATG GCA GAT TGG GAT GGC ATT CC-3')과 BamH I의 절단 서열을 포함하는 reverse primer agaY1-E-R (5'-GAG AGA GGA TCC TTA GTT GCT AAG CGT GAA CTT ATC TAG G-3')을 제작하였고다. AgaY2는 BamH I 제한효소 절단 부위 서열을 포함하는 forward primer agaY2-E-F (5'-GAG AGA GGA TCC GAT AAA GAC GAG CCG CAA GCG ATA-3')와 Xba I 제한 효소 절단 부위를 포함하는 agaY2-E-R (5'-GAG AGA TCT AGA TTA TTG CTC GCC AAA ACG TCG AC-3')을 제작하였다.

1 μg 의 genomic DNA를 template로 하여 20 pmole/ μl 농도의 08-237 primer, 08-238 primer를 각각 1 μl 씩 첨가하고 2.5 mM의 dNTP 6 μl 와 10X Ex *Taq* Buffer 5 μl , 0.25 μl 의 Ex *Taq* DNA polymerase를 혼합하고 증류수를 이용하여 50 μl 의 volume으로 PCR반응을 실시하였다. PCR 반응은 PTC-150

Minicycler를 이용하였고, 반응 조건은 최초 denaturation 94°C에서 5분, denaturation 94°C에서 30초, annealing 45°C에서 30초, extension 72°C에서 2분간을 30회 반복하였고, 마지막 extension은 72°C에서 5분간 반응하였다. PCR product는 1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하고 gel purification kit(bioneer, Korea)를 이용하여 정제하였다. 사용된 primer는 (표 4.)에 표기하였다.

primer	sequence	object
agaY1-E-F	5'-GAG AGA CAT ATG GCA GAT TGG GAT GGC ATT CC-3'	agaY1 cloning into pET-16b
agaY1-E-R	5'-GAG AGA GGA TCC TTA GTT GCT AAG CGT GAA CTT ATC TAG G-3'	agaY1 cloning into pET-16b
agaY2-E-F	5'-GAG AGA GGA TCC GAT AAA GAC GAG CCG CAA GCG ATA-3'	agaY2 cloning into pMAL-c2x
agaY2-E-R	5'-GAG AGA TCT AGA TTA TTG CTC GCC AAA ACG TCG AC-3'	agaY2 cloning into pMAL-c2x

표 4. agaY1, agaY2를 expression vector에 cloning 하기 위한 primer

4. Agarase유전자의 cloning

Agarase의 cloning을 위하여 발현용 vector로는 pMAL-c2x (NEB, England)와 pET-16b (Novagen, USA)를 사용하였으며, cloning을 위하여 *E. coli* DH5a에 transformation후 plasmid extraction을 하고, *E. coli* BL21에 다시 transformation을 하여 발현시켰다. 정제된 agaY1 PCR product와 pET-16b vector(Novagen, Germany)를 각각 40 μ g, BamH I buffer 5 μ l와 3 μ l의 BamH I, BSA(100X) 0.5 μ l를 첨가 한 후 전체 용량을 50 μ l로 맞춰준 후 30°C에서 3시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에 전기영동하여 완전히 digestion이 되었는지 확인하고 PCR purification kit (Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였고, 50 μ l의 nuclease free water에 elution 하였다. 잘려진 pET-16b와 agaY1 agarase coding 유전자 42 μ l를 5 μ l의 NEB buffer 4와 3 μ l의 *Nde* I을 혼합하여 37°C에서 3시간동안 반응을 시킨 후 CIP (Calf

Intestinal Alkaline Phosphatase, NEB, England) 를 처리하고 37°C에서 1시간 반응 시킨 후 절단된 DNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인한 후 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)을 가지고 정제하였다. 절단된 pET-16b와 PCR 산물은 DNA ligation kit <Mighty mix> (Takara, Japan)를 사용하여 ligation 하였다. pET-16b은 2 μ l, insert DNA 3 μ l씩을 넣고, ligation mixture 5 μ l를 첨가하여 전체 반응 volume을 10 μ l로 하여 24°C에서 1 시간동안 ligation 반응을 진행하였다. E-tube에 정제된 agaY2와 pMAL-c2x(NEB, England)를 각각 41.5 μ g, BamH I buffer 5 μ l와 3 μ l의 BamH I (Takara, Japan), BSA(100X) 0.5 μ l를 첨가 한 후 전체 volume을 50 μ l로 맞춰준 후 30°C에서 3시간동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1% agarose gel에 전기영동하여 완전히 digestion이 되었는지 확인하고 PCR purification kit(Bioneer, Korea)을 이용하여 정제하였고, 50 μ l의 nuclease free water에 elution 하였다. 잘려진 pMAL-c2x(NEB, England)와 agaY2 coding 유전자 37 μ l를 5 μ l의 10X M buffer와 BSA(10X) 5 μ l, 그리고 3 μ l의 Xba I (Takara, Japan)을 혼합하여 37°C에서 3시간동안 반응을 시킨 후 절단된 DNA는 1% agarose gel에 전기영동하여 확인한 후 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)을 가지고 정제하였다. 절단된 pMAL-c2x와 agarase 유전자는 DNA ligation kit <Mighty mix> (Takara, Japan)를 사용하여 ligation 하였다.

4-1. Transformaion

Ligation 산물은 *E. coli* DH5a에 transformation 하였으며 transformation 과정은 *E. coli* DH5a competent cell 55 μ l에 ligation 산물 5 μ l를 혼합하여 얼음에서 30분간 방치하고 42°C에서 90초간 heat shock를 주어 다시 얼음에 2분간 방치 하였다. 이에 Luria broth (LB) 1 ml를 첨가하여 37°C에서 1 시간 배양한 후 ampicillin이 들어있는 LB plate에 도말하고 12시간 배양하였다. 배양된 평판배지에서 집락을 선택하여 ampicillin이 들어 있는 LB broth에 배양하였다. 배양액을 1.5 ml e-tube에 옮긴 후 Plasmid mini Extraction kit (bioneer, Korea)을 이용해 배양된 cell의 plasmid DNA를 분리하였고 이를 다시 발현용 cell인 *E. coli* BL21 (Novagen, Germany) competent cell 안으로 transformation 하여 37°C에

서 밤새 배양 후 집락을 선택하여 ampicillin이 들어있는 LB broth 4 ml에 접종하고 12시간 배양하였다.

5. *E.coli*에서 한천분해효소의 발현과 정제

재조합 agaY1을 *E.coli* BL21에서 IPTG(Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside)를 최종농도 0.3 mM이 되도록 첨가하고, 10°C에서 과발현을 유도 하였다. 3 ml의 재조합 agaY1이 들어있는 *E.coli* BL21의 배양액을 100 μ l의 ampicillin이 첨가된 Luria broth (LB)에 접종하여, 37°C에서 180 rpm으로 shaking하면서 optical density가 600 nm파장에서 0.8이 되도록 배양 후, IPTG를 0.3 mM이 되도록 첨가하고, 이를 다시 10°C에서 15시간동안 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. AgaY1 재조합 유전자를 포함하는 *E. coli*를 발현시킨 배양액을 4°C 4000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 제거하고, 5 ml의 His bind kit의 Binding buffer (Novagen, Germany)에 pellet을 재 부유 시켰고, 이를 -20°C에서 밤새 보관하였다. 발현된 재조합 agaY1은 Histidine taq과 fusion된 단백질로, 발현된 agaY1 agarase는 His·Bind kit 을 이용하여 정제 하였다. 재조합 agaY2 agarase를 *E.coli* BL21을 이용하여 에서 IPTG(Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside)를 최종농도 0.3 mM이 되도록 첨가하고, 10°C에서 과발현을 유도 하였다. 3 ml의 재조합 agaY2이 들어있는 *E.coli* BL21의 배양액을 100 μ l의 ampicillin(100 mg/ml)과 10 mM이 되도록 glucose(최종농도 0.2%)를 첨가한 Luria broth(LB)에 접종하여, 37°C에서 180 rpm으로 shaking하면서 optical density가 600 nm파장에서 0.8이 되도록 배양 후, IPTG를 0.3 M이 되도록 첨가하고, 이를 다시 10°C에서 15시간동안 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. AgaY1 재조합 유전자를 포함하는 *E. coli*를 발현시킨 배양액을 4°C 4000 rpm에서 20분간 원심분리 후 상등액을 제거하고, 5 ml의 column buffer (Tris-HCl, pH 7.4, NaCl)에 pellet을 재 부유 시켰고, 이를 -20°C에서 밤새 보관하였다. 발현된 재조합 agaY2는 maltose binding protein과 fusion된 단백질로, 발현된 agaY2 agarase는 pMAL Protein Fusion and Purification System(NEB, England)을 이용하여 정제 하였다.

6. SDS-PAGE

AgaY1과 agaY2의 재조합 단백질을 발현을 유도하기 전과 발현을 유도하고 난 후에 각각 200 μ l의 세포를 모은 후 10%의 polyacrylamide gel에서 SDS-PAGE를 수행하였다. Protein Molecular Weight Marker (Takara, Japan)를 이용하여 단백질의 분자량을 확인 하였다.

7. 한천분해효소의 활성 측정

Agarase 활성은 DNS법을 이용하여 측정하였다. DNS 법은 3,5-dinitrosalicylic acid method (Miller *et al.*, 1959)에 따라 환원당을 측정하는 방법으로 이루어졌다. DNS solution은 3,5-dinitrosalicylic acid 0.25 g과 sodium potassium tetrates 7.5 g을 50 ml의 2 M NaOH 용액에 녹인 후 dH₂O를 이용하여 전체 부피를 250 ml로 맞춰 주었다. 190 u의 1% agarose(Cambrex, USA) 용액과 10 μ l의 정제된 agarase를 섞은 용액을 42°C 에서 10분간 반응 시켰고, 1 ml의 DNS solution을 첨가하여 100°C 10분간 가열 반응하여 575 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 그 값을 구하였다.

7-1. 최적온도

정제된 agaY1의 온도에 따른 한천분해 활성을 측정하였다. 한천분해활성을 측정하기 위한 표준 기질 용액으로 1 %의 agarose가 포함되어 있는 10 mM Tris Cl buffer(pH 6.5)를 이용하였다. 온도에 따른 한천 분해능의 측정은 표준 기질용액을 증탕가열 한 후, 70°C부터 40°C까지 5°C간격으로 냉각하고, 냉각한 각 온도별 1% agarose 용액 190 μ l에 10 μ l의 정제된 agaY1을 첨가하여 42°C에서 반응시켜 DNS법으로 agar 분해 활성을 측정하였다.

7-2. 열안정성

정제된 agaY1의 열 안정성을 측정하기 위하여 40°C, 45°C, 그리고 50°C에서 시간별로 0분, 30분, 60분, 90분, 120분간 노출 시킨 후 각 시간별로 노출 시킨 정제된 agaY1 10 μ l를 agarose 1 %가 포함되어 있는 10 mM Tris Cl buffer (pH 6.5)인 기질용액 190 μ l에 첨가하고 42°C에서 15분간 반응시켜 DNS법으로 한천

분해능을 측정하였다.

7-3. 최적 pH

정제된 각각의 agarase의 최적 pH 및 pH에 따른 한천분해능을 확인하기 위하여, 한천분해능을 측정하기 위한 기질 용액으로 50 mM citrate-phosphate buffer (pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5)와 50 mM phosphate buffer (pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0)을 이용 하여 1%의 agarose 용액을 만들고, 각각의 기질 용액 190 μ l 에 정제된 agaY1 10 μ l를 첨가하여 42°C에서 15분간 반응시켜 DNS 법으로 한천 분해능을 측정하였다.

7-4. 금속 이온 효과

정제된 각각의 agarase의 금속이온에 따른 한천분해능을 확인하기 위하여, CaCl₂, CuSO₄, EDTA, FeSO₄, KCl, MgSO₄, MnCl₂ 및 NaCl를 사용하였다. agarose 1%(w/v)가 포함되어 있는 10 mM Tris Cl buffer(pH 6.5)에 상기 각각의 금속을 2mM의 농도로 포함하고 있는 기질용액 190 μ l에 각각의 정제된 효소 10 μ l를 첨가하여 42°C에서 15분간 반응시켜 DNS법으로 한천 분해능을 측정하였다.

8. Thin layer chromatography을 통한 분해 패턴 확인

정제된 제조합 단백질인 agaY1과 agaY2 agarase의 특성 분석을 위하여 thin layer chromatography (TLC)를 수행하였다. 1% agarose (Cambrex, USA), hexanitol (sigma, USA), neoagarotetraose를 포함하는 10 mM Tris Cl buffer (pH 6.5)에 agaY1과 agaY2 agarase를 반응시켜 시간에 따른 분해 양상을 확인하였다. 상기 박막크로마토그래피의 용매는 n-butanol, acetic acid 및 증류수를 2:1:1 (n-butanol : acetic acid : water)로 혼합한 혼합액을 사용하였으며, 반응산물은 2 μ l 씩 분주하였다, 플레이트는 Silica gel 60 plate (Merck, Germany)를 사용하였으며, 반응산물을 분주한 후, 위의 용매에서 plate를 전개시켰고, 건조 후 10% 황산 용액을 분사하여 열을 가해 생성된 당을 확인하였다.

III.결 과

1. 한천분해효소 생성 미생물의 분리 및 동정

제주 연안의 해수로부터 약 50종 이상의 균주를 분리하였고, 분리된 균주 중에서 비교적 높은 한천분해활성을 보이는 균주를 선별하였다. 선택된 균주는 한천 분해 활성을 보였으며, MB배지에서 배양시 시간이 지남에 따라 한천이 분해된 주위에 검은색을 띄었다. 분리된 균주로부터 Genomic DNA를 분리 한 후 16S ribosomal RNA 서열을 분석한 결과 *Saccharophagus degradans*와 99.0 %일치하였고, 이를 *Saccharophagus* sp. AG21 strain 으로 명명하였고, 이 균주를 대상으로 연구를 수행하였다.

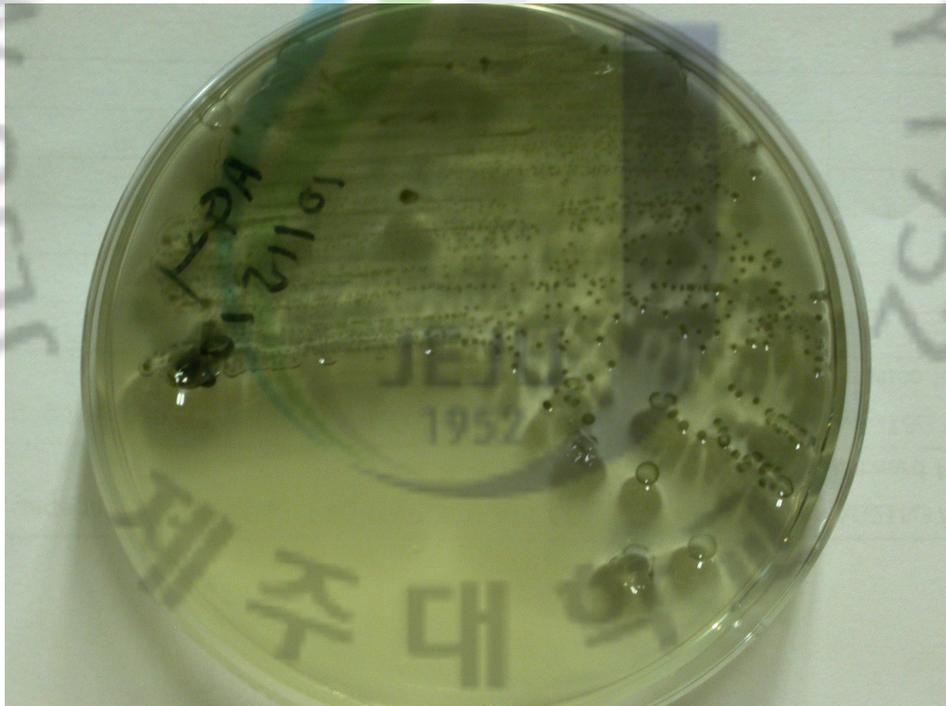


그림 2. AG21을 MA배지에서 배양한 모습

2. Agarase 서열 분석

Saccharophagus sp. AG21로부터 cloning된 agaY1을 coding 하는 유전자 서열은 전체 길이 1908 base pair로 636개의 아미노산을 암호화하고 있다. AgaY1의 분자량은 약 69 kDa 으로, pH 4.2의 등전점을 가지고 있었다. 19번 아미노산과 20번 아미노산 (ala-ala)사이에서 절단부위를 가지는 19개 아미노산의 signal peptide(그림 5.)를 가지고 있었다(SignalP 3.0 server을 이용). NCBI conserved-domain database search program을 이용하여 agaY1의 아미노산 서열을 분석한 결과 glycosyl hydrolase family 16 (GH 16) domain (53-321)을 가지고 있었고, 두 개의 carbohydrate binding module(382-488, 504-636)을 가지고 있었다. NCBI의 BlastP program을 이용하여 유사 단백질 서열을 찾아보았다. *saccharophagus degradans* 2-40의 β -agarase I인 *Aga16B* (accession number : AAT67062)와 88%의 상동성을 보였고, *Microbulbifer agarilyticus* 의 agaA3(accession number: BAE06228)와 79 %, *Pseudomonas* sp. ND137의 agarase (accession number: BAD88713)과 52%의 상동성을 보였으며, 모두 GH 16 domain과 2가지의 carbohydrate binding domain을 가지고 있었다.

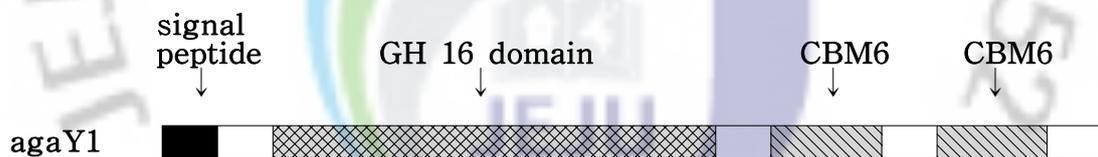


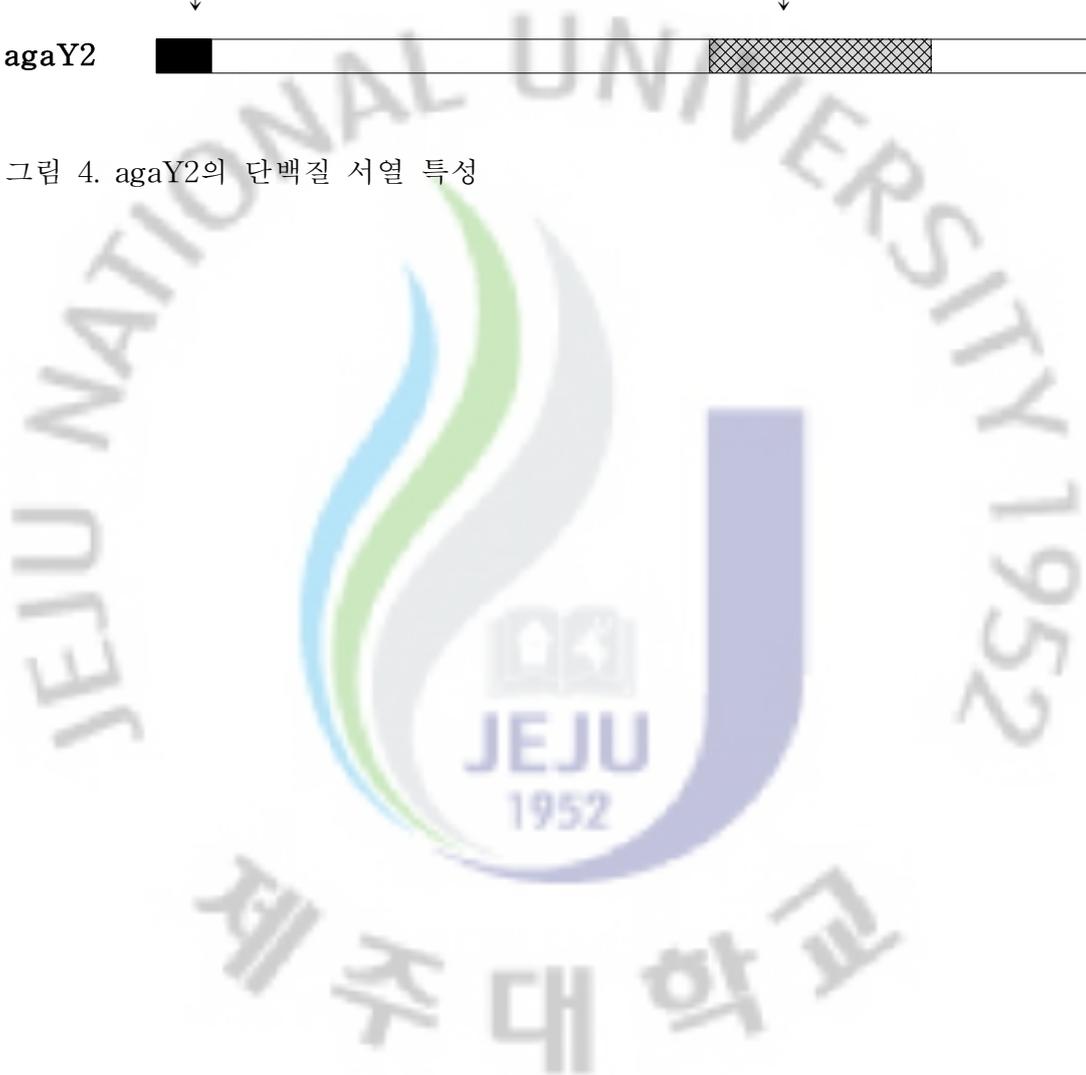
그림 3. agaY1의 단백질 서열 특성

Saccharophagus sp. AG21로부터 cloning된 agaY2을 coding 하는 유전자는 전체 길이 2334 base pair 로 778 개의 아미노산을 암호화하고 있다. 23번 아미노산과 24번 아미노산 사이에서 절단되는 23개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide가 관찰되었고, agaY2의 분자량은 약 88 kDa 으로, pH 5.2 의 등전점을 가지고 있었다. Glycosyl hydrolase family 42 (GH 42) domain (490-657)을 가지고 있었고, *saccharophagus degradans*의 agarase *aga50A* (accession number : ABD80438)와 96%, *Pseudoalteromonas atlantica* T6C의 agarase(unpublished,

accession number ABG41155)와 61%의 상동성을 보였다. Aga50A와 *Pseudoalteromonas atlantica* T6C의 agarase 역시 GH 42 domain을 가지고 있으며, β -agarase로 알려져 있다.



그림 4. agaY2의 단백질 서열 특성



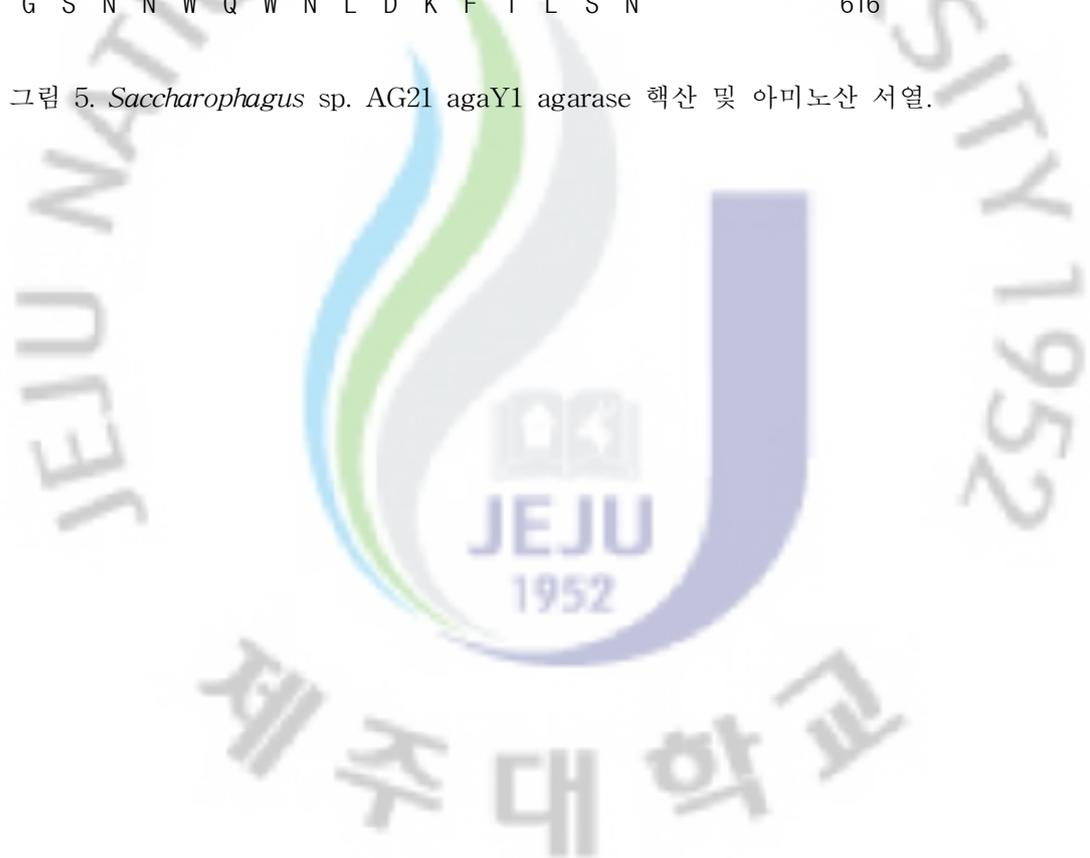
ATGAAAACCACCAATGCGCCCTAGCTGCGCTCTTCTTCAGTACCCCTCTTATGGCCGCA 60
 M K T T K C A L A A L F F S T P L M A A 20
 GATTGGGATGGCATTCCCTGTCCAGCGGACCCAGGGAATGGCAACACCTGGGAGCTACAG 120
 D W D G I P V P A D P G N G N T W E L Q 40
 TCCCTTTCTGACGATTTTAATTATGTAGCCCGACTAACGGCATTCCCTGTCCAGCGGAC 180
 S L S D D F N Y V A P A N G I P V P A D 60
 CCAGGGAATGGCAACACCTGGGAGCTACAGTCCCTTTCTGACGATTTTAATTATGTAGCC 240
 P G N G N T W E L Q S L S D D F N Y V A 80
 CCAGCTAACGGCAAAAGCACCACGTTCTATAGTCGCTGGAGCGAAGGCTTTATCAATGCT 300
 P A N G K S T T F Y S R W S E G F I N A 100
 TGGCTTGGCCCTGGCAAACCGAATACTACGCCCCCAACTCGTCAGTAGAGGGTGGCAAC 360
 W L G P G Q T E Y Y A P N S S V E G G N 120
 TTAGTGATTAAGCCACTCGCAAGCCCGGCACAACCCAAATCTATGCAGGTGCAATTCAC 420
 L V I K A T R K P G T T Q I Y A G A I H 140
 TCCAAAGAAAGTGTTACTTACCTTTGTATATGGAAGCGCGCACCAAAATTAACCTC 480
 S K E S V T Y P L Y M E A R T K I T N L 160
 ACCCTCGCAAACGCATTTTGGCTACTAAGCTCAGATTCACCGAAGAGATTGATGTGCTG 540
 T L A N A F W L L S S D S T E E I D V L 180
 GAGTCTTACGGTAGCGACCGCTCAACAGAAACGTGGTTTGACGAGCGCCTACATTTAAGC 600
 E S Y G S D R S T E T W F D E R L H L S 200
 CACCACGTTTTTATCCGCCAGCCTTTTCAAGACTACCAACCAAAAGATGCAGGTAGCTGG 660
 H H V F I R Q P F Q D Y Q P K D A G S W 220
 TACCCCAACCCCGATGGCGGCACTTGGCGGACCAATTTTCCGTATAGGTGTTTATTGG 720
 Y P N P D G G T W R D Q F F R I G V Y W 240
 ATAGACCCATGGACATTGGAGTATTACGTGAATGGCGAATTAGTACGCACCGTAAGCGGC 780
 I D P W T L E Y Y V N G E L V R T V S G 260
 CCAGAAATGATTGACCCGTACGGTTACACCAACGGCACAGGCCTAAGTAAACCCATGCAG 840
 P E M I D P Y G Y T N G T G L S K P M Q 280
 GTTATTTTTGATGCAGAGCATCAGCCTTGGCGGACGAGCAAGGTACTGCCCCACCCACC 900
 V I F D A E H Q P W R D E Q G T A P P T 300
 GACGCTGAGCTAGCCGACTCGAGTCGCAATCAATTCTTAGTTGACTGGGTACGATTCTAC 960
 D A E L A D S S R N Q F L V D W V R F Y 320
 AAACCCGTGGCAAACAATGGTGGCGGCGACCTGGCAACGGTGGTAATCCAGATAAT 1020
 K P V A N N N G G G D P G N G G N P D N 320
 GGCAATGGTGGCAACCTGATAATGGCAGCAGTGGCGATACAGTAGTGGTAGAAATGGCC 1080
 G N G G N P D N G S S G D T V V V E M A 340
 AACTTCTTCCACAGGTAAGAAGGCTCTGCAGTTGCAGGCGACACTTTCACAGGCTTC 1140
 N F S S T G K E G S A V A G D T F T G F 360
 AACCCAGCGGCGCCAACAACATCAACTACAACCCCTAGGGGATTGGGCGACTACACG 1200
 N P S G A N N I N Y N T L G D W A D Y T 380
 GTGAACTTCCCGCTGCCGTAATTACACCGTAAACCTAATTGCTGCCTCGCCGTTACA 1260
 V N F P A A G N Y T V N L I A A S P V T 400
 TCTGGGCTGGGTGCAGATATTTTGGTAGACAGCAGTTACGTAGGCACCATACCTGTTAGC 1320
 S G L G A D I L V D S S Y V G T I P V S 420
 AGCACCAGGACTTGGGAGATATAACAACCTTTAGTTTGGCCAGCTCGATTTATATCGCA 1380
 S T G A W E I Y N T F S L P S S I Y I A 440
 AGCGCAGGCAATCATACTATTCGCGTACAAAGCTCCGGCGGCGAGCGCTTGGCAGTGGAAC 1440
 S A G N H T I R V Q S S G G S A W Q W N 460

```

GGCGACGAACTTCGCTTTACCCAAACAGATGCGGATACAGGCACCAATCCACCCAGCTCA 1500
G D E L R F T Q T D A D T G T N P P S S 480
ACCAGCATAACGGTTGAAGCAGAAAGCTTTAACGCGGTGGCGGCACCTTTAGCGATGAT 1560
T S I T V E A E S F N A V G G T F S D D 500
CAAGCTCAACCTGCTAGCGTTTACACCGTTAGCGGCAACACTGCCATTAAGTACGTAAC 1620
Q A Q P A S V Y T V S G N T A I N Y V N 520
CAAGGCGATTATGCCGACTACACCATTACGTTGCCAAGTGGGTACCTACACCATTAGC 1680
Q G D Y A D Y T I T V A Q V G T Y T I S 540
TATCAAGCTGGCAGTGGCGTAACAGGTGGCAGCATTGAGTTTTTAGTAAATGAAAACGGC 1740
Y Q A G S G V T G G S I E F L V N E N G 560
AGCTGGAGCAGCAAACCGTTACCGCGTACCAAACCAAGTTGGGATAACTCCAACCC 1800
S W S S K T V T A V P N Q G W D N F Q P 580
CTAAACGGAGGCAGCGTTTACCTAAGCGCAGGCACCCACCAAGTTCGTTTACACGGCGCG 1860
L N G G S V Y L S A G T H Q V R L H G A 600
GGCAGTAACAACCTGGCAGTGGAACTAGATAAGTTCACGCTTAGCAAC 1908
G S N N W Q W N L D K F T L S N 616

```

그림 5. *Saccharophagus* sp. AG21 agaY1 agarase 핵산 및 아미노산 서열.



ATGACAAAATTCTCAATTAAGAAAATACTGGCCTGTGTTTGTATCGCCACTTTAATTAAT 60
 M T K F S I K K I L A C V C I A T L I N 20
 GCTTGTGCGGATAAAGACGAGCCGCAAGCGATAGCTTCCCAGTCTAGTGCCGAAGAGGGC 120
 A C A D K D E P Q A I A S Q S S A E E G 40
 GCCCTCGACAATGTGGTATTAGCAAACATGTTGTGGGATTTTGATTGGGTGACGTTACG 180
 A L D N V V L A N M L W D F D S G D V T 60
 CCTGCAATCCAAACCGAAAATACGACTGTGAAGTTCGTGCCCAATTCTTCCGGGCGGGCT 240
 P A I Q T E N T T V K F V P N S S G R A 80
 TTGGAGGTAGAGCTACAAACTCAATCGCATTACTCTGCCAACTTAACCTTTGCCGCGAT 300
 L E V E L Q T Q S H Y S A N L T F A A D 100
 GCGCCTTGGGACTGGAGCGGGCTAGGAATTTTGCATTGCTTTGGATATTGCTAACCCC 360
 A P W D W S G L G N F A F A L D I A N P 120
 AAGCCAACATCTGTTTATTTGCATGTGGTTGCTACAGACAGCCATGGCAAAGAGCGTAAA 420
 K P T S V Y L H V V A T D S H G K E R K 140
 CGTGCCATTGCAATACCAGGTAATTCAGTGGTACATATTATTATGAGCTAAAGGGGCT 480
 R A I A I P G N S S G T Y Y Y E L K G P 160
 GACGACGGTGTGAAACCGGTATTCGCTCTAACCCGCCAAGTTGGAACAGTACTATCAG 540
 D D G V E T G I R S N P P S W N S D Y Q 180
 AGTATGATTTATCGCTGGGGCGATAAGCAGTTGGATGTTAGCTCACTAAAAAGCATTGCT 600
 S M I Y R W G D K Q L D V S S L K S I A 200
 TTTACAGTAACCGGCTACTTGAAAATAAAAACACTTATTCTCGATAACGTACGTTTAATT 660
 F T V T G V L E N K T L I L D N V R L I 220
 CAGCCTAAATCTATAGATGAAAACCTACCTTAAAGGGCTGGTGGATGAGTTCCGGTCAAAAC 720
 Q P K S I D E N Y L K G L V D E F G Q N 240
 GATAAATTAGAATTTGTTAAACAAGGTTCAATCTGTTGAGCAATTGCGTAAGTTATCGGAA 780
 D K L E F V N K V Q S V E Q L R K L S E 260
 GAAGAGCAAGCGCAGTTGCGAACAACACCTCTTGATGGCCGCTCCAAATTTGGTGGATGG 840
 E E Q A Q L R T T P L D G R S K F G G W 280
 GCAGAGGGGCCGAAGCTTGAAGCGACAGGGTATTTTCGTACGCAAAAAGTTAACGGCAAA 900
 A E G P K L E A T G Y F R T Q K V N G K 300
 TGGGCGTTGGTTGACCCGAGTGGTTATTTATTTTCTCTACCGGTATTGCTAACGTTCCG 960
 W A L V D P S G Y L F F S T G I A N V R 320
 TTAGCAAACACTTCTACTATAACTGGCTACGATTTTCGATCAGTCTAAAATCCCTCAGCGT 1020
 L A N T S T I T G Y D F D Q S K I P Q R 340
 CAACCTGGTGATTTAACACCTGAAGATTCTCTAGGGCTTAACCGTGCGCCGGATGCAGCC 1080
 Q P G D L T P E D S L G L N R A P D A A 360
 CTACCCACAAGGCATATAAGTTCCGCCGCTACGAGCTGAAATGTTCACTTGGTTACCTAAA 1140
 L P T R H I S S P L R A E M F T W L P K 380
 TATGATGAGCCGCTAGGACTTAACTTTGGCTACCGACGCGAAGTGCATACAGGGGCCATT 1200
 Y D E P L G L N F G Y R R E V H T G A I 400
 GAACGGGGGAGACGTTTCAGCTTTTATCGTGCAAACCTACAGCGAAAATACGGCATAAGT 1260
 E R G E T F S F Y R A N L Q R K Y G I S 420
 GACGAAGCGCATTGATGGAAAATGGCGAGAAACCACTGTGAATCGTATGCTTTCTTGG 1320
 D E A A L M E K W R E T T V N R M L S W 440
 GGGTTCACCTCATTGGTAATTGGATTGACCCCGCTATTATCAAATGGACCGTATTCCA 1380
 G F T S F G N W I D P A Y Y Q M D R I P 460
 TACTTTGCCAATGGTTGATTATTGAAAACCTTTAAAACAGTAAGCAGTGGCAATGATTAT 1440
 Y F A N G W I I G N F K T V S S G N D Y 480

TGGAGCCCGTTGCCAGATCCATTCGACCCGCTATTTAAAGAGCGCGGTATATTACTGCA	1500
W S P L P D P F D P L F K E R A Y I T A	500
GAGCAAATTGGCCGTGAGGTTAAAAATAACCCCTTGGTGTGTGGGTGTTTTTATCGATAAC	1560
E Q I G R E V K N N P W C V G V F I D N	520
GA AAAAAGTTGGGGCAAGAAGGGGCTGTACAAACGCAGTACGGAATTGTGATTAACACT	1620
E K S W G Q E G A V Q T Q Y G I V I N T	540
CTTAGCCACGCAGCTGAAGATAGCCCAACCAAGCGCAATTTGTAATGCTTATGCAGCAA	1680
L S H A A E D S P T K A Q F V M L M Q Q	560
AAATATGGGGATATTACCGAACTAAATCGCGCTTGAATATTGAGCTAAACAGTTGGCAA	1740
K Y G D I T E L N R A W N I E L N S W Q	580
GAATTTGCTAATGGTGTGCTCTAACCCAATTTAGCGATGTCGTGGTTGCCGACCTCTCT	1800
E F A N G V A L T Q F S D V V V A D L S	600
ATTATGTTGGAGCACTACGCCGGCCAATATTTTAAAAATTGTACGCGAAGCAGTTAAACAT	1860
I M L E H Y A G Q Y F K I V R E A V K H	620
TATTTACCAAACCATATGTACCTTGGCGCTCGCTTTGCAGATTGGGGGATGACACCGGAA	1920
Y L P N H M Y L G A R F A D W G M T P E	640
ATAGTTCGTTCCGGCTGCAAAAATATGCCGATGTTGTAAGTTACAACCTATTACAAAGAAGGC	1980
I R R S A A K Y A D V V S Y N Y Y K E G	660
GTTAGTAATAAATTCTGGCACTTCTTAGAGGAGTTAGATAAGCCCAGCATTATAGGAGAA	2040
V S N K F W H F L E E L D K P S I I G E	680
TTCCATAACGGTGCCTTGGATTCTGGTTTGCTAAACCCCGGTGTAGTACACGCAAGCTCG	2100
F H N G A L D S G L L N P G V V H A S S	700
CAAGCTGATCGCGTAAAAAATATGCTGAGTATATGAATAGCGTGATAGATAACCCGTAT	2160
Q A D R G K K Y A E Y M N S V I D N P Y	720
TTTGTGGAGCCATTGGTTTCAGTATATTGATTGCCACTTACCGGTCGTGCTTACGAT	2220
F V G A H W F Q Y I D S P L T G R A Y D	740
GGTGAAAACATAATATTGGTTTTGTGAGTATTGCGGATATCCCTTACACCCCGCTTGTA	2280
G E N Y N I G F V S I A D I P Y T P L V	760
GAGGCTGCGCGAGAAGTAAATAAAGCACTATATAGTCGACGTTTTGGCGAGTAA	2334
E A A R E V N K A L Y S R R F G E Q	778

그림 6. *Saccharophagus* sp. AG21 agaY2 agarase의 핵산 및 아미노산 서열

3. 재조합 단백질 agaY1 과 agaY2의 발현 과 정제

재조합 agaY1는 pET-16b vector를 이용하여 *E. coli* BL21에서 발현시켰다. 발현된 단백질은 SDS-PAGE를 통하여 확인 하였고, (그림.9) 에 나타내었다. induction을 하기 전과 induction후의 단백질을 비교하였을 때 induction후에 특이적 밴드가 강하게 발현된 것을 확인 할 수 있었고, 정제 후에 강하게 발현된 특이적 단백질 band만을 순수하게 정제 된 것을 확인 할 수 있었다. 아미노산 서열 분석에 의하여 밝혀진 *agaY*의 분자량은 66 KDa로 pET-16b에 의하여 his taq (5 kDa)과 퓨전 단백질을 이루었으므로 71 KDa의 단백질이 발현된 것을 확인 할 수 있었다.

재조합 agaY2는 pMAL-c2x vector를 이용하여 *E. coli* BL21에서 발현시켰다. SDS-PAGE를 통하여 발현된 단백질을 확인 하였다(그림 10). 정제 후에 약 130 kDa의 특이적 단백질 band를 확인 할 수 있었다. AgaY2의 분자량은 88 kDa이며, pMAL-c2x에 의한 maltose binding protein의 분자량은 42.5 kDa이므로 fusion된 단백질의 분자량 130.5 kDa에 부합하는 단백질이 정제된 것을 확인 할 수 있었다.

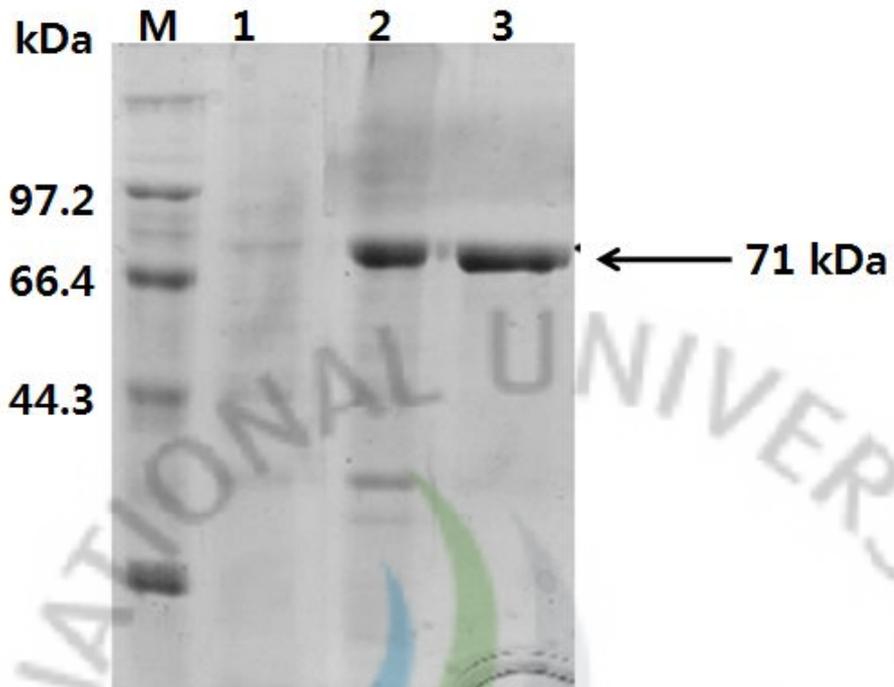


그림 7. AgaY1 SDS-PAGE

M: Protein marker

Lane1 : Before induction of E. coli BL21

Lane2 : After induction with 10 mM IPTG at 10 °C for 15 hours

Lane3 : Purified recombinant agaY1

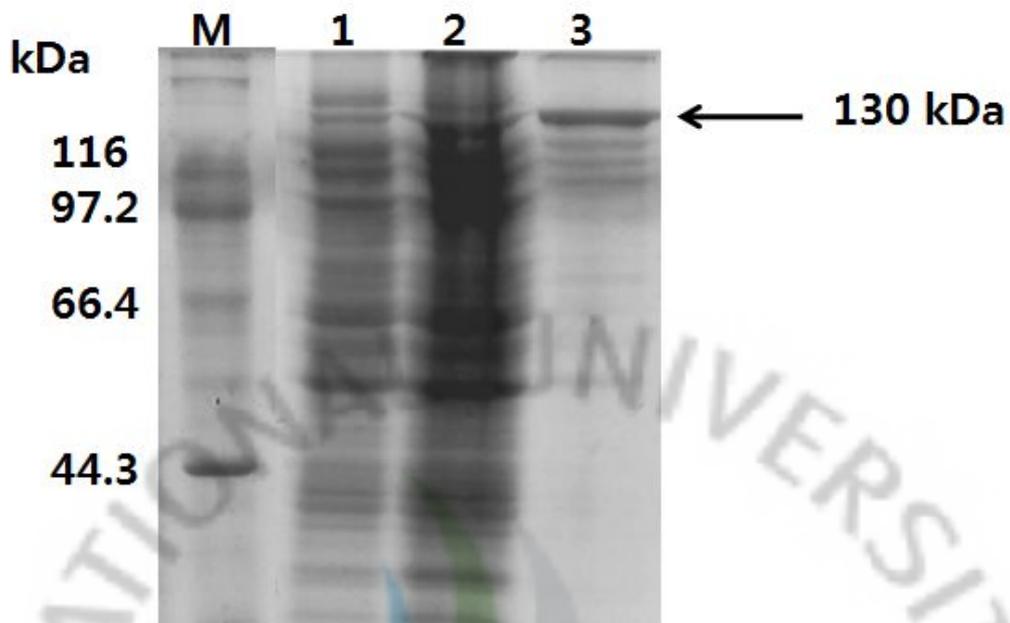


그림 8. AgaY2 SDS-PAGE

M: Protein marker

Lane1 : Before induction of E. coli BL21

Lane2 : After induction with 10 mM IPTG at 10 °C for 15 hours

Lane3 : Purified recombinant agaY2

4. Enzyme assay

4-1. 최적온도

정제된 agarase의 최적 반응 온도를 확인하기 위해 다양한 온도범위에서 효소 활성을 측정한 결과는 (그림 11.) 에 나타내었다. 1% agarose 과 agarase를 희석하여 40℃에서 70℃까지 5℃씩 간격으로 15분 동안 반응 후 DNS 법으로 활성을 측정하였다. 40℃부터 55℃까지 활성이 계속 증가하였고 55℃에서 가장 좋은 활성을 나타내었으며, 60℃부터는 점차 활성이 감소하여 70℃에서는 아무런 활성도 갖지 않는 것으로 나타났다.

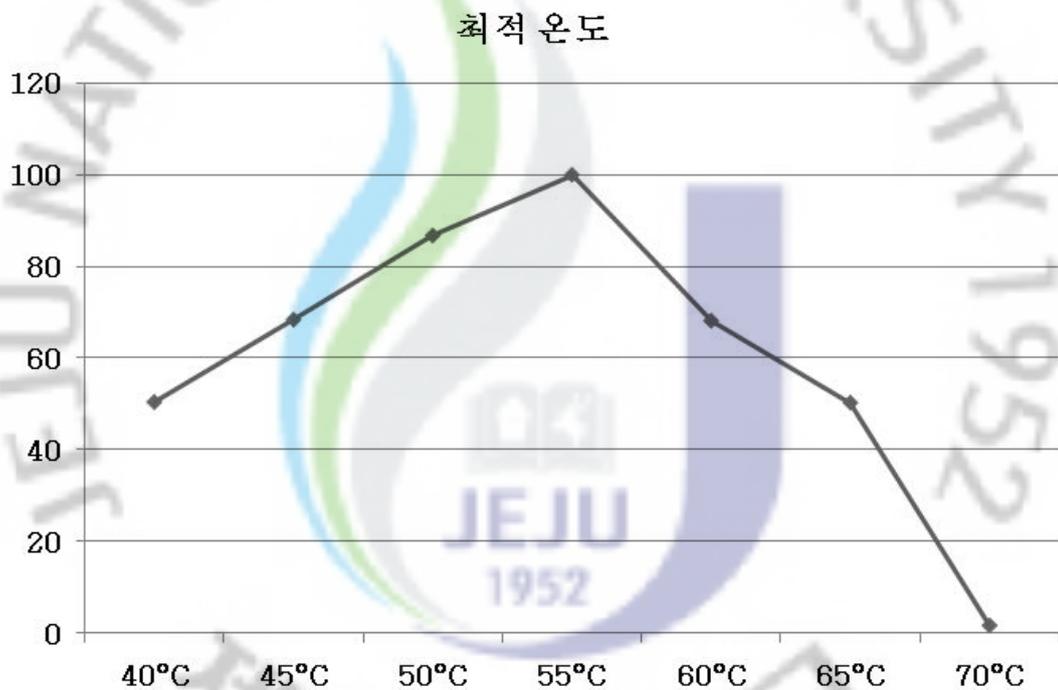


그림 9. agaY1 의 온도에 따른 상대 활성을 나타낸 그래프

4-2. 열안정성

AgaY1에 대한 열 안정성을 알아보기 위해 효소를 온도별로 30, 60, 90, 120분씩 놓아둔 후 그 활성을 측정한 결과 45°C 와 50°C에서는 30분부터 급격한 활성 저하를 보였고, 40°C에서는 60분 까지 안정 하였으나, 90 분부터 활성이 급격히 떨어지며 120분까지는 조금 활성이 남아있는 것을 볼 수 있었다.

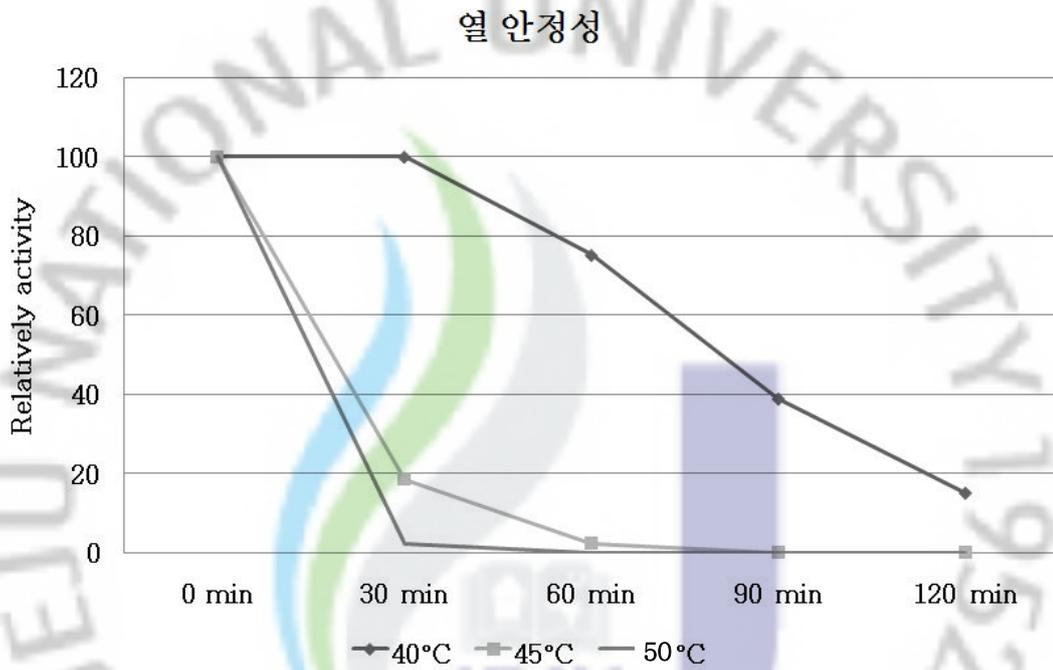


그림 10. AgaY1 의 열 안정성을 나타낸 그래프

4-3. 최적 pH

AgaY1의 최적 pH 및 pH에 따른 한천분해능을 확인하기 위하여, 한천분해능을 측정하기 위한 기질용액으로 50 mM acetic acid buffer (pH 4.5-6.5), 50 mM phosphate buffer (pH 7-9)를 이용하였다. AgaY1의 최적 pH 및 pH에 따른 한천분해능의 측정은 agaY1 10 μ l를 agarose 1%(w/v)가 포함되어 있는 10mM Tris Cl buffer 95 μ l와 각각 pH를 조절한 pH용액 95 μ l를 혼합한 기질 용액에 첨가하여 42°C에서 15분간 반응시킴으로써 한천분해능을 측정하였으며, 그 결과를 (그림 12.)에 나타내었다. 그림 7에 나타낸 바와 같이, agaY1의 활성은 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 나타내었다. pH 5와 pH 9에서 가장 낮은 활성을 보였다.

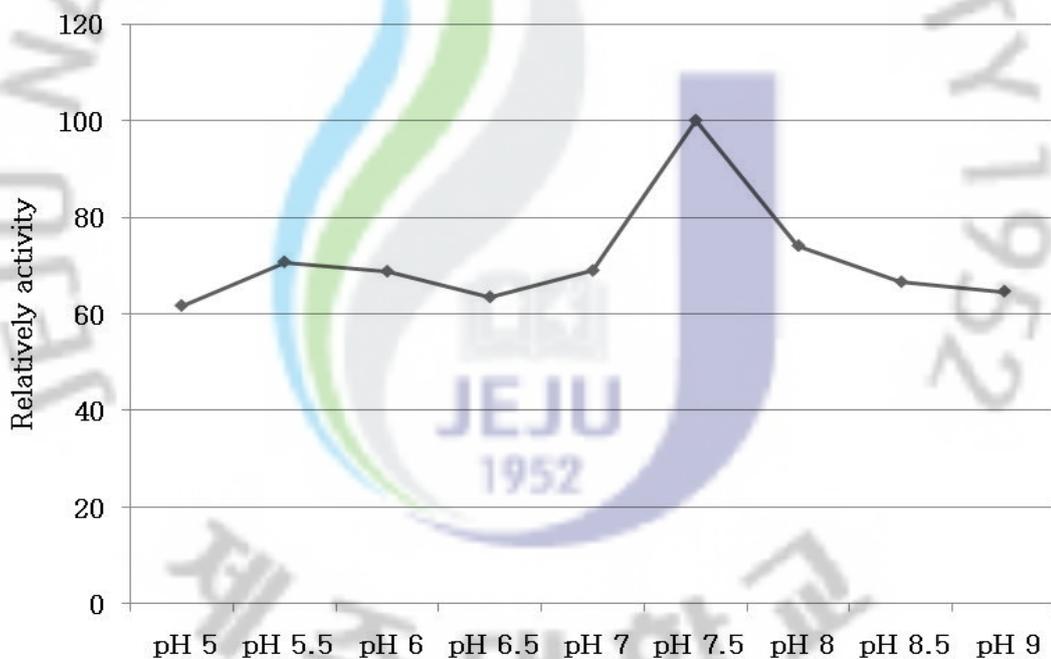


그림 11. pH에 따른 agaY1의 상대 활성 변화를 나타낸 그래프

4-4. 금속이온 효과

AgaY1의 금속이온에 따른 한천분해능을 확인하기 위하여, CaCl_2 , CuSO_4 , EDTA, FeSO_4 , KCl, MgSO_4 , MnCl_2 , ZnSO_4 및 NaCl를 사용하였다. Agarose 1%(w/v)가 포함되어 있는 10mM Tris Cl buffer(pH 6.5)에 각각의 금속을 2 mM의 농도로 포함하고 있는 기질용액 190 μl 에 agaY1 10 μl 를 첨가하여 43°C에서 반응시켜 한천분해능을 측정하였으며, 그 결과를 (그림 14.)에 나타내었다. 그림 13. 에 나타낸 바와 같이, Cu^{2+} 를 첨가하였을 때는 agaY1의 한천 분해능이 전혀 관찰되지 않았다. Mn^{2+} , Zn^{2+} 그리고 EDTA를 첨가 하였을 때는 agaY1의 활성이 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. Mg^{2+} 와 Ca^{2+} 를 첨가하였을 때는 agaY1 활성에 있어서 큰 변화 없이 Ca^{2+} 첨가 시 조금 증가된 결과를 나타내었다. NaCl, K^+ Fe^{2+} 를 2 mM로 첨가하였을 때, 유의적으로 agaY1의 활성이 증가되는 결과를 나타내었다. Na^+ 과 K^+ 은 34 %의 활성 증가를 나타내었으며, FeSO_4 를 2 mM로 첨가하였을 때, 가장 높은 활성을 보였으며, 금속이온을 처리하지 않은 실험구보다 41%의 활성증가를 나타내었다. 최적 조건 하에서의 agaY1의 specific activity는 83 Unit/ μg 으로 나타났다.

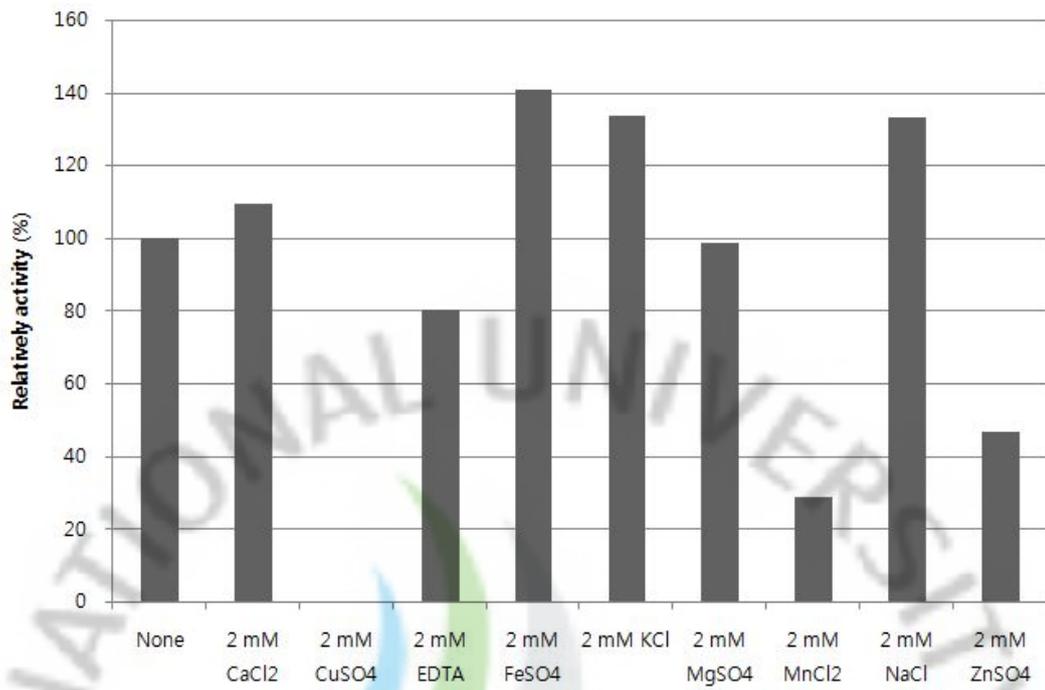


그림 12. 금속이온에 따른 agaY1의 활성 변화

5. 정제된 agarase의 분해 패턴 분석

정제된 agarase의 분해 패턴을 TLC를 이용하여 분석하였다. AgaY1과 1%의 agarose 그리고 1%의 neoagarohexanitol과 각각 반응 시킨 후 TLC를 수행하였다. AgaY1은 (그림 15.)에서 보이는 것과 같이 10분 반응 시켰을 때, agarose를 분해하여 neoagarohexaose와 neoagarotetraose를 형성하였고, neoagarohexanitol을 agaY1과 반응 시켰을 때는 분해되지 않는 것을 관찰 할 수 있었다. AgaY2는 neoagarotetraose 그리고 neoagarohexanitol과 각각 반응 시킨 후 TLC를 수행하였다. neoagarotetraose와 agaY2를 반응 시켰을 때, 시간이 지남에 따라 neoagarotetraose의 양은 점차 줄어들면서 neoagarobiose를 형성하는 것이 관찰되었다. neoagarohexanitol과 agaY2를 반응 시켰을 때는 neoagarohexanitol이 분해되면서 neoagarobiose와 neoagarotetraose를 형성하는 것이 관찰되었고, neoagarotetraose와 neoagarohexobitol과 반응 시켰을 때 모두 neoagarobiose와 neoagarotetraose사이에 다른 밴드가 형성되는 것을 관찰 할 수 있었다.

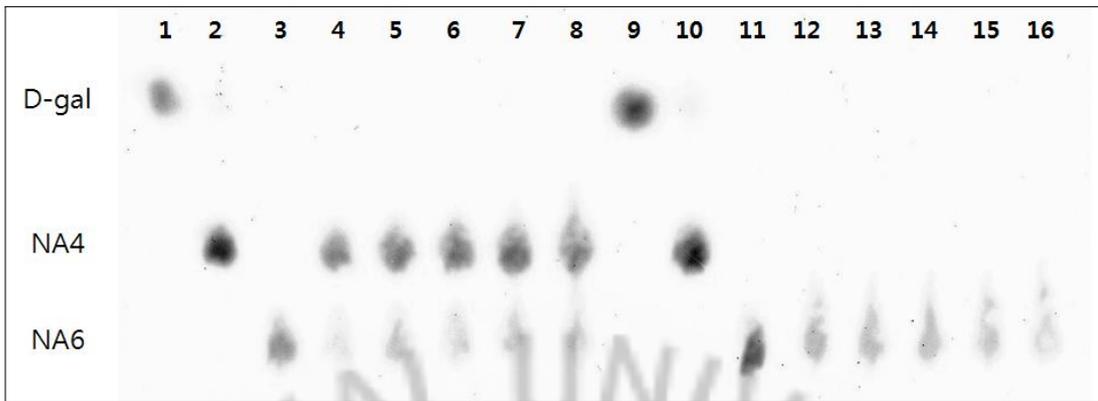


그림 13. AgaY1의 분해산물 TLC

Lane 1, 9 : D-galactose

Lane 2, 10 : NA2 and NA4

Lane 3, 11 : NA6

lane 4-8 : agarose + agaY1 (10, 20, 30, 60 min)

lane 12-16 : NA6 + agaY1 (10, 20, 30, 60 min)

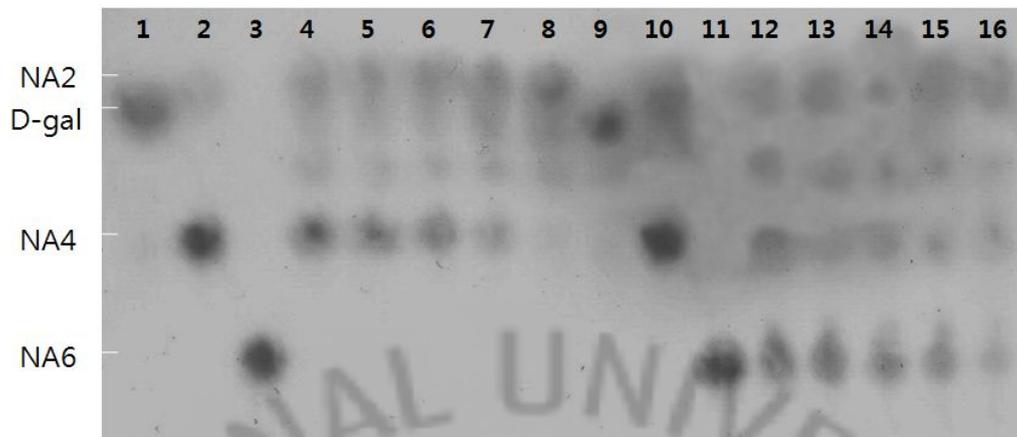


그림 14. AgaY2의 분해산물 TLC

Lane 1, 9 : D-galactose

Lane 2, 10 : NA2 and NA4

Lane 3, 11 : NA6

lane 4-8 : NA4 + agaY2 (10, 20, 30, 60 min)

lane 12-16 : NA6 + agaY2 (10, 20, 30, 60 min)

IV.고 찰

제주 연안의 해수로부터 한천분해활성을 보이는 균주를 분리 하였으며, 16S rRNA서열을 분석한 결과 *Saccharophagus degradans*와 99% 유사성을 보이는 *Saccharophagus* 속으로 밝혀졌다. 이 균주를 *Saccharophagus* sp. AG21로 명명 하였다. *Saccharophagus degradans* 2-40의 agarase 유전자 서열을 바탕으로 primer를 제작하고 LA-PCR을 하여 *Saccharophagus* sp. AG21로부터 agarase를 coding 하는 유전자인 agaY1과 agaY2를 cloning하였다. AgaY1과 agaY2는 *Saccharophagus degradans* 2-40의 agarase aga16B, aga50A 와 각각 88%와 96%의 상동성을 나타내었다. agaY1과 유사한 *saccharophagus degradans* 2-40과 *Microbulbifer agarilyticus*의 β -agarase I과 가장 높은 유사도를 나타내었고, 세 가지의 효소모두 GH 16 domain과 두 개의 carbohydrate binding module을 가지고 있었다. AgaY2와 가장 높은 유사도를 보인 *saccharophagus degradans* 2-40의 aga50A와 *Pseudoalteromonas atlantica* T6C의 agarase(unpublished, accession number : ABG41155)와 가장 높은 유사도를 보였으며, 세 가지의 agarase모두 GH-42 domain을 가지고 있었다. AgaY1과 agaY2는 모두 *Saccharophagus* sp. AG21로부터 발현되는 agarase로 두 효소간의 상동성을 비교하여 보았다. 두 효소간의 아미노산 서열은 약 12 %의 상동성을 보이는데 그쳐, 두 효소가의 확연한 차이를 보여, 효소의 기능과 역할 또한 다를 것으로 생각되었다. AgaY1과 agaY2를 각각 pET-16b와 pMAL-c2x expression vector에 cloning 하고 *E. coli* BL21에서 발현시키고 정제 하였다. 정제된 agaY1을 SDS-PAGE를 통하여 분자량을 확인 하였다. AgaY1은 pET-16 vector를 사용하여 histidine과 fusion시켜 발현시켜 약 71 kDa(his · taq 5 kDa+ agaY1 66 kDa)의 단백질을 정제 할 수 있었다. 발현시키기 전과 발현 시킨 후에 발현된 단백질이 확연하게 특이적 밴드로 나타난 것을 확인 할 수 있었으며, 정제된 단백질도 같은 크기의 단백질로 agaY1이 정제된 것을 확인 할 수 있었다. AgaY2 역시 SDS-PAGE를 통하여 maltose binding protein과 fusion된 130 kDa(matose binding protein 42.5+agaY2 88 kDa)의 agaY1 agarase가 정제된 것을 확인 할

수 있었다. 정제된 두가지의 agarase를 3,6-dinitrosalicylic acid method로 enzyme assay를 수행하였다. AgaY1은 3,6-dinitrosalicylic acid method에 enzyme assay에서 activity를 확인 할 수 있었다. 정제된 agaY1은 40℃부터 65℃ 까지 활성을 나타내었으며, 55℃에서 가장 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 가장 활성이 좋은 55℃에서는 열안정성이 낮게 나타났으며, 40℃에서 효소 활성이 120분까지 유지되는 것을 확인 할 수 있었다. agaY1은 pH 7.5에서 가장 좋은 활성을 보였으며, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ 등의 금속이온의 존재하에서는 유의적인 활성의 감소를 나타내었다. 특히 CuSO₄의 존재하에서는 아무런 효소활성이 나타나지 않았다. 일반적 효소 저해제인 EDTA의 존재 하에서는 약 20% 정도의 활성 감소를 보였다. 반면, NaCl과 KCl 그리고 FeSO₄의 존재 하에서는 30~40 % 정도의 활성이 증가되는 결과를 나타내었다. Thin layer chromatography를 이용한 반응 패턴 분석에서 agaY1의 neoagarotetraose 와 neoagarohexaose가 주요 생성물임을 확인 하였다. (Morrice *et al.*, 1983)는 β-agarase I은 주로 neoagarotetraose(NA4)를 생성하지만 neoagarohexaose(NA6)와 보다 큰 다당류 또한 조금씩 생성하고 보고 하였다. (Belas *et al.*,1983)는 β-agarase는 GH16, GH50, GH80 domain을 가지고 있다고 보고 하고 있다. AgaY1 또한 GH16 domain을 가지고 있으며, 이미 밝혀진 B-agarase I에서 볼 수 있는 2가지 type의 carbohydrate binding module을 가지고 있었다. AgaY1은 β-1,4-linkage를 자르고 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 생성하는 것으로 보이며, neoagarohexaose는 분해하지 못하였다. 이미 보고된 다른 β-agarase I과 같이 주로 neoagarotetraose를 형성하면서 부가적으로 neoagarohexaose도 형성하는 것으로 보아 β-agarase I으로 생각된다. 반면, agaY2는 일반적인 β-agarase가 갖는 GH 16, GH 50, GH 80 domain을 가지고 있지 않았다. AgaY2를 1% agarose 와 1% agar를 분해 할수 있는지 enzyme assay를 수행하였지만 아무런 활성도 나타나지 않았다. (Morrice *et al.*, 1983)는 β-agarase II는 β-agarase에 의해 이미 잘려진 neoagarohexaose와 neoagarotetraose를 분해하여 neoagarobiose를 형성한다고 보고하고 있다(Sugano *et al.*, 1994). AgaY2를 neoagarotetraose, neoagarohexaose 그리고 agar와 반응 하여 TLC를 통하여 당분해 패턴을 확인한 결과 agaY2는 agar를 분해하지는 못하였지만 neoagarotetraose와

neogaroheptaose와 반응시켰을 때, 시간이 지남에 따라 neogaroetraose와 neogaroheptaose의 양이 점차 줄어 들면서 보다 작은 단위의 당이 생성됨을 관찰할 수 있었다. 최종적으로는 neogaroetraose와 neogaroheptaose는 완전히 분해되어 neogarobiose가 형성된 것을 관찰할 수 있었다. AgaY2에 의하여 neogaroheptaose를 분해하였을 때, neogaroetraose와 neogarobiose가 모두 형성되면서 결국 neogarobiose가 주생성물로 생성되는 것을 알 수 있었다. agaY2는 GH42 domain을 가지고 있었다. GH-42 domain은 β -galactosidase속의 group으로 lactose 분해능을 가지고 있는지 lactose를 분해해 보았으나 분해되지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로, agaY1은 β -agarase II일 것으로 보인다. β -agarase I에 대한 연구는 많이 이루어져 있으나, β -agarase II에 대한 보고는 아직 많지 않다. 현재 보고된 β -agarase II는 *Pseudomonas atlantica*(Morrice *et al.*, 1983), *agarivorans* JAMB-A11 (Murphy, 1998), *Vibrio* AP-2(Aoki *et al.*, 1990), *Vibrio* JT0107(Morrice, 1993) 등에서 밝혀진 정도이다. 지금까지 보고된 β -agarase II는 아가로를 분해할 뿐 아니라, neogaroetraose의 β -1,4 결합을 절단함으로써 neogarobiose를 생성한다고 밝히고 있다. 하지만 이 논문에서 발현과 정제가 이루어진 agaY2는 기존에 보고된 β -agarase II와는 달리 agar와 agarose를 분해하지는 못하였으며, neogaroetraose와 neogaroheptaose를 분해하여 neogarobiose를 형성하였다. 이는 기존에 보고된 agarase와 달리 새로운 형태의 β -agarase로 사료된다. Neogarobiose는 보습효과, 미백효과 (Kobayashi *et al.*, 1997) 등에 뛰어난 활성을 갖는다고 보고하고 있다. 현재까지 β -agarase II에 대한 연구가 미비하기 때문에, 이 연구에서 밝혀진 agaY2는 agar를 분해할 수는 없지만 β -agarase II type의 보습효과와 미용효과에 효능이 있는 neogarobiose를 생성하는 효소로서 화장품산업에의 응용이 기대된다.

V. 요약문

한천은 홍조류의 세포벽을 구성하는 구성물질로 아가로스와 아가로 펙틴으로 구성되어 있다. Agarose는 1→3결합으로 연결된 β -D-galactose 와 1→4결합으로 연결된 3,6-anhydro- α -L-galactose가 반복하여 존재하는 linear chain이다. 이러한 한천의 미생물에 의한 분해는 agarase에 의하여 일어나는데, agarase는 주로 해양 세균에서 발견되어지며, agarase는 반응 기작에 기초하여 α -agarase와 β -agarase라는 두 가지의 그룹으로 분류 되며, α -1,3-linkages를 가수 분해 하여 agarooligosaccharide를 만드는 효소를 α -agarase, β -1,4 linkages 를 가수분해 하여 neoagarooligosaccharide를 만드는 효소는 β -agarse라고 불리며, β -agarase는 다시 β -agarase I, β -agarase II로 나뉜다. 이 논문에서는 *Sachharophagus* sp. AG21로부터 두 가지의 agarase agaY1과 agaY2를 cloning 하고 E.coli BL21에서 발현시켰다. 제주 해안에서 채집된 해수로부터 한천분해활성을 나타내는 균주를 분리하였고, 16S rRNA 분석을 통하여 *Saccharophagus* sp. AG21로 명명하였다. AG21로부터 두 개의 agarase 유전자인 agaY1과 agaY2의 서열분석을 하여 전체 서열을 밝혔다. agaY1은 1908 bp의 nucelotide로 636개의 아미노산을 암호화하며, 69 kDa의 분자량을 가지고 있으며 pH 4.2의 등전점을 가지고 있었다. 이미 보고된 β -agarase I효소들에서 보고된 glycoside hydrolase family 16 domain을 가지고 있으며, 2개의 carbohydrate binding module을 가지고 있었다. agaY2는 전체 길이 2334 base pair의 necleotide로 이루어져 있으며, 778개의 아미노산을 암호화하고 있었다. 분자량은 88 kDa로 pH 5.2의 등전점을 가지고 있었다. 두 개의 agarase 유전자인 agaY1과 agaY를 각각 pET-16b와 pMAL vector에 cloning 하고 *E. coli* BL21의 발현 시스템을 이용하여 재조합 단백질을 유도 하고, 정제하였다. 정제된 재조합 agaY1은 agar를 분해하여 neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 생성하여, 서열분석에서 밝혀진 β -agarase I의 특성과 일치하는 결과를 나타내었다. AgaY2는 다른 β -agarse II 타입의 보고된 효소들과는 달리 agar와 agarose를 분해 할 수 없었으나, neoagarotetraose와 neoagarohexaose를 가수 분해 하여 neoagarobiose를 형성하

는 β -agarase II의 특성을 나타내었다. AgaY1의 agar분해 활성을 DNS법을 이용하여 측정하였다. AgaY1의 최적온도는 55℃이며, 40℃에서 45℃와 50℃보다 높은 열안정성을 나타내었다. 최적 pH는 7.5로 중성에서 가장 적합한 활성을 나타내었으며, Na^{2+} , K^{+} 이온의 존재 하에서 30% 이상의 활성이 증가되었고, Fe^{2+} 이온의 존재하에서는 40%이상의 활성이 증가되었다. 이러한 결과를 바탕으로 agaY1의 최적 조건하에서 sepecific activity를 분석한 결과 85 U/ug의 specific activity를 나타내었다.



VI. 참고문헌

- Allouch J., Jam M., Helbert W., Barbeyron T., Kloareg B., Henrissat B., Czjzek M. (2003) The three-dimensional structures of two β -agarases. *J. Biol. Chem.* 278(47):47171- 47180
- Aoki T., Araki T., Kitamikado M. (1990) Purification and characterization of a novel β -agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur J Biochem* 187(2):461-465
- Araki C. (1937) Acetylation of agar like substance of *Gelidium amansii*. *J Chem Soc Japan* 58:1338-1350
- Belas R. (1989) Sequence Analysis of the *agrA* gene encoding β -agarase from *Pseudomonas atlantica*. *J. Bacteriol* 171(1), 602-605
- Belas R., Bartlett D., and Silverman M. (1988) Cloning and gene replacement mutagenesis of a *Pseudomonas atlantica* Agarase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(1), 30-37
- Chen H. and Yan X. (2005) Antioxidant activities of agaro-oligosaccharides with different degrees of polymerization in cell-based system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1722:103-111.
- Day, D. F., and W. Yaphe. (1977) Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of neoagarobiose hydrolase and *p*-nitrophenyl α -galactoside hydrolase. *Can. J. Microbiol.* 21:1512-1518
- Duckworth M. and Yaphe. W. (1970). Thin-layer chromatographic analysis of enzyme hydrolysates of agar. *J chromatogr* 49:482-7.
- Duckworth M. and Yaphe W. (1971) Structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr Res* 16:189-197
- Groleau D., and Yaphe W. (1977) Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of β -neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* 23:672-679
- Ha J., Kim G., Kim S., Oh T., Yu J., Kong I. (1997) Beta-Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: purification of the recombinant enzyme from

- Escherichia coli* and the effects of salt on its activity. *Biotechnol Appl Biochem* 26:1-6
- Hassairi I., Amar R. Ben., Nonus M., and B. B. Gupta. (2001) Production and separation of alpha-agarase from *Altermonas agarlyticus* strain GJ1B. *Bioresour Technol* 79:47-51.
- Hong J., Lee J., Choi H., Hur S. and Kong J. (2000) Antibacterial Activity of agarooligosaccharides produced by B-agarase from *Bacillus cereus* ASK 202. *J. Fd Hyg. Safety* 15(4):277-281
- Kim B. J., Kim H. J., Ha S. D., Hwang S. H., Byun D. S., Lee T. H., Kong J. Y. (1999) Purification and characterization of b-agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Biotechnol Lett* 21:1011-11
- Kato I. (2000) Antioxidative and antitumorigenic properties of agaro-oligosaccharide. *Bio Industry* 17, 13-19.
- Kobayashi R., Takisada, M., Suzuki, T., Kirimura, K., and Usami, S. (1997) Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 162-163.
- Kono T. and Hidaka H. (1989) Properties and production of neoagarooligosaccharide. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 63, 1126-1129.
- Lee D, Park G., Kim N Y., Lee E., Jang M. K., Shin Y. G., Park G., Kim T., Lee J., Lee J., Kim S., Lee S. (2006) Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50 β -agarase from a marine *Agarivorans* isolate. *Biotechnol Lett.* 28:1925-1932
- Miller G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *anal. chem.* 31:426-428
- Morrice L. M., McLean M. W., Long W. F., and Williamson F. B. (1983) Beta-agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Substrate specificities. *Eur J Biochem* 137:149-154.
- Morrice L. M., M. W. McLean, Long W. F. , and Williamson F. B. (1983) Porphyran primary structure. An investigation using beta-agarase I from

- Pseudomonas atlantica* and ^{13}C -NMR spectroscopy. *Eur J Biochem* 133:673-684.
- Morrice L. M., McLean M. W., Williamson F. B., and Long W. F. (1983) beta-agarases I and II from *Pseudomonas atlantica*. Purifications and some properties. *Eur J Biochem* 135:553-558.
- Murphy K. C. (1998) Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180:2063-71.
- Ohta Y., Nogi Y., Miyazaki M., Li Z., Hatada Y., Ito S., Horikoshi K. (2004) Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable beta-agarase from the novel marine isolate, JAMBA94. *Biosci Biotechnol Biochem* 68:1073-1081
- Ohta, Y., Hatada Y., Ito S., and Horikoshi K. (2005) High-level expression of a neoagarobiose-producing beta-agarase gene from *Agarivorans* sp. JAMB-A11 in *Bacillus subtilis* and enzymic properties of the recombinant enzyme. *Biotechnol Appl Biochem* 41:183-91.
- Ohta, Y., Y. Hatada, Y. Nogi, Z. Li, S. Ito, and K. Horikoshi. (2004) expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- 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* 50:212-6.
- Potin P., Richard C., Rochas C., Kloareg B. (1993) Purification and characterization of alpha-agarase from *Alteromonas agaralyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B. *Eur J Biochem* 21:599-607
- Schroeder D., Jaffer M., Coyne V. (2003) Investigation of the role of a beta(1-4) agarase produced by *Pseudoalteromonas gracilis* B9 in eliciting disease symptoms in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Microbiology* 149:2919-2929

Sugano, Y., Matsumoto, T., and Noma, M. (1994) Sequence analysis of the *agaB* gene encoding a new β -agarase from *vibrio* sp. strain JT0107. *Biochem Biophys acta* 17:105-108

Yoshizawa, Y., A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui and Kaminogawa. S. (1995) Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structurefunction relationships and improved solubility. *Biosci. Biotech. Bioch.* 59, 1933-1939.

한국해양연구소. 1998. 한국천해 경성저질에서의 백화현상에 대한 연구. BSPE97667-00-1088-7



감사의 글

지난 2년간의 석사 과정을 무사히 마칠 수 있도록 많은 것을 가르쳐주시고 도움을 주셨던 고마운 분들께 감사의 말씀을 전하고 싶습니다.

우선 항상 자신감을 불어넣어주시고 저를 믿고 이끌어 주셨고 이 논문이 완성되기 까지 부족한 저에게 한없는 가르침과 깨달음을 주신 이제희 지도 교수님께 깊이 감사드립니다. 또한 심사과정을 통하여 부족한 논문을 세심하게 보완 수정 해주신 허문수 교수님, 정광선 (주)스킨큐어 이사님께 감사드립니다.

학부시절부터 여러 가지로 좋은 가르침을 주셨던 송춘복 교수님, 전유진 교수님과 여인규 교수님께 감사드립니다.

항상 가족같이 아껴주고, 뭐든지 같이 하고 도와준 철홍형, 실험에 대해서 같이 토론해주고 항상 옆에서 도와주며, 논문 편집에도 많은 도움을 주고 충고해준 마하나마, 차밀라니와 같은 실험실 가족인 완창, 나둔, 유철이, 숙경이, 영화, 현재, 성도와 졸업한 경임이에게도 고맙습니다. 그리고 같이 하며 옆에서 도와주고, 같이 고민해준 우리 동기 윤범, 석천, 성명, 민석, 봉근이와 곁에는 없지만 우리 동기 현식에게도 깊은 감사를 전하며, 언제나 관심을 가져주신 현식이 아버지, 어머니께도 감사드립니다. 그리고 어류분자생리학 실험실, 해양자원공학 실험실, 해양미생물실험실, 어류유전육종학실험실 선배님들과 후배님들께 감사의 말을 드립니다. 그리고 2년의 석사 과정동안 열심히 하라고 뒷바라지 해주신 아버지, 어머니 고맙고 사랑합니다.