

한천분해효소를 생산하는 해양세균 *Thalassomonas* sp. SL-5의 분리 및 특성

이동근 · 김남영 · 장민경 · 이옥희 · 이상현*

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

Received September 19, 2006 / Accepted October 30, 2006

Isolation and characterization of a marine bacterium *Thalassomonas* sp. SL-5 producing β -agarase. Dong-Geun Lee, Nam-Young Kim, Min-Kyung Jang, Ok Hee Lee and Sang-Hyeon Lee*. *Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea* – A novel agar-degrading bacterium SL-5 was isolated from seashore of Homigot at Kyung-Buk province, and cultured in marine broth 2216 media. The bacterium SL-5 was identified as *Thalassomonas* genus by 16S rDNA sequencing with 96% identity. Growth rate was faster at 27°C than at 37°C and agarase was produced as growth-related. The optimum pH of the enzyme activity was 7.0 and the optimum temperature for the reaction was 40°C. Although the enzyme had no thermostability, the enzyme activity was remained over 80% at 60°C. The enzyme hydrolyzed neoagarohexaose to yield neoagarobiose as the main product, indicating that the enzyme is β -agarase. Thus, the enzyme would be useful for the industrial production of neoagarobiose.

Key words – β -agarase, marine, *Thalassomonas* sp.

서 론

한천(agar)은 galactose와 galactopyranose의 중합체이며, agarose와 agaropectin으로 구성되어 있는 다당류로 홍조류의 세포벽에 존재한다[7]. 한천은 오래 전부터 젤리 등을 생산하는 식품산업과 다이어트 식품으로 널리 이용되고 있으며[5] 미생물배지와 분자생물학 실험의 중요 재료로 이용되고 있다. 국내에서 한천은 제주도 및 남해안 일대에서 다량 생산되고 있으며 품질도 우수한 것으로 알려져 있으나, 1차 가공품 형태의 저부가가치 제품형태로 대부분의 생산분을 일본으로 수출하고 있기 때문에 이들의 고부가가치화는 수산 경제 발전을 위해 필수적이라 할 것이다.

한천의 분해산물은 생체에 다양한 기능을 나타내는 고부가가치 재료로서의 활용 가능성이 높고 신약개발에도 중요한 것으로 보고되고 있다[2,12,14,21]. 이러한 기능성을리고당 생산을 위한 한천의 분해 방법은 산가수분해[11] 및 한천분해효소(agarase)를 이용하는 효소적 방법이 있다. 산가수분해법의 경우 올리고당의 기능성 및 안정성에 문제가 있어 한천분해효소법이 더 유용한 것으로 알려져 있다[17]. 따라서 한천분해효소 생성균주를 찾기 위한 여러 연구들이 활발히 진행되어 왔다[1,19,22].

한천분해효소는 α -agarase와 β -agarase의 2종류가 있는데 β -agarase를 이용한 한천의 분해산물인 neoagarooligosaccharide는 세균성장 억제, 전분노화 방지, 대식세포 활성화, 보습효과 그리고 미백효과 등 많은 유용한 기능을 나타내며

이들을 활용한 제품은 부가가치가 매우 높은 것으로 알려져 왔다[2,21]. 또한 한천에서 α -agarase를 이용하여 생성된 agarooligosaccharide 역시 항산화 효과와 항암활성 등을 가지는 것으로 알려져 있다[14].

본 연구에서는 한천의 고부가가치화를 위하여 한천분해효소를 생산하는 신규의 해양성세균을 호미곶 연안해역에서 분리하였고 이 해양 세균의 분류학적 위치와 성장 및 한천분해 효소의 생산 최적조건 등을 검토하여 산업적 응용의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

분리용 시료 및 한천분해 균주의 분리 배양

경북 포항의 호미곶 연안 해수를 시료액으로 사용하였다. 시료액을 2% NaCl이 첨가된 멸균희석수를 이용하여 연속적으로 희석하였고 원액과 희석수 100 μ l 씩을 배지위에 도말하였다. 시료액을 한천을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 한 무기염 한천배지와[15], 일반적인 해양세균 분리 및 증균용 배지로 사용되는 배지로 Difco (Detroit, USA)에서 구입한 marine broth 2216 (Bacto peptone 5.00 g, Bacto yeast extract 1.00 g, Fe(III) citrate 0.10 g, NaCl 19.45 g, MgCl₂ (dried) 5.90 g, Na₂SO₄ 3.24 g, CaCl₂ 1.80 g, KCl 0.55 g, Na₂CO₃ 0.16 g, KBr 0.08 g, SrCl₂ 34.00 mg, H₃BO₃ 22.00 mg, Na-silicate 4.00 mg, NaF 2.40 mg, (NH₄)NO₃ 1.60 mg, Na₂HPO₄ 8.00 mg, Distilled water 1.0 l) 고체배지에 도말한 후 25°C에서 배양하면서 한천분해활성에 의한 한천분해로 한천 평판 배지를 함몰시키는 균주를 선별하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

한천분해 균주의 선정 및 동정

한천분해능을 가진 분리 균주들을 무기염 한천배지 및 marine broth 2216 한천배지에서 배양하면서 분해능이 가장 우수한 SL-5 균주를 선별하였다. 분해균주의 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 Blast를 사용하여 공시균주와 유사도를 검토하였으며, 윈도우 버전의 Clustal 프로그램 (ClustalX ver. 1.8)을 이용하여 다중염기배열 (multiple alignment)을 수행한 후 neighbor-joining method와 bootstrap method (n=1000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

한천분해 균주의 생육 및 조효소액 제조

Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 250 ml 삼각플라스크에 순수분리한 SL-5 균주를 접종한 후 shaking incubator를 이용하여 27°C, 250 rpm에서 진탕 배양하였다. 생육 양상을 경시적으로 관찰하면서 한천분해 효소의 활성을 측정하였다. 이후 3일 배양한 후 배양액을 원심분리하여 (12000 ×g, 4°C, 10 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

한천분해 효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogy-Nelson법으로 실시하였다[15]. 조효소 반응용액 0.5 ml에 2.0 ml의 Somogy 시약 (10% CuSO₄ 80 ml, 1N NaOH 100 ml, Na₂SO₄ 180 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 71 g, C₄H₄O₆KNa · 4H₂O 40 g / D.W. 1 l)을 첨가하여 반응을 중지시키고 10분간 끓였다. 실온으로 냉각된 용액에 arseno-molybdate 시약을 첨가하고 14000 ×g에서 5분간 원심분리한 상층액의 흡광도를 550 nm에서 측정하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1 μmole의 galactose를 생산해 내는 효소의 양을 1 unit로 정의하였고 galactose를 이용하여 표준적정곡선을 작성하였다.

생육온도 및 한천농도에 따른 분리균주의 생육 및 한천분해 활성

한천의 농도를 0, 0.1, 0.2, 0.3%로 달리한 5 ml의 marine broth 2216 배지를 50 ml 용량의 시험관을 이용하여 배양하면서 (27°C, 37°C, 250 rpm) 생육양상과 한천분해효소 활성을 측정하였다.

온도에 따른 한천분해 효소의 활성

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해능의 안정성을 실시하였다. 표준 기질용액으로는 0.2%의 agar(w/v)가 포함된 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 증탕가열한 후 20 ~ 80°C의 온도별로 냉각하였다. 완충용액 1.0 ml에 조효소액 0.5 ml을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

pH에 따른 한천분해 효소의 활성

최적 pH와 pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 100 mM sodium acetate 완충용액 (pH 3.1-4.9), 20 mM sodium phosphate 완충용액 (pH 4.4-7.8), 50 mM TAPS 완충용액 (pH 7.8-9.0)을 이용하였다. 한천이 포함된 (0.2% w/v) 완충용액을 증탕가열한 후 40°C까지 냉각 후 반응용조를 이용하여 온도를 유지하면서 완충용액 1.0 ml에 조효소액 0.5 ml을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

한천올리고당 가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

효소액을 이용한 neoagarohexaose의 분해산물을 TLC를 이용하여 분석하였다. 조효소액과 neoagarohexaose (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에서 40°C, 48시간 반응시킨 후, silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 행하였다 [6,8]. TLC 분석은 n-butanol/acetic acid/H₂O (2:1:1, by vol.)를 이용하여 전개시켰고, 10% (v/v) H₂SO₄로 가시화시켰다. 표준물질로 neoagarohexaose (Sigma)와 neoagarotetraose (V-Labs Inc., St. Covington, LA, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

한천분해균주의 분리 및 배양

호미곶 연안 해역의 해수 시료에서 한천분해활성에 의한 한천분해로 한천무기염 평판 배지를 함몰시키는 한천 분해능이 우수한 균주를 선별하였다. 총 3200여 개의 한천분해 균주 중에서 한천분해 활성이 뛰어난 균주 10개를 선별하였으며, 함몰이 일어난 부위의 균을 백금이를 이용하여 무기염 배지로 적절히 희석한 후에 무기염 한천배지에 도말하는 것을 3차례 이상 반복한 후 균주들을 순수분리하였다. 분리한 균주들을 0.2% (w/v)의 한천을 포함한 marine broth 2216 한천배지에서 25°C, 250 rpm에서 60시간 진탕 배양한 후 배양액의 환원당값을 측정하여 선별된 균주의 한천분해능을 검토하였으며 가장 분해능이 우수한 균주인 SL-5를 최종적으로 선정하였다. 분리한 균주는 NaCl을 성장에 필요로 하여 (data not shown) 해양성 균주로 확인되었다. 분리한 SL-5 균주가 나타내는 한천분해 양상을 Fig. 1에 나타내었다.

한천분해 균주의 동정

분리된 한천분해균 SL-5 균주의 16S rDNA 염기서열분석 결과 Gamma-Proteobacteria인 *Thalassomonas agarivorans*[10]와 가장 높은 유사도(96%)를 보였으므로(Fig. 2) *Thalassomonas* sp. SL-5로 명명하였다. 그 외 유사도가 높은 서열을 가지는 세균은 alpha-agarase를 생산하는 *Thalassomonas* 속 세균



Fig. 1. Agar degrading activity of the isolated strain on a marine broth 2216 agar medium.

[14]과 *Colwellia* 속 세균[3] 등이었다. 분리 균주와 가장 유사한 *Thalassomonas agarivorans*는 α-agarase를 생산하는 것으로 보고되었는데[14], 이 효소는 neoagarbiose, neoagarotetraose, neoagarohexaose를 분해하여 3,6 anhydro-L-galactose와 neoagartriose, neoagaropentose 등의 neoagarooligosaccharide를 만드는 것으로 보고되고 있고[4] 공업적 생산을 위한 연구[9]도 보고되어 있었다.

분리균주의 성장과 한천분해효소 생산

분리한 *Thalassomonas* sp. SL-5 균주를 50 ml 용량의 시험관을 이용하여 5 ml의 marine broth 2216 배지로 배양하였을 때 (27°C, 37°C, 250 rpm) 보이는 생육양상과 한천분해효소 활성을 Fig. 3에 나타내었다. 한천을 첨가하지 않아도 세균의 성장이 관찰되었지만 성장속도가 아주 느렸다 (Fig. 3a).

배지에 한천을 첨가하지 않아도 한천분해효소의 활성이 관찰되었지만 한천의 농도가 높아짐에 따라 효소활성도 높아졌으며 37°C에 비해 27°C에서 배양한 경우 효소활성이 더 높은 것으로 나타났다 (Fig. 3b). 한천분해활성/세포농도 (unit/l/OD₆₀₀)는 한천이 존재할 경우 배양 3일째에 가장 높은 수치를 나타냈으며 한천농도가 증가함에 따라 세균성장도 증가하였다. 하지만 0.2%와 0.3% 한천농도 사이에서 세균 성장과 한천분해활성은 오차범위 내에 있어 0.2%의 한천농도가 가장 효율적인 것으로 나타났다 (Fig.3). 따라서 이후의 실험에서는 0.2%의 한천을 첨가한 marine broth 2216 배지에서 3일간 배양한 배양액을 사용하였다.

250 ml 용량의 플라스크에 0.2%의 한천이 첨가된 50 ml의 marine broth 2216 배지에서 배양하였을 때 (27°C, 250 rpm) 보이는 생육양상과 한천분해효소 활성을 Fig. 4에 나타냈다. 성장양상과 한천분해활성은 앞의 시험관을 이용한 배양과는 많은 차이를 보였는데, 이는 아마 배양 환경의 차이에 의한 결과로 판단되어 진다. 한천분해활성은 세포농도에 비례하는 것으로 나타났으며 한천분해활성은 세균성장 속도가 감소됨에 따라 비율도 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 한천분해효소는 성장의존성 산물(growth-related product)로 판단하였다.

한천분해 효소의 활성과 온도

한천분해효소가 각 온도별로 보이는 상대활성을 Fig. 5에 나타냈다. 한천분해활성은 40°C에서 363 units/L로 최고치를 나타냈으며 30°C에서도 유사한 수치로 나타났다. 또한 40°C의 반온도에서 나타난 효소활성을 100%로 하였을 때 50°C에서 91%, 60°C에서 82%, 70°C에서 78%의 잔존활성을 나타

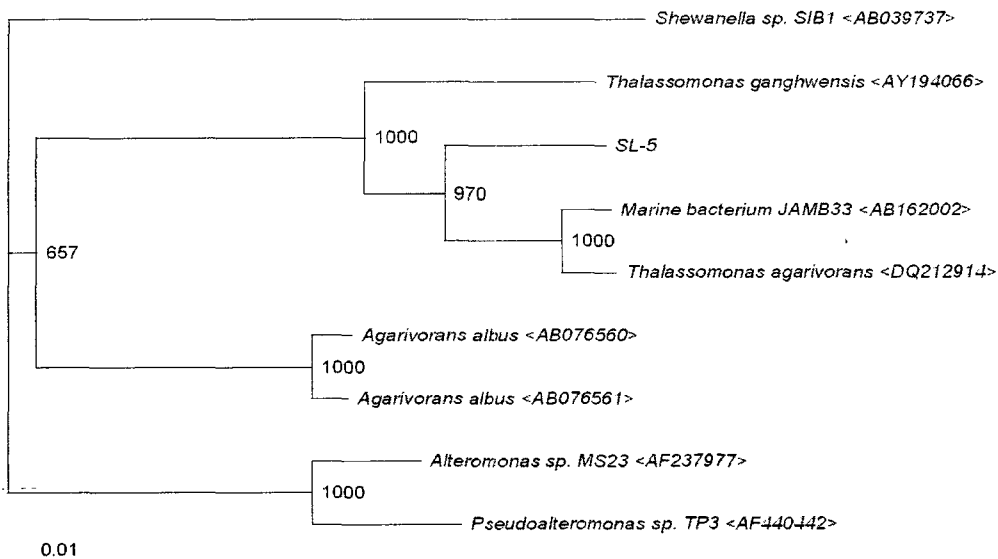


Fig. 2. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing with SL-5 with members of *Thalassomonas* sp. and related genera. The numbers at the branch node are bootstrap values and numbers in parenthesis are access numbers at NCBI.

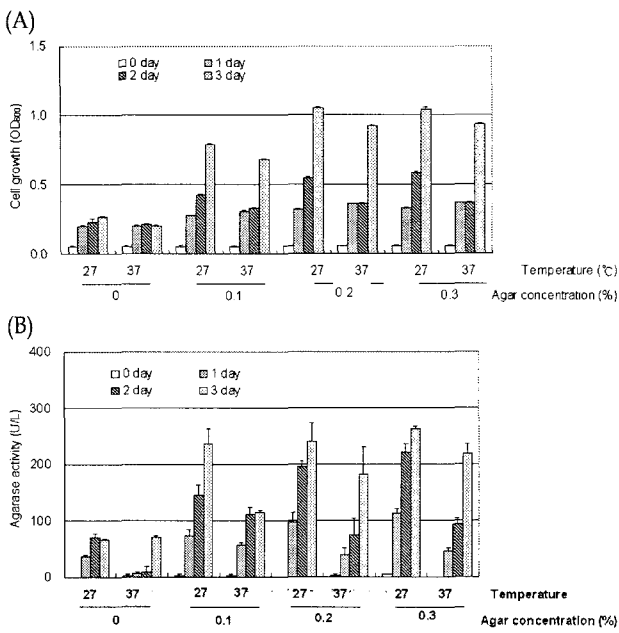


Fig. 3. Cell growth (A) and agarase activity (B) of *Thalassomonas* sp. SL-5 at different agar concentration (0, 0.1, 0.2, 0.3 %) and temperature (27°C and 37°C).

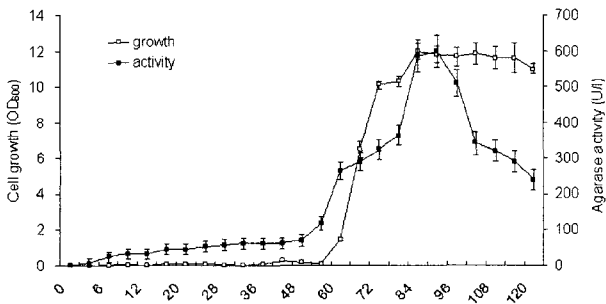


Fig. 4. Cell growth and agarase activity of *Thalassomonas* sp. SL-5 at 0.2% agar concentration (■ agarase activity [units/l], □ cell growth [OD₆₀₀]).

냈으며 80°C까지 66%의 활성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 5). 이러한 결과를 토대로 이 연구에서 얻어진 한천분해효소가 Vera 등[18]의 연구결과와는 달리 호열성 효소인 것으로 생각되었다. Fig. 6과 같이 70°C에 조효소액을 시간별로 노출시킨 후에 나타나는 활성을 보면 노출 15분 후에 76%, 30분 후에 54% 등 급격하게 활성이 떨어지는 것으로 나타나 본 효소가 내열성은 가지지는 않는 것으로 생각되어 진다.

pH에 따른 한천분해 효소의 활성

각 pH에서 보이는 한천분해효소의 활성을 Fig. 7에 나타냈다. 사용한 완충용액과 pH 중 최고의 활성을 나타내는 것은 20 mM sodium phosphate 완충용액에서 pH 7.0으로 나타났다. 이는 *Bacillus* sp. MK03의 pH 6.1 [18] 보다는 높고 *Vibrio* sp. JT0107의 pH 8.0 [17], *Bacillus cereus* ASK 202의 pH 7.8 [13], *Pseudomonas* sp. PT-5의 pH 8.5 [20] 보다는 낮

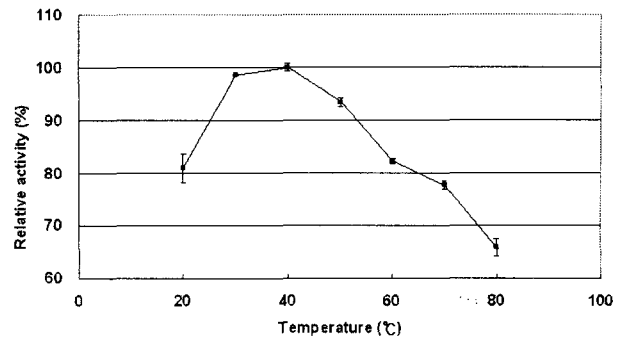


Fig. 5. Relation between agarase activity and reaction temperature.

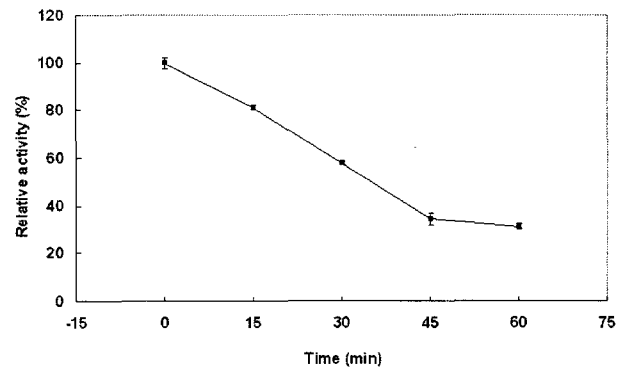


Fig. 6. Relation between agarase activity and exposure times (min) at 70°C.

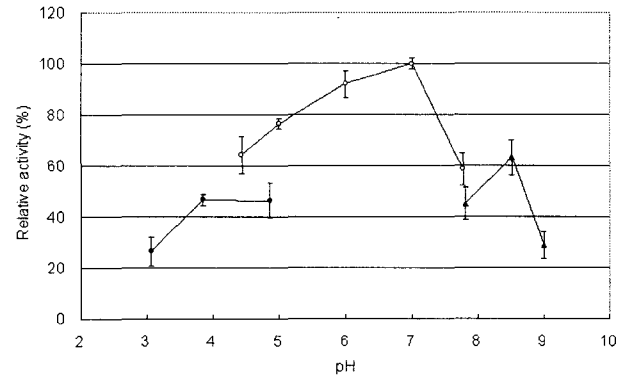


Fig. 7. Effect of pH on agarase activity. (● 100 mM sodium acetate, pH 3.6-5.0; ○ 20 mM sodium phosphate, pH 4.9-7.8; ▲ 50 mM Glycine NaOH, pH 7.8-10.0).

은 것이었다. 또한 SL-5가 생산하는 한천분해효소는 pH 6.0에서 90% 이상, pH 5.0에서 80% 정도가 유지되는 반면 pH 7.8에서는 60% 정도의 활성을 나타냈다. 따라서 본 한천분해효소는 중성과 약산성 범위에서 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다.

한천올리고당 가수분해산물의 TLC 분석

Neoagarohexaose를 기질로 하여 *Thalassomonas* sp. SL-5 균주를 1일 혹은 3일 동안 배양하여 생산한 조효소액과 반응

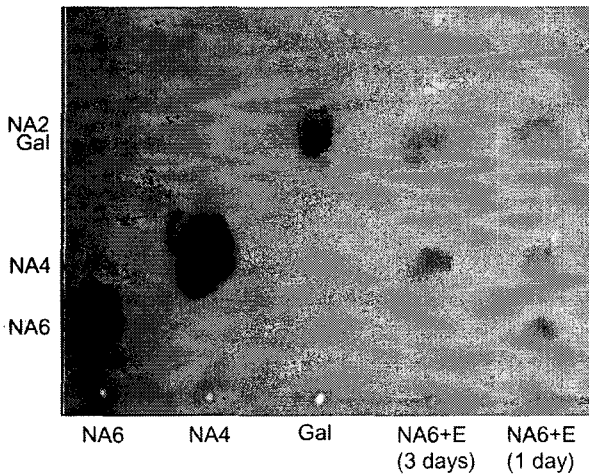


Fig. 8. TLC of the products of neoagarobiose hydrolysis by agarase. The reaction was carried out at 40°C in 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) buffer and 1.0% neoagarohexaose (NA6) with enzymes (1 day, supernatant from 1 day culture; 3 days, supernatant from 3 days culture) for 48 h. The reaction mixtures were developed by TLC. Gal, D-galactose; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose.

시킨 결과를 Fig. 8에 나타냈다. Neoagarohexaose를 기질로 사용하면 β-agarase는 neoagarotetraose와 neoagarobiose를 생성하며 α-agarase는 agaropentose와 agarotriose를 생성한다[2,14,21]. *Thalassomonas* sp. SL-5 균주의 한천분해효소는 분해산물의 TLC 분석 결과, neoagarotetraose와 neoagarobiose를 생산하는 것으로 나타나 β-agarase인 것으로 확인되었다. 본 연구의 결과로 확보된 β-agarase 생성 균주 *Thalassomonas* sp. SL-5와 본 연구진이 이미 확보한 β-agarase 생성 해양성 균주인 *Agarivorans* sp. JA-1 균주[15]를 이용하여 기능성 한천 올리고당의 산업적 생산이 가능할 것으로 기대되어 진다.

요 약

포항 호미곶 해수에서 한천분해활성을 보이는 해양성 세균 SL-5을 분리하였으며 16S rDNA 염기서열분석으로 해양 기원의 *Thalassomonas* 속과 가장 유사한 균주임을 확인하였다. SL-5 균주가 생성하는 한천분해효소(agarase)는 성장의존성인 것으로 확인되었고 효소활성을 위한 최적 pH는 pH 7.0 (20 mM sodium phosphate 완충용액)이고 최적 온도는 40°C로 나타났다. 한천분해효소는 80°C까지 65%의 효소활성을 보이는 호열성 효소이지만, 내열성은 그리 높지 않았다. 한천분해효소의 분해산물에 대한 TLC 분석결과, 본 효소가 β-agarase라는 사실을 확인할 수 있었다. 분리한 *Thalassomonas* sp. SL-5 균주가 생산하는 한천분해효소를 이용하여 한천으로부터 다양한 기능성 한천올리고당을 생산하는데 있어 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 해양수산부 주관 marin바이오21사업 해양·극한 생물 분자유전체연구단의 지원을 받아 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Allouch, J., M. Jam, W. Helbert, T. Barbeyron, B. Kloareg, B. Henrissat and M. Czjzek. 2003. The three-dimensional structures of two β-agarases. *The J. Biol. Chem.* **278**, 47171-47180.
- Araki, T., Z. Lu and T. Morishita. 1998 Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verucosa* (Rhodophyta). *J. Marine Biotechnol.* **6**, 193-197.
- Brinkmeyer, R., K. Knittel, J. Jurgens, H. Weyland, R. Amann and E. Helmke. 2003. Diversity and structure of bacterial communities in arctic versus antarctic pack ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6610-6619.
- Buttner, M. J., I. M. Fernley and M. J. Bibb. 1987. The agarase gene (dag A) of *Streptomyces coelicolor* A3 (2): nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 101-109.
- Do, J.-H. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish. Soc.* **30**, 423-427.
- Duckworth M, W. Yaphe. 1970. Thin-layer chromatographic analysis of enzymic hydrolysate of agar. *J. Chromatogr.* **49**, 482-487.
- Duckworth, M. and W. Yaphe. 1971. Structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbo. Res.* **16**, 189-197.
- Groleau D, W. Yaphe. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of β-neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **23**, 672-679.
- Hassairi, I. R. B. Amar, M. Nonus and B. B. Gupta. 2001. Production and separation of α-agarase from *Altermonas agarlyticus* strain GJ1B. *Bioresource Technol.* **79**, 47-51.
- Jean, W. D., W. Y. Shieh and T. Y. Liu. 2006. *Thalassomonas agarivorans* sp. nov., a marine agarolytic bacterium isolated from shallow coastal water of An-Ping Harbour, Taiwan, and emended description of the genus *Thalassomonas*. *Int. J. Syst. Evol. Micro.* **56**, 1245-1250.
- Joo, D.-S., O.-S. Kim, S.-Y. Cho and C.-H. Cho. 2003. Preparation condition of agar oligosaccharide with organic acids. *J. Korean Fish. Soc.* **36**, 6-10.
- Kato, I. 2000. Antioxidative and antitumorigenic properties of agaro-oligosaccharide. *Bio Industry* **17**, 13-19.
- Kim, B.-J., S.-H. Hwang, H.-J. Kim, Y.-S. Kang, S.-D. Ha and J.-Y. Kong. 1999. Characteristics of β-agarase produced by marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 96-102.
- Ohta, Y., Y. Hatada, M. Miyazaki, Y. Nogi, S. Ito and K. Horikoshi. 2005. Purification and characterization of a novel alpha-agarase from a *Thalassomonas* sp. *Curr. Microbiol.* **50**, 212-216.

15. Park, G.-T., D.-G. Lee, N. Y. Kim, E.-J. Lee, J.-G. Jung, J.-H. Lee, M.-S. Heo and S.-H. Lee. 2005. Isolation and characterization of a marine bacterium producing thermo-tolerant agarase. *J. Life Sci.* **15**, 884-888.
16. Somogy, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
17. Sugano, Y., I. Terada, M. Arita, M. Noma and T. Matsumoto. 1993. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1549-1554.
18. Suzuki, H., Y. Sawai, T. Suzuki and K. Kawai. 2002. Purification and characterization of an extracellular α -neogaroooligosaccharide hydrolase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 456-463.
19. Vera, J., R. Alvarez, E. Murano, J. C. Slebe and O. Leon. 1998. Identification of a marine agarolytic *Pseudoalteromonas* isolate and characterization of its extracellular agarase. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4378-4383.
20. Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu, H. Shegeiri and T. Shibata. 1991. Purification and some properties of agarase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agricul. Biol. Chem.* **55**, 2531-2536.
21. Yoshizawa, Y., A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui and S. Kaminogawa. 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*): structurefunction relationships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1933-1939.
22. Zhong, Z., A. Toukdarian, D. Helinski, V. Knauf, S. Sykes, J.E. Wilkinson, C. O'Bryne, T. Shea, C. DeLoughery and R. Caspi. 2001. Sequence analysis of a 101-kilobase plasmid required for agar degradation by a *Microscilla* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5771-5779.