

해양미생물 *Sphingomonas paucimobilis* AS-1이 생산하는 새로운 extracellular agarase의 정제 및 특성

정일선 · 김유정 · 송호주 · 갈상완¹ · 최영주*

신라대학교 의생명과학대학 식품영양학과, ¹진주산업대학교 미생물공학과

Received December 21, 2007 / Accepted January 9, 2008

Purification and Properties of a Novel Extracellular Agarase from Marine Bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* AS-1. Il Sun Jung, Yu Jung Kim, Hyo Ju Song, Sang Wan Gal¹ and Young Ju Choi*. Department of Food and Nutrition, College of Medical Life Science Silla University, Busan 617-736, ¹Department of Microbiological Engineering, Jinju National University, Jinju 660-758, Korea - An agar-degrading marine bacterium, strain AS-1 was isolated from the seawater. The strain AS-1 was identified as *Sphingomonas paucimobilis* (90% probability) by VITEK. The optimum medium for agarase activity of the isolated strain was determined to be marine medium, marine broth 2216 containing 0.1% agar as carbon source. An extracellular agarase was purified 104-fold from the culture supernatant by ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography and gel filtration methods. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 80 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for activity were 7.0 and 40°C, respectively. Antioxidative activity of the strain AS-1 was 72% in the supernatant cultured for 12 h. The culture supernatant of the strain AS-1 showed antibacterial activity against bacteria causing putrefaction and food poisoning such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris*. However, the cell growth of the lactic acid forming strain, *Lactobacillus plantarium* was promoted by the treatment of 10% culture supernatant of an agar-degrading strain.

Key words : Marine bacteria, agarase, *Sphingomonas*, purification, antioxidant

서 론

해양자원으로서 가치 있는 해조류들은 영양학적으로 열량은 매우 낮으면서 비타민과 무기질, 식이섬유소가 풍부하고, 육지 식물에는 없는 비소화성의 점질성 다당류를 다량 함유하고 있으며, 채소류와 비교해서 필수 아미노산과 불포화 지방산이 많다는 것이 특징이다[8]. 특히 한천은 국내에서 생산되는 전체 해조류 생산량의 약 30%를 차지하는 대표적인 해조류의 하나로, 오래 전부터 가축의 사료, 작물의 비료, 의약품, 화장품, 식품첨가물, 공업원료 등으로 널리 이용되어 왔다. 한천의 분해에 의해서 생성되는 한천올리고당(oligosaccharide 또는 neoagarooligosaccharides)은 전분의 노화에 대한 억제 작용이 강하고, 정장작용, 비피더스균 증식인자, 항충치성 등의 기능성 효과가 매우 크며, 또한 난소화성으로 당뇨병, 비만, 변비 등의 치료에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다[2,15]. 최근에는 neoagarooligosaccharides는 면역개선효과, 항산화력 있으며[7,19,25], 또한 neoagarobiose는 피부 보습 효과 및 melanoma cell에 whitening 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[6,12].

한천 올리고당은 한천의 산 가수분해 또는 효소분해에

의해 생성되지만, 산가수분해시에는 한천에 함유되어있는 고유의 비타민이나 무기질 등이 다량 파괴되고, 올리고당의 기능성 및 안정성 유지에 문제가 제기되므로 효소분해에 의한 방법이 보다 유용한 것으로 알려져 왔다[19]. 따라서 한천 올리고당의 대량 생산 또는 산업적 이용을 위해서는 우선적으로 높은 활성을 지닌 한천분해효소 및 이를 이용한 한천올리고당의 대량생산에 관한 연구개발이 이루어져야 한다.

Agarase를 생성하는 bacteria는 agar에 대한 작용기작에 따라 α -1,3결합을 절단하는 α -agarase [27]와 β -1,4결합을 절단하는 β -agarase [5]로 분류된다. 지난 수년 동안 수종의 agarase 균주가 *Pseudoalteromonas* [4,23], *Pseudomonas* [10, 26], *Streptomyces* [3], *Alteromonas* [24], *Microbulbifer* [17,18], *Vibrio* [19,20], *Cytophaga* [22] 등의 해양미생물을 중심으로 분리되어 한천분해 효소의 특성에 관한 연구가 활발히 수행되어 왔다.

본 연구는 한천을 원료로 하여 oligosaccharides 형태의 분해물을 제조하기 위하여 한천을 분해하는 효소의 특성을 밝히고자 수종의 agar-softening 균주와 agar-liquefying 균주를 분리하여 한천 가수분해에 대한 extracellular agarase 연구를 수행하였다. 본 논문에서는 해양으로부터 한천분해능이 뛰어난 *Sphingomonas paucimobilis* AS-1을 분리·동정하고 정제하였으며, 효소의 특성과 agar 분해산물의 항산화활성을 연구하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5459, Fax : +82-51-999-5176

E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

재료 및 방법

시약 및 기자재

균주의 screening을 위해 사용한 배지는 marine broth 2216는 (Difco, Detroit, USA)에서 구입하여 사용하였다. Agarase를 정제하기 위해 사용한 ammonium sulfate는 USB 사 (Cleveland, USA)제품을 사용하였다. Ion exchange chromatography에 사용된 HiPrep™ 16/10 DEAE FF와 gel filtration에 사용된 HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-200HR은 Amersham Biosciences에서 구입하여 사용하였다. 균주동정을 위해서 VITEK 2 compact version (BioMerieux, France)을 사용하였다. Protein 정제를 위해 사용한 기기는 AKTA Prime (Amersham Biosciences)이었고, UV-Vis spectrophotometer는 Ultrospec® 3000을 사용하였다. 항산화활성 측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma-Adrich 사 제품을 사용하였고, 그 외의 기타 시약은 특급을 사용하였다.

Agarolytic bacteria의 분리 및 동정

Agarolytic bacteria의 screening을 위해 해양으로부터 해수 sample을 채취하여 회석한 후, marine broth 2216 agar plate에 도말하여 27°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 agar plate의 표면에 colony를 중심으로 움푹 파이거나 clear zone을 형성하는 균주를 분리하였다. 분리된 균주는 AS-1 으로 명명하였으며, 균주의 동정은 VITEK 2 compact version으로 생화학적 기질을 이용한 colorimetry 분석을 통해서 확인하였다.

분리된 균주의 생육특성 조사

분리된 균주의 배양조건에 따른 균주의 특성은 온도, salt 농도, pH를 달리하여 27°C에서 24시간동안 진탕배양한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양조건은 온도(15, 23, 27, 37°C), salt농도(0.5, 1, 2, 3, 5%), pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0)에 따른 생육특성을 조사하였다.

Agarase 정제

Agarase 정제를 위한 모든 실험은 4°C에서 수행하였으며 균주는 27°C에서 72시간동안 180 rpm의 조건에서 진탕 배양하였다. 배양액을 6,000× g에서 30분 동안 원심분리 한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 분리된 상등액은 70% ammonium sulfate로 포화시킨 후 24시간 동안 침전시킨 다음 6,000× g에서 30분 동안 원심분리 하였다. 침전물을 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 용해한 후 동일한 buffer로 투석하였다. 투석된 용액은 HiPrep 16/10 DEAE FF column에 loading하고 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 equilibrating 하였으며, flow rate는 1 ml/min으로 조절하였다. 단백

질은 NaCl gradient (0~1.0 M)를 포함하는 동일한 buffer로 elution한 후 fraction을 회수하여 효소활성을 측정하였다. 효소활성이 높은 fraction을 회수하여 HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-200 HR column을 loading하여 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 equilibrating 하였으며, flow rate는 0.5 ml/min으로 조절하였다. 활성이 높은 fraction을 회수하여 단백질 전기영동으로 효소정제를 확인하였으며, agarase 효소 특성조사를 위한 정제효소 사용하였다.

Agarase 활성측정 및 단백질 정량

Agarase활성측정은 0.1% agarose 용액을 기질로 하여 Leon [14]의 방법에 따라 한천분해효소의 반응산물인 환원당을 DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid)법[16]에 의해 측정하였다. 한천분해효소의 활성은 1분당 1 μmol 의 galactose를 생산하는 효소의 양을 1 unit로 나타내었다. 단백질 정량은 UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec® 3000)를 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하였으며, 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

효소의 정제도 및 분자량 측정

효소의 정제도 및 분자량을 측정하기 위하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 Laemmli의 방법[13]에 따라 수행하였다. SDS-polyacrylamide gel은 10%를 사용하였으며, gel 염색은 Coomassie brilliant blue G-250을 사용하였다.

Agarase 활성에 대한 최적조건 및 안정성

Agarase 활성에 대한 pH 영향은 0.1% agarose가 함유된 기질용액 1 ml에 각 pH에 따른 완충용액(0.1 M sodium acetate buffer: pH 4.0-6.0, 0.1 M Tris-HCl buffer: pH 7.0-8.0, sodium carbonate buffer: pH 9.0-10.0) 1 ml를 혼합한 용액에 효소액을 가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하였다.

효소활성의 최적온도는 0.1% agarose가 함유된 기질용액 1 ml에 정제된 효소용액을 첨가하여 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0)에서 20~70°C까지 온도를 변화시키면서 30분간 반응시킨 다음 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하였다.

효소의 pH 안정성은 완충용액(pH 5.0-10.0)에 정제된 효소액을 가하여 30분간 전 처리한 효소액 1.0 ml와 0.1% 기질용액 1 ml를 혼합하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 효소의 안정성에 미치는 pH 조건을 확인하였다.

온도 안정성은 정제효소 1 ml를 20~70°C의 온도에서 30분간 반응시킨 후 0.1% 기질용액 1 ml를 혼합하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 잔존활성을 확인하였다.

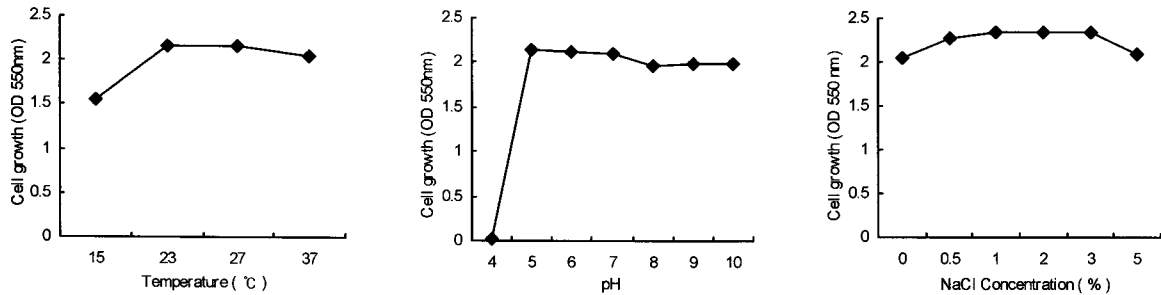


Fig. 1. Growth conditions on *Sphingomonas paucimobilis* AS-1. (A) Temperature (°C): 15, 23, 27, 37. (B) pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. (C) NaCl concentration (%): 0.5, 1, 2, 3, 5

DPPH 라디칼을 이용한 전자 공여능 측정

Agar 분해산물인 oligosaccharides의 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)라디칼소거 활성은 Blois [2]방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 균주를 0.1% agar를 함유한 marine broth에 배양한 후 DPPH 용액 1 ml에 배양액 200 μ l를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 반응물을 4°C, 12,000 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 전자공여능(electron donating ability: EDA)으로 표기하였으며, 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 차를 백분율 (%)로 표시하였다.

$$\text{EDA} (\%) = [1 - (\text{Abs}/\text{Abs}_c)] \times 100$$

Abs: Absorbance of control treatment at 525 nm

Abs: Absorbance of sample treatment at 525 nm

결과 및 고찰

균주 동정 및 배양조건

선별된 균주의 형태학적·생리학적 특성에 따라 동정을 하였다. AS-1은 VITEK 2 compact version 분석결과 *S. paucimobilis*로 90%의 유사성을 보였다(data not shown).

배양온도, pH 및 salt 농도에 따른 최적 배양조건을 구하기 위해 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 1). 온도 15~37°C의 범위에서 배양한 결과 *S. paucimobilis* AS-1은 23°C에서 cell growth가 가장 높았으며, pH 4~10의 범위에서 배양한 결과 pH 5~6 범위 내에서 균주생육이 가장 높았다. 그리고 salt 농도 0.5~5%의 범위에서 배양한 결과 1~3% 농도에서 최대 cell growth를 나타내었다.

Agarase의 정제 및 분자량

S. paucimobilis AS-1균주는 MB배지에서 27°C, 180 rpm에서 3일간 배양한 후 배양액을 70% ammonium sulfate에 침전시킨 후, HiPrep 16/10 DEAE FF column으로 ion exchange chromatography (Fig. 2) 및 HiPrep™ 26/60 Sephacryl™ S-200 HR column으로 gel filtration chromatography (Fig. 3)

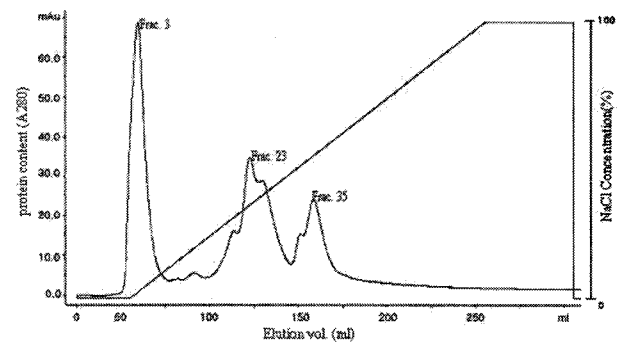


Fig. 2. Ion-exchange chromatography of agarase of *Sphingomonas paucimobilis* AS-1 on DEAE FF column. The 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing gradient NaCl rising from 0 to 1.0 M at a flow-rate of 1 ml/min was used to wash out the sample. Fractions were measured at 280 nm for protein content.

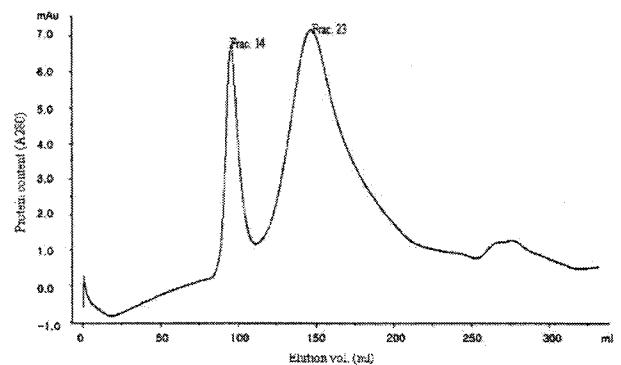


Fig. 3. Gel-filtration chromatography of agarase of *Sphingomonas paucimobilis* AS-1 on Sephacryl S-200 HR. The 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at a flow-rate of 0.5 ml/min was used to wash out the sample. Fractions were measured at 280 nm for protein content.

하여 효소를 정제하였다. 정제된 효소의 specific activity는 114.4 units/mg 으로 104배 정제되었다(Table 1). 정제된 agarase의 SDS-PAGE 결과 분자량이 약 80 kDa의 band를 얻었다(Fig. 4). 정제된 agarase효소의 molecular weight는 작은 것은 30 kDa에서 100 kDa가 넘는 것 까지 균주에 따라

Table 1. Purification of agarase from *Sphingomonas paucimobilis* AS-1

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (-fold)	Yield (%)
Culture supernatant	7579.9	8624	1.1	1	100
Ammonium sulfate precipitate (70%)	49.9	191.9	3.8	3.5	2.2
HiPrep 16/10 DEAE FF	5	20.5	4.1	3.7	0.2
HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 HR	0.09	10.3	114.4	104	0.1

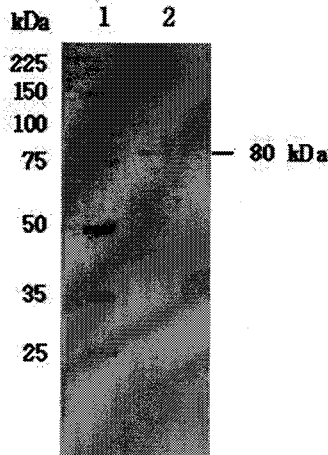


Fig. 4. SDS-PAGE of agarase purified from *Sphingomonas paucimobilis* AS-1. The proteins was stained with Coomassie brilliant blue R250. Lanes 1 and 2 indicate standard proteins and purified agarase, respectively.

다양한 것으로 밝혀져 있으며[21], 본 연구에서 정제된 효소와 비슷한 분자량을 가지는 것은 *Alteromonas* E-1로 분자량이 82 kDa의 β -agarase 효소를 함유하였다[11].

효소활성 최적조건 및 안정성

Agarase의 활성이 미치는 온도효과를 측정하기 위하여 온도를 20~70°C까지 변화시키면서 효소활성을 측정하였다. 본 연구에서 분리된 agarase는 40°C에서 최대 활성을 나타내었으며, 측정된 온도범위 내에서 70% 이상의 높은 활성을 유지하였다(Fig. 5). Kang 등[10]은 해양미생물인 *Pseudomonas* sp.에서 agarase 효소 최적 활성은 30°C 였으며, 40°C이상에서 급격히 효소활성이 감소하였으며, Ohta 등[17,18]은 해양미생물인 *Microbulbifer salipaluids*로부터 온도에 안정한 β -agarase 효소를 분리하였는데 최적효소활성은 55°C 였으며, 60°C이상에서 급격히 효소활성이 감소하는 것으로 보고하였다. 대부분의 agarolytic 균주의 agarase의 최적 활성은 30-40°C사이에 존재하였으며, 본 연구에서 분리된 균주는 온도에 비교적 높은 안정성을 나타내고 있는 것으로 생각된다.

분리된 효소의 활성 최적 pH를 실험한 결과(Fig. 6) pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보였고, pH 6.0의 미산성 영역에서도 높은 활성을 보였다. pH에 대한 효소의 활성은 pH 6.0-7.0 사이의 영역에서는 별 영향을 받지 않았으며 6.0이하

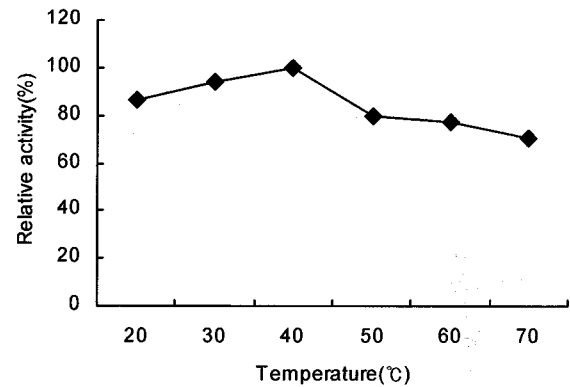


Fig. 5. Effects of temperature on the agarase activity. Temperature profiles were checked at different temperatures (20-70°C) in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). The enzyme solution was preincubated at various temperature for 30 min and residual activity was measured.

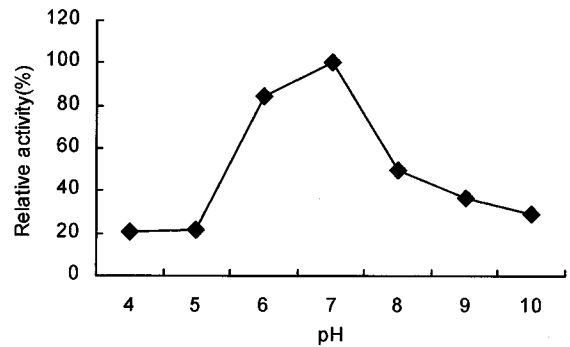


Fig. 6. Effect of pH on the agarase activity. The activity was determined at 40°C in different buffer (pH 4.0-10.0): 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0-6.0), 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.0-8.0), sodium carbonate buffer (pH 9.0-10.0). The enzyme solution was placed at various pH for 30 min and residual activity was measured at 40°C.

와 pH 8.0이상의 산, 알칼리 영역에서는 효소활성이 크게 감소했다. Suzuki 등[21]은 *Bacillus* sp.에서 최적 pH 7.6이었으며 효소의 안정성도 pH 7.0-8.0 사이에서 안정한 것으로 나타났으며, 일반적으로 agarase의 최적 활성 pH는 7.0 부근이었으며, 안정성도 pH 6.0-8.0 사이에서 비교적 효소활성이 안정한 것으로 밝혀져 있다[7,18].

DPPH법에 의한 항산화활성 측정

DPPH 라디칼은 alcohol 용액 내에서는 DPPH의 질소 원자와 alcohol간에 수소결합이 형성되기 때문에 다른 유리 라디칼보다 비교적 안정하고, 항산화 활성을 갖는 물질과 반응하면 진보라색의 DPPH의 색깔이 점점 얼어져 흡광도가 감소한다. DPPH 라디칼 소거법은 흡광도의 감소를 측정함으로써 radical 소거 활성을 쉽게 측정 할 수 있다는 장점을 가지고 있어 항산화 활성 측정의 척도로 많이 활용되고 있다. *S. paucimobilis* AS-1의 배양 상등액에 대한 DPPH 라디칼 소거 활성을 시간대별로 측정한 결과(Fig. 7) *S. paucimobilis* AS-1은 EDA (%)가 4시간과 8시간 배양 후 11.4%와 51.2%로 각각 증가하였으며, 12시간 배양 후 72.5%로 최고 활성을 나타내었으며, 24시간과 48시간 배양 후에는 각각 38.1%와 31.5%로 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 생성된 agar hydrolysates 의 형태에 따른 결과로 생각되며, 앞으로 어떤 oligosaccharides가 생성되는지 확인이 요구된다. Giordano 등[7]과 Wang 등[25]은 해양미생물 유래의 agarase에 의하여 생산된 oligosaccharides가 항산화활성이 있다고 보고하였으며, 식품, 화장품 및 의약산업에 oligosaccharides 이용하기위하여 새로운 agarase효소에 대한 많은 연구가 필요하다.

항균활성 측정

Agar 분해산물의 항균활성은 agar 넣고 배양한 액체 배양액을 원심분리한 후, 균체를 제거한 상층액을 10%로 희석하여 효소분해물로 사용하였다. 식중독 및 식품 부패균과 김치 발효균은 LB broth (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, H₂O 1,000 ml)에서 배양하였다. 항균활성은 LB배지에 10% 효소분해물을 첨가하고 균주배양액을 접종하여 진탕배양하면서 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 8). 식중독 및 식품 부패균은 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* 등은 생육이 대조군에 비하여 10% 효소분해

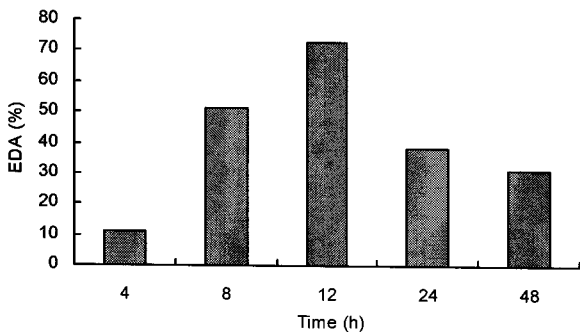


Fig. 7. DPPH radical scavenger activity of the hydrolysed products from agar by agarase in different culture time. Data are expressed as mean±S.D. of triplicate experiments.

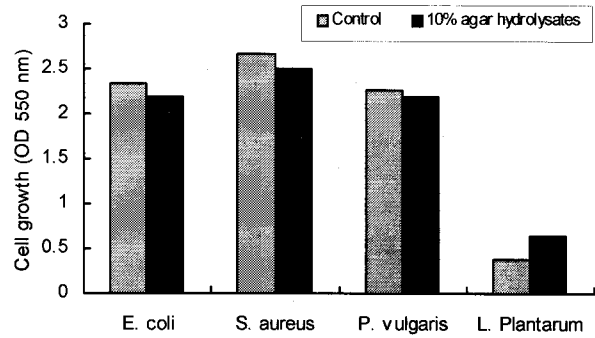


Fig. 8. Antibacterial activity of agar hydrolysates of *Sphingomonas paucimobilis* AS-1 against bacteria causing putrefaction and food poisoning. Data are expressed as mean±S.D. of triplicate experiments.

물을 첨가한 균에서 감소하였으며, 김치 젖산균 *Lactobacillus plantarium*의 생육은 약간 증가하였다. 이러한 결과는 agarase 효소분해물이 식중독균 및 식품부패균의 생육은 저해하고 유용미생물인 김치 젖산균의 생육은 촉진하는 것으로 나타났다. 주등의[9]연구에서도 병원성 미생물에 대해서 강한 항균활성은 나타나지 않는 것으로 보고되었으며, 단지 항생 활성은 높은 것으로 나타났다. 이러한 항균성 기작이 어떤 올리고당류가 활성에 관계되는지 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

Agar로부터 oligosaccharides를 제조하기 위하여 효소(agarase)를 이용한 분해법이 시도되면서 agarase의 균주의 분리 및 유전자에 대한 많은 연구가 수행되고 있다. 본 연구에서는 해양으로부터 agarase를 생성하는 균주를 분리·동정하고 균주의 특성을 조사하였다. 분리된 균주는 VITEK 2 compact version 분석결과 *Sphingomonas paucimobilis* AS-1로 동정되었다. 정제된 효소의 최적 활성 조건 및 agar 분해산물의 항산화활성을 조사하였다.

분리된 균주의 최적배양조건은 marine broth 2216에서 온도 27°C, pH 7일 때 가장 균주의 생육이 높았다. Agarase 효소는 salt침전, ion exchange와 gel filtration chromatography에 의해 114.4 units/mg으로 104배 정제되었다. 정제된 agarase의 SDS-PAGE 결과 분자량이 약 80 kDa의 band를 얻었다.

최적 효소활성은 온도 40°C, pH 7일 때 나타났다. Agar 첨가한 배지에 agar 분해균을 접종한 후 분해산물의 시간에 따른 항산화활성은 12시간 배양 후 72%의 가장 높은 전자소거능(EDA)을 나타내었다. Agar 분해산물은 식중독균의 생육은 저해하는 것으로 나타났으며 젖산균의 생육은 약간 촉진하는 경향을 나타냈다.

References

1. Andrykovitch, G. and I. Maex. 1988. Isolation of a new polysaccharide - degrading bacterium from a salt marsh. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1061-1062.
2. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1200.
3. Buttner, M. J., I. M. Feamley and M. J. Bibb. 1987. The agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2) nucleotide sequence and transcriptional analysis. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 101-109.
4. Chiura, H. X. and K. Tsukamoto. 2000. Purification and characterization of novel agarase secreted by marine bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. strain CKT1. *Microb. Environ.* **15**, 11-22.
5. Duckworth, M. and J. R. Turvey. 1969 The action of bacterial agarase of agarose, porphyran and alkali treated porphyran. *Biochem. J.* **113**, 687-692.
6. Fu, X. T., H. Lin and S. M. Kim. 2007. Purification and characterization of novel β -agarase, *agaA34*, from *Agarivorans albus* YKW-34. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* in press.
7. Giordano, A., G. Andreotti, A. Tramice and A. Trincone. 2006. Marine glycosyl hydrolases in the hydrolysis and synthesis of oligosaccharides. *Biotechnol. J.* **1**, 511-530.
8. Jimenez-Escrig A. and I. Goni Cambrodon. 1999. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch Latinoam Nutr.* **49**, 114-120.
9. Joo, D. S., S. Y. Cho and E. H. Lee. 1998. Preparation of agar hydrolysates by agarase and functionality of the hydrolysates. *Korean, J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 378-382.
10. Kang, N. Y., Y. L. Choi, Y. S. Cho, B. K. Kim, B. S. Jeon, J. Y. Cha, C. H. Kim and Y. C. Lee. 2003. Cloning, expression and characterization of a β -agarase gene from a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. SK38. *Biotechnology Letters* **25**, 1165-1170.
11. Kirimura, K., N. Masuda, Y. Iwasaki, H. Nkagawa, R. Kobayashi and S. Usami. 1999. Purification and characterization of a novel β -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1. *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 436-441.
12. Kobayashi, R., M. Takisada, T. Suzuki, K. Kirimura and S. Usami. 1997. Neoagarobiose as a novel moisturizer with whitening effect. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 162-163.
13. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
14. Leon, O., L. Quintana, G. Peruzzo and J. C. Slebe. 1992. Purification and properties of an extracellular agarase from *Alteromonas* sp. strain C-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4060-4063.
15. Macmillan, J. D., H. J. Phaff and R. H. Vaughn. 1964. The Pattern of action of an exopolygalacturonic acid-*trans*-eliminase from *Clostridium multifementans*. *Biochemistry* **3**, 572-578.
16. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
17. Ohta Y., Y. Hatada, Y. Nogi, Z. Li, S. Ito and K. Horikoshi. 2004. Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 86 β -agarase from a deep-sea *Microbulbifer*-like isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 266-275.
18. Ohta, Y., Y. Nogi, M. Myazaki, Z. Li, Y. Hatada, S. Ito and K. Horikoshi. 2004. Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from the novel marine isolate, JAMB-A94. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1073-1081.
19. Sugano, Y., H. Kodama, I. Terada, Y. Yamazaki and M. Noma. 1994. Purification and characterization of a novel enzyme, α -neoagarooligosaccharide hydrolase, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Bacteriol.* **176**, 6812-6818.
20. Sugano, Y., I. Terada, M. Arita, M. Noma and Matsumoto. 1993. Purification and characterization of a new agarase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1649-1654.
21. Suzuki, H., Y. Sawai, T. Suzuki and K. Kawai. 2003. Purification and characterization of an extracellular β -agarase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 328-334.
22. van der Meulen, H. and W. Harder. 1975. Production and characterization of the agarase of *Cytophaga fleveensis*. *Antonie Leeuwenhoek*, **41**, 431-447.
23. 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.
24. Wang, J. X., H. J. Mou, X. L. Jiang and H. S. Guan. 2006. Characterization of a novel β -agarase from marine *Alteromonas* sp. SY37-12 and its degrading products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 833-839.
25. Wang, J. X., X. L. Jiang, H. J. Mou, and H. S. Guan. 2004. Anti-oxidation of agar oligosaccharides produced by agarase from a marine bacterium. *J. Appl. Phycol.* **16**, 333-340.
26. Yamaura, I., T. Matsumoto, M. Funatsu, H. Shigeiri and T. Shibata. 1991. Purification and some properties of agarase from *Pseudomonas* sp. PT-5. *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2531-2536.
27. Young, K. S., and S. S. Bhattacharjee and W. Yaphe. 1978. Enzymic cleavage of the α -linkages in agarose, to yield agaro-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* **66**, 207-211.