

## 해양성 *Flammeovirga* sp. mbrc-1 균주의 분리 및 한천분해기능의 특성조사

장혜지<sup>1</sup>, 이동근<sup>1</sup>, 이승우<sup>1</sup>, 전명재<sup>1</sup>, 천원주<sup>1</sup>, 권개경<sup>2</sup>, 이희순<sup>2</sup>, 이상현<sup>1\*</sup>

### Isolation of a Marine-derived *Flammeovirga* sp. mbrc-1 Strain and Characterization of Its Agarase

Hye Ji Jang<sup>1</sup>, Dong-Geun Lee<sup>1</sup>, Seungwoo Lee<sup>1</sup>, Myong Je Jeon<sup>1</sup>, Won Ju Chun<sup>1</sup>, Kae Kyoung Kwon<sup>2</sup>, Hee-Soon Lee<sup>2</sup>, and Sang-Hyeon Lee<sup>1\*</sup>

접수: 2011년 10월 28일 / 게재승인: 2011년 11월 29일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** A novel agar-degrading bacterium mbrc-1 was isolated from seashore of Kyungpo at Gangwon province and cultured in marine broth 2216 medium. Isolated bacterium mbrc-1 was named as *Flammeovirga* sp. mbrc-1 based on the 16S rDNA sequence. Its agarase showed maximum activity of 923 units/L at pH 7.0 and 45 °C and sustained 90% remaining activity after exposed to 45 °C for 2 hours. The enzyme hydrolyzed agarose to yield neoagarohexaose (18.5%), neoagarotetraose (38%) and neoagarobiose (43.5%), indicating that the enzyme is  $\beta$ -agarase. Thus, isolated bacterium and its  $\beta$ -agarase would be useful for the industrial production of neoagarotetraose and neoagarobiose.

**Keywords:**  $\beta$ -agarase, agarose, *Flammeovirga* sp., neoagarobiose, neoagarotetraose

#### 1. 서론

한천 (agar)은 홍조류의 세포벽에 존재하는 다당류로

galactopyranose와 anhydrogalactopyranose의 중합체이며, agarose와 agaropectin으로 구성되어 있다 [1]. 한천에는 70%의 agarose가 포함되어 있는데 이는  $\beta$ -D-galactopyranose와 3,6-anhydro  $\alpha$ -L-galactopyranose의 교차잔기로 구성되어 있다 [2]. 한천은 풍부한 국내 수산자원 중 하나로 오래전부터 아이스크림, 젤리 등의 식품생산에 널리 이용되어 왔으며, 난소화성 다당류로서 다이어트 식품의 원료로도 사용되고 있다 [3]. 또한, 가공된 한천은 미생물 배지 및 분자생물학 실험에 널리 사용되고 있다. 한천은 우리나라의 남해안 일대 및 제주도에서 주로 생산되고 있으며, 품질 또한 뛰어난 것으로 알려져 있다.

한천분해효소인 agarase는 한천을 가수분해하는 효소로서 한천분해 양상에 따라  $\alpha$ -agarase와  $\beta$ -agarase로 분류된다 [4].  $\alpha$ -Agarase는 한천의  $\alpha$ -1,3 결합을 절단하여 agarobiose, agarotetraose, agarohexaose 등의 agarooligosaccharides를 생산하고 [5],  $\beta$ -agarase는 한천의  $\beta$ -1,4 결합을 절단하여 neoagarobiose, neoagarotetraose, neoagarohexaose 등의 neoagarooligosaccharides를 생산하는 것으로 알려져 있다 [6]. 예전에는 한천으로부터 올리고당을 생산하는 방법으로 산가 수분해법을 이용했는데 이 방법에 의해서 생산된 한천올리고당은 기능성이 낮고 안전성에 문제가 있어 최근에는 한천 분해효소를 이용하는 방법이 더 유용한 것으로 인식되어 [7], 많은 연구자들이 한천분해효소를 생산하는 균주의 탐색을 위한 연구를 행해왔다 [8-11].

한천분해산물인 한천올리고당은 생체 내에서 여러 가지 기능성을 나타내는 것으로 알려져 왔는데, 특히,  $\beta$ -agarase에 의한 한천분해산물인 neoagarooligosaccharides는 항균활성, 대식세포 활성화 기능 및 미백기능 등의 다양한 기능성을

<sup>1</sup>신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea  
Tel: +82-51-999-5624, Fax: +82-51-999-5636  
e-mail: slee@silla.ac.kr

<sup>2</sup>한국해양연구원

<sup>2</sup>Marine Biotechnology Research Center, KORDI, Ansan P.O. Box 29, 425-600, Korea

가지는 것으로 알려져 왔다 [12-14]. 또한, neoagarobiose와 neoagarotetraose는 높은 미백활성을 나타내고, neoagarobiose는 보습기능도 함께 가지는 것으로 확인되었다 [15,16]. 따라서,  $\beta$ -agarase를 생산하는 유용균주를 발굴하고 이로부터  $\beta$ -agarase를 대량생산한다면 현재 1차 가공에 머물러 있는 한천을 원료로 고부가가치 소재 산업의 창출이 가능할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 강원도 경포 연안의 해양 미생물에서 한천분해능이 뛰어난 신규 미생물인 *Flammeovirga* sp. mbrc-1을 분리하여 동정하였고 이 세균이 생산하는 한천분해효소의 특성을 파악하여 산업적 응용 가능성을 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 한천분해 균주의 분리 및 동정

강원도 경포 연안에서 한천분해활성을 가지는 세균의 분리를 위한 시료를 채취하였으며, 한천을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 한 무기염 한천배지와 [9] 일반적인 해양세균 분리 및 증균용 배지로 사용되는 marine broth 2216 (Difco, Detroit, USA) 한천배지에 시료액을 도말한 후 25°C에서 배양하면서 한천분해활성으로 평판 배지를 함몰시키는 mbrc-1 균주를 선별하였다.

Mbrc-1 균주의 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였다. 분석된 염기서열은 Blast를 사용하여 보고된 균주와 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.

### 2.2. 한천분해 균주의 생육 및 조효소액의 제조

0.2% (w/v) agar를 포함하는 marine broth 2216 배지 50 mL가 들어있는 250 mL 삼각플라스크에 순수 분리한 mbrc-1 균주를 접종한 후 shaking incubator를 이용하여 25°C, 250 rpm에서 3일간 진탕 배양하였다. 배양 3일 후 배양액을 원심 분리 (14,000 × g, 4°C, 20 min)하여 균체를 제거한 후 얻어진 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

### 2.3. 효소활성 측정

한천분해 효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogy-Nelson법으로 실시하였다 [9]. 각 온도와 pH 및 열안정성 실험에서, 반응이 끝난 조효소 반응용액 0.5 mL에 2.0 mL의 Somogy 시약 (10% CuSO<sub>4</sub> 80 mL, 1 N NaOH 100 mL, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 180 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 71 g, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>KNa · 4H<sub>2</sub>O 40 g/D.W. 1 L)을 첨가하여 효소반응을 중지시키고 10분간 끓였다. 실온으로 냉각된 용액에 arseno-molybdate 시약 2 mL를 첨가하고 14,000 × g에서 5분간 원심분리한 상층액의 흡광도를 550 nm에서 측정하였다. 1분당 1 μmole의 galactose를 생산해 내는 한천분해 효소의 양을 1 unit로 정의하였고 galactose를 이용하여 표준적정곡선을 작성하였다.

### 2.4. pH에 따른 한천분해 효소의 활성측정

pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 20 mM sodium acetate 완충용액 (pH 3.0-5.0), 20 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 5.0-8.0), 20 mM TAPS (3-[tris (hydroxymethyl) methyl amino]-1-propane sulfonic acid) 완충용액 (pH 8.0-9.0)을 이용하였다. 넓은 pH범위에서 사용가능한 완충용액인 20 mM GTA (3,3-dimethyl-glutaric acid, Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol)를 이용하여 pH 3~9에서의 활성측정을 수행하였다. 최종농도 0.2% (w/v)의 한천이 포함된 완충용액을 중탕가열한 후 45°C까지 냉각하고 반응수조를 이용하여 온도를 유지하면서 완충용액 1.0 mL에 조효소액 0.5 mL을 첨가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

### 2.5. 반응온도에 따른 한천분해 효소의 활성측정

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해효소의 활성을 비교하였다. 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 한천이 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 이용하였다. 기질용액을 중탕가열한 후 25-60°C의 온도별로 냉각하였다. 기질용액 1.0 mL에 조효소액 0.5 mL을 첨가하여 각 온도에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다 [8].

### 2.6. 한천분해 효소의 열안정성 측정

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해효소의 열안정성을 조사하였다. 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 한천이 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 이용하였다. 완충용액 1.0 mL에 조효소액 0.5 mL을 첨가하여 각 온도별로 0.5시간, 1시간, 1.5시간, 2시간 열처리한 후, 기질용액 1.0 mL를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 측정된 효소활성은 열처리전의 효소활성과 비교하였다.

### 2.7. 한천 가수분해산물의 thin-layer chromatography (TLC) 분석

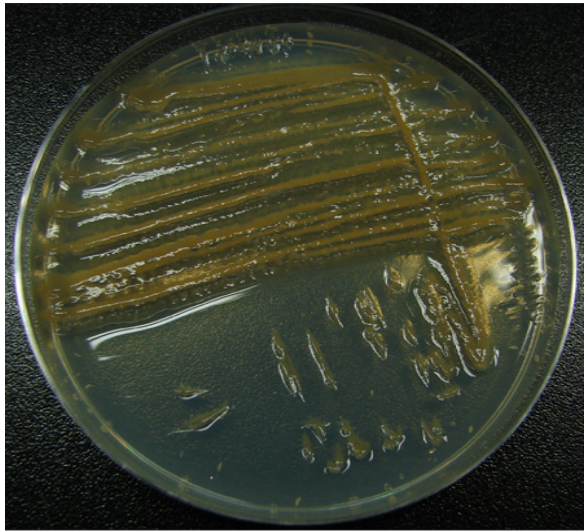
효소액을 이용한 agarose의 분해산물을 TLC로 분석하였다. 조효소액과 0.2% (w/v)의 agarose가 포함된 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) 완충용액을 45°C에서 0, 0.1, 0.5, 1, 6, 12, 15시간 반응시킨 후, Silica gel 60 TLC plate (Merck, Darmstadt, Germany)로 분석을 행하였다 [17,18]. n-Butanol/acetic acid/H<sub>2</sub>O (2/1/1 (v/v/v))를 이용하여 전개시켰고, 10% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 가시화시켰다. 표준물질로 neoagarohexaose (Sigma, USA)와 neoagarotetraose (V-Labs Inc. St. Covington, LA, USA), galactose (ACROS, USA)를 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

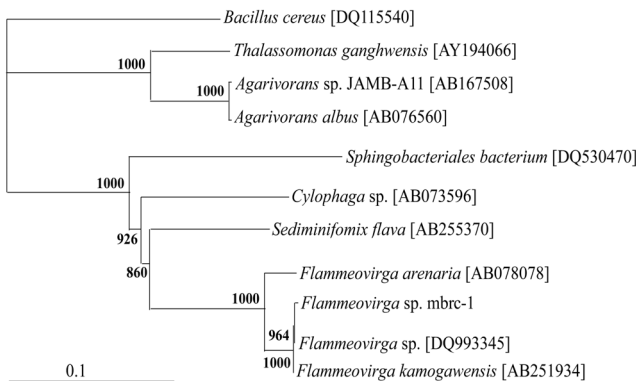
### 3.1. 한천분해균주의 분리 및 배양

강원도 경포 연안에서 분리한 mbrc-1 균주가 나타내는 한천분해 양상을 Fig. 1에 나타냈다. 분리된 한천분해능 mbrc-1 균주의 16S rDNA 염기서열 분석결과, 1,336 bp의 염기서열을 얻었고, Blast 탐색으로 gamma-Proteobacteria인

*Flammeovirga kamogawensis* [19]와 99%의 가장 높은 상동성을 나타냈고 *Flammeovirga arenaria* [20]와도 95%의 상동성을 나타냈으므로, 분리균주를 *Flammeovirga* sp. mbrc-1로 명명하였다. 본 연구와 Genbank에서 획득한 16S rDNA 염기서열을 Neighbor-joining method와 Bootstrap method (n=1000)로 분석하여 나타난 본 연구 균주의 계통분류학적 위치를 Fig. 2에 나타냈다.



**Fig. 1.** Agar degrading activity of the isolated bacterium mbrc-1 on a marine broth 2216 agar medium.

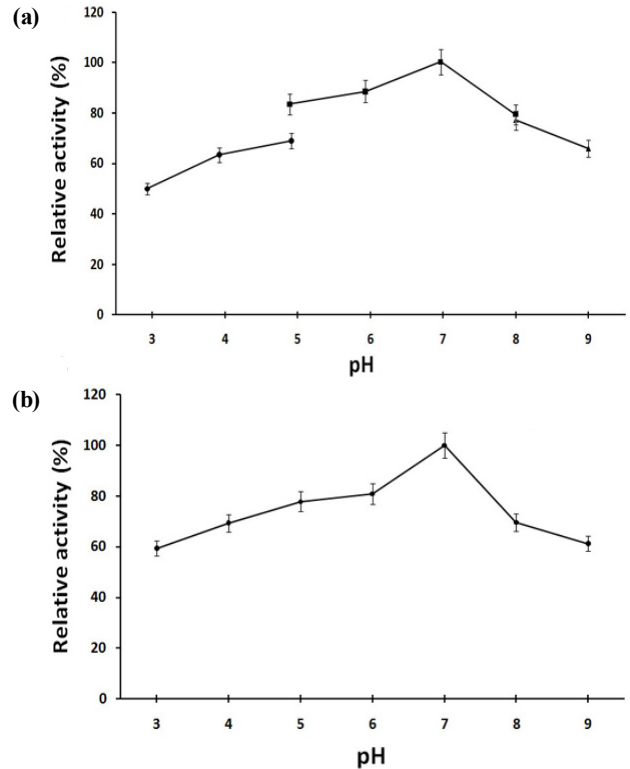


**Fig. 2.** Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing strain mbrc-1 with other bacteria. The numbers at the branch node are bootstrap values and numbers in parenthesis are accession numbers at NCBI.

**3.2. pH에 따른 한천분해 효소의 활성**

각 pH에서의 한천분해효소의 활성을 Fig. 3에 나타냈다. 사용한 완충용액과 pH 중 최고의 활성을 나타내는 것은 20 mM Tris-HCl 완충용액에서 pH 7.0으로 나타났다. 또한, 20 mM Tris-HCl 완충용액으로 활성을 측정하였을 때 pH 5.0과 6.0에서 한천분해 상대활성이 85% 이상 유지되었고, pH 8.0에서는 79% 정도의 상대활성을 나타냈으므로 중성과 약산성 범위에서 높은 활성을 보였다. 또한, 20 mM GTA-HCl 완충용액을 사용하여 pH별로 한천분해효소의 활성을 측정한 결과

에서도 20 mM Tris-HCl 완충용액과 같이 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 보였다. 따라서 완충용액의 종류에 상관없이 pH 7.0이 최적 pH로 판단되었다. 균주에 따른 한천분해효소의 활성에 있어서의 최적 pH는 *Agarivorans* sp. JA-1의 효소의 경우 pH 8.0이었고 [9], *Bacillus cereus* ASK202의 효소의 경우 pH 7.8 [21], *Glaciecola* sp. SL-12와 *Thalassomonas* sp. SL-5 및 *Sphigomonas paucimobili* AS-1의 효소의 경우는 모두 pH 7.0으로 균주에 따른 한천분해효소의 다양한 최적 pH가 보고되어 있다 [10,11,22].



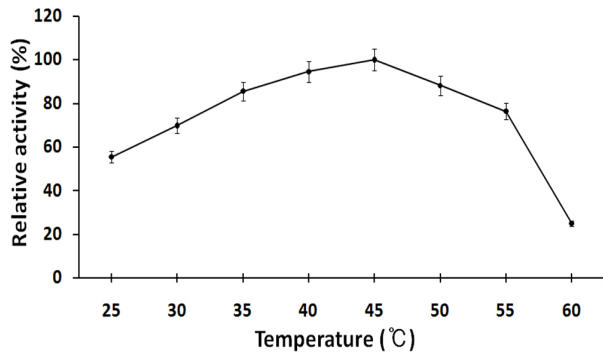
**Fig. 3.** Effect of pH on agarase activity. (a) ● 20 mM sodium acetate, pH 3.0-5.0; ■ 20 mM Tris-HCl, pH 5.0-8.0; ▲ 20 mM TAPS, pH 8.0-9.0. (b) 20 mM GTA buffer (pH 3.0-9.0).

**3.3. 온도에 따른 한천분해 효소의 활성**

최적 pH인 pH 7.0의 20 mM Tris-HCl 완충용액을 사용하였을 때 각 온도에서의 한천분해효소의 활성을 Fig. 4에 나타냈다. 가장 높은 활성을 나타낸 45°C의 반응온도에서 나타난 효소 활성을 100%로 하였을 때, 50°C에서 94%, 55°C에서 88%, 60°C에서 76%의 상대활성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이러한 결과로 *Flammeovirga* sp. mbrc-1가 생산하는 한천분해효소는 높은 온도인 60°C에서도 높은 상대활성을 나타내므로, 비교적 고온에 잘 견디는 효소라는 것을 알 수 있었다. 균주에 따른 온도별 최적활성은 *Glaciecola* sp. SL-12는 30°C였고 [11], *Thalassomonas* sp. SL-5와 *Sphigomonas paucimobili* AS-1는 40°C였는데 [10,22], 본 연구에서 분리한 *Flammeovirga* sp. mbrc-1 균주 유래의 한천분해효소는 이들보다는 5~15°C 정도 높은 온도에서 최적활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 고체한천을 가열하여 녹인 한천용액은

45°C 이하의 온도에서는 고체가 되는데, *Flammeovirga* sp. mbrc-1 유래의 한천분해효소는 45°C 이상의 온도에서도 높은 활성을 나타내므로 기질인 한천이 액체상태의 조건에서 분해 반응을 수행할 수 있어 보다 효율적인 한천분해공정의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

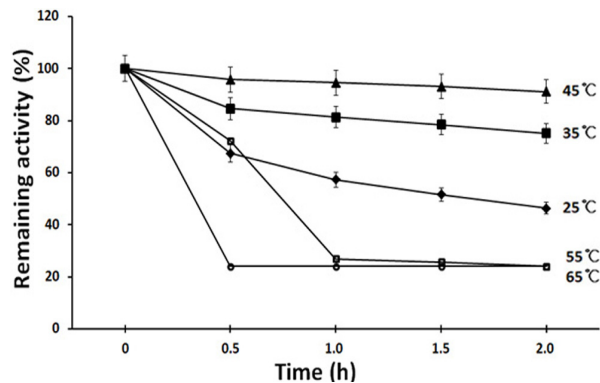
또한, 한천분해활성의 강도에 있어서도 *Flammeovirga* sp. mbrc-1 유래 한천분해효소의 최고활성이 923 units/L로 *Glaciecola* sp. SL-12의 233 units/L [11] 및 *Thalassomonas* sp. SL-5의 363 units/L [10] 보다 2.5~4.0배 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 4.** Effect of reaction temperature on agarase activity. The reaction was carried out at 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 or 65°C with 1 mL of 0.2% agar in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer and 0.5 mL of enzyme solution for 30 min.

**3.4. 한천분해 효소의 열안정성**

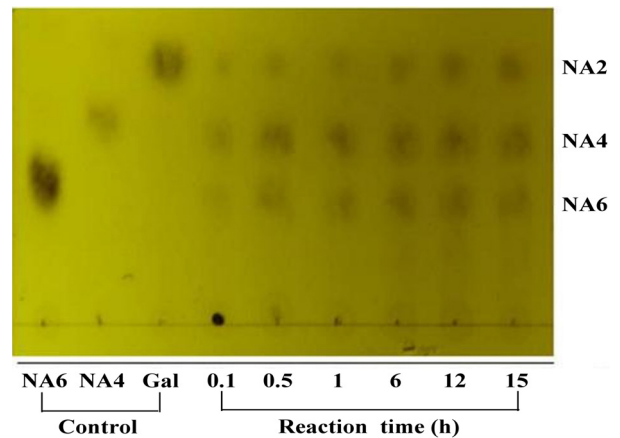
*Flammeovirga* sp. mbrc-1 유래 한천분해효소의 열안정성을 Fig. 5에 나타냈다. 45°C에서는 1, 1.5, 2시간의 열처리를 행해도 열처리하지 않은 효소에 비해 90% 이상의 상대활성을 유지하여 열안정성을 보였지만, 55°C에서는 30분간 열처리를 행했을 때 열처리하지 않은 효소 활성의 72%를 보였고 1시간이 지나면서 26%로 저하되어 열안정성을 보이지 않았다. 따라서 *Flammeovirga* sp. mbrc-1는 탁월한 내열성은 가지고 있지 않다고 판단할 수 있었다.



**Fig. 5.** Heat stability of agarase activity. The enzyme solution was pre-incubated at 25, 35, 45, 55 or 65°C for 0, 30, 60, 90 or 120 min. The reaction was then carried out at 25, 35, 45, 55 or 65°C with 1 mL of 0.2% agar in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer and 0.5 mL of heat-treated enzyme solution for 30 min.

**3.5. 한천 가수분해산물의 TLC 분석**

*Flammeovirga* sp. mbrc-1 균주를 3일간 배양하여 제조된 조효소액에 agarose를 기질로 첨가하여 시간별로 반응시킨 후 TLC로 분석한 결과를 Fig. 6에 나타냈다. 한천 혹은 agarose를 기질로 사용하면 β-agarase는 neoagarohexaose, neoagarotetraose 및 neoagarobiose를 생성할 수 있으며, α-agarase는 agaropentose 및 agarotriose를 생성할 수 있다 [23-25]. 반응시간이 경과함에 따라서 neoagarotetraose와 neoagarobiose의 농도가 증가하였으며, neoagarohexaose는 12시간까지 증가 (25%)하다가 15시간에는 감소 (13%)하는 양상을 보였다. 반응 0.1시간까지는 agarose가 완전히 분해되지 않아 neoagarohexaose, neoagarotetraose, neoagarobiose가 소량 생성되었고, 반응시간이 경과할수록 생성된 neoagarohexaose의 농도가 줄어들고 0.5시간부터 neoagarotetraose가 증가되었으며, neoagarobiose는 0.1시간에는 소량 생산되었지만 시간이 지날수록 농도가 증가하였다. 반응 15시간에는 agarose가 모두 분해되어 주로 neoagarobiose가 생산 (43.5%)되었고, neoagarotetraose도 생산 (38.0%)되는 것으로 나타났다. 따라서 *Flammeovirga* sp. mbrc-1 유래 한천분해효소가 β-agarase에 속하는 것으로 판단되었다 (Fig. 6). 본 연구에서 획득한 균주와 β-agarase는 보고된 다른 한천분해 효소처럼 배양조건의 최적화 [26] 혹은 cloning을 통한 과다발현으로 [14,16,27] 보습과 미백기능 소재물질의 생산에 유용하게 활용할 수 있을 것이다 [15,16].



**Fig. 6.** TLC analysis of the hydrolyzed products of agarose by agarase. The reaction was carried out at 45°C in 20 mM Tris-HCl (pH 7.0) buffer with enzyme solution for 0.1, 0.5, 1, 6, 12 or 15 h. The reaction mixture was developed by TLC. Gal, D-galactose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose.

**4. 결론**

기능성 한천올리고당 생산에 사용할 수 있는 생물자원을 확보하기 위하여 강원도 경포 연안에서 한천분해활성을 나타내는 해양성세균인 mbrc-1를 분리하였으며, 16S rDNA 염기서열분석으로 *Flammeovirga* sp. mbrc-1로 명명하였다. *Flammeovirga* sp. mbrc-1 균주가 생산하는 한천분해효소는

pH 7.0 (20 mM Tris-HCl 완충용액), 45°C에서 최적활성 (923 units/L)을 나타냈다. 45°C에서 2시간까지의 열처리에도 90% 이상의 잔존활성을 유지하는 열안정성을 보였다. TLC 분석으로 *Flammeovirga* sp. mbrc-1 균주가 생산하는 한천분해효소는 agarose를 분해하여 기능성 한천올리고당인 neoagarobiose와 neoagarotetraose를 각각 43.5%와 38% 생산하는  $\beta$ -agarase로 판명되어 이들의 산업적 생산에 활용이 가능할 것으로 기대된다.

## 감사

이 연구는 해양수산부 주관 마린바이오21사업 해양·극한 생물 분자유전체연구단의 지원을 받아 수행되었습니다.

## References

- Duckworth, M. and W. Yaphe (1971) Structure of agar. I. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 16: 189-197.
- Hong, J.-H., J.-J. Lee, S.-H. Hur, H. Choi, and J.-Y. Kong (2001) Effect of agarooligosaccharides on the growth of intestinal bacteria. *J. Food Hyg. Safety* 16: 11-15.
- Do, J.-H. (1997) Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Kor. Fish. Soc.* 30: 423-427.
- Yang, J.-I., L.-C. Chen, Y.-Y. Shih, C. Hsieh, C.-Y. Chen, W.-M. Chen, and C.-C. Chen (2011) Cloning and characterization of  $\beta$ -agarase AgaYT from *Flammeovirga yaeyamensis* strain YT. *J. Biosci. Bioeng.* 112: 225-232.
- Potin, P., C. Richard, C. Rochas, and B. Klarg (1993) Purification and characterization of the  $\alpha$ -agarase from *Alteromonas agarlyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B. *Eur. J. Biochem.* 214: 599-607.
- Kirimura, K., N. Masuda, Y. Iwasaki, H. Nakagawa, R. Kobayashi, and S. Usami (1999) Purification and characterization of a novel  $\beta$ -agarase from an alkalophilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 436-441.
- Schafer, H. (2007) Isolation of *Methylophaga* spp. from marine dimethylsulfide-degrading enrichment cultures and identification of polypeptides induced during growth on dimethylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2580-2591.
- Suzuki, H., Y. Sawai, T. Suzuki, and K. Kawai (2002) Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -neoagarooligosaccharide hydrolase from *Bacillus* sp. MK03. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 456-463.
- 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 thermotolerant agarase. *J. Life Sci.* 15: 884-888.
- Lee, D.-G., N. Y. Kim, M. K. Jang, and S.-H. Lee (2007) Isolation and characterization of a marine bacterium *Thalassomonas* sp. SL-5 producing  $\beta$ -agarase. *J. Life Sci.* 17: 70-75.
- Lee, D.-G., O.-H. Lee, H. J. Jang, M.-K. Jang, K. H. Yoo, and S.-H. Lee (2008) Isolation and characterization of a marine derived bacterium *Glaciecola* sp. SL-12 producing  $\beta$ -agarase. *J. Life Sci.* 18: 58-62.
- Jang, M.-K., O. H. Lee, K. H. Yoo, D.-G. Lee, and S.-H. Lee (2007) Secretary overexpression of  $\beta$ -agarase in *Bacillus subtilis* and antibacterial activity of enzymatic products. *J. Life Sci.* 17: 1601-1604.
- 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*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1933-1937.
- Lee, D.-G., G.-T. Park, N. Y. Kim, E.-J. Lee, M. K. Jang, Y. G. Shin, G.-S. Park, T.-M. Kim, J.-H. Lee, J.-H. Lee, S.-J. Kim, and S.-H. Lee (2006) Cloning, expression, and characterization of a glycoside hydrolase family 50  $\beta$ -agarase from marine *Agarivorans* isolate. *Biotechnol. Lett.* 28: 1925-1932.
- 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.
- Jang, M.-K., D.-G. Lee, N.-Y. Kim, K.-H. Yu, H. J. Jang, S. W. Lee, H. J. Jang, Y. J. Lee, and S.-H. Lee (2009) Purification and characterization of neoagarotetraose from hydrolyzed agar. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 1197-1200.
- Duckworth, M. and W. Yaphe (1970) Thin-layer chromatographic analysis of enzymic hydrolysate of agar. *J. Chromatogr.* 49: 482-487.
- Groleau, D. and W. Yaphe (1977) Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of  $\beta$ -neoagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* 23: 672-679.
- Shoichi, H. and Y. Akira (2007) *Flammeovirga kamogawensis* sp. nov., isolated from coastal seawater in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1327-1330.
- Takshashi, M., K. Suzuki, and Y. Nakagawa (2006) Emendation of the genus *Flammeovirga* and *Flammeovirga aprica* with the proposal of *Flammeovirga arenaria* nom. rev., comb. nov. and *Flammeovirga yaeyamensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2095-2100.
- Kim, B.-J., S.-H. Hwang, H.-J. Kim, Y.-S. Kang, S.-D. Ha, and J.-Y. Kong (1999) Characteristics of  $\beta$ -agarase produced by marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 14: 96-102.
- Jung, I. S., Y. J. Kim, H. J., Song, S. W. Gal, and Y. J. Choi (2008) Purification and properties of a novel extracellular agarase from marine bacterium, *Sphingomonas paucimobilis* AS-1. *J. Life Sci.* 18: 103-108.
- Araki, T., Z. Lu, and T. Morishita (1998) Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *J. Mar. Biotechnol.* 6: 193-197.
- Ohta, Y., Y. Hatada, M. Miyazaki, Y. Nogi, S. Ito, and K. Horikoshi (2005) Purification and characterization of a novel alpha-agarase from a *Glaciecola* sp. *Curr. Microbiol.* 50: 212-216.
- 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*): structure-function relationships and improved solubility. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 59: 1933-1939.
- Lee, S. A., J. U. Kim, J. G. Jung, I. H. Kim, S. H. Lee, S. J. Kim, and J. H. Lee (2006) Production of  $\beta$ -agarase in batch and fed-batch culture by *Agarivorans* sp. JA-1. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 389-393.
- Kong, J. Y., S. K. Bae, S. H. Hwang, S. D. Ha, H. T. Kim, S. K. Kim, and B. J. Kim (1996) Purification of extracellular agarase from marine bacterium (*Pseudomonas* sp. W7) and molecular cloning of the agarase gene. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 11: 37-45.