

해양세균 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 Agarase를 이용한 Agarooligosaccharides의 생산

김 봉 조 · ¹하 순 득 · 임 등 중 · 송 창 문 · †공 재 열
부경대학교 생물공학과, ¹동경대학교 응용생명공학과
(접수 : 1998. 5. 10., 게재승인 : 1998. 6. 29.)

Production of Agarooligosaccharides using of Agarase from Marine Bacterium *Bacillus cereus* ASK202

Bong-Jo Kim, ¹Soon-Duck Ha, Dong-Jung Lim, Chang-Moon Song, and Jai-Yul Kong[†]
Dept. of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
¹Dept. of Applied Biotechnology, The University of Tokyo, Yayoi 1-1-1 Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan
(Received : 1998. 5. 10., Accepted : 1998. 6. 29.)

An agarase was partially purified from the culture broth of marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. Optimal pH and temperature of this agarase were found to be 7.0 and 40°C, respectively. The maximum productivity of agarooligosaccharides was obtained from 0.3 % (w/v) agar by using of 1 unit agarase. As the results of TLC and HPLC analysis, these oligosaccharides consisted of neoagarobiose, neoagarotetraose and neoagarohexaose. Under the optimal reaction conditions, 77.5 % (w/v) neoagarobiose and 6.2 % (w/v) neoagarotetraose were produced from agar and the conversion yield of total agarooligosaccharides was 83.7 % (w/v) after for 2 h reaction at 40°C.

Key Words: *Bacillus cereus*, agarase, agarooligosaccharide, hydrolysis

서 론

당류는 오래전부터 칼로리원이나 맛을 내는데 필요한 물질로 인식되어 왔다. 그러나, 이들 당류의 생체내에서의 역할이 재조명되면서 부터 당류에 대한 인식이 크게 변화하고 있으며, 당쇄공학이라는 영역으로 그 연구가 활발하게 이루어 지고 있다 (1). 그 중에서도, 올리고당은 bifidobacteria의 활성촉진, 장내세균군의 개선, 항콜레스테롤 효과, 그리고 생체조절인자 등의 역할이 알려지면서 주요한 연구대상으로 주목되어지고 있다 (2). 이러한 올리고당에 관한 연구는 지금까지 주로 육상식물을 중심으로 이루어져 왔으며, 해조류 유래나 올리고당의 기능성에 대한 연구도 일부 보고되고 있다 (3, 4). 그러나, 국내의 경우에는 아직까지 소재개발 및 기능연구 나아가서는 제품개발에 관한 보다 많은 연구가 필요한 실정이다 (4).

한편, 한천은 오래전부터 식품첨가물, 의약품, 화장품, 가축사료 및 공업원료 등으로 널리 이용되고 있는 대표적인 해조류이다. 그러나 국내에서 생산되고 있는 한천의 경우, 해마다 그 생

산량이 3,600 톤(약 50 억원)에 이르고 있으나, 이 중에서 65 % 정도만이 단순가공되어 값싼 원료로 사용되어질 뿐이며 그 나머지의 대부분이 방치되고 있는 실정이다 (5). 특히 시약용이나 의약용으로 사용되고 있는 고가제품의 경우에는 오히려 수입에 의존하고 있어, 풍부한 국내 생산량을 지닌 한천의 새로운 용도개발을 통한 부가가치 향상에 관한 연구가 크게 요구되고 있다. 이러한 배경하에, 최근들어 외국에서는 한천의 분해에 의해 생성되는 한천올리고당의 기능특성이 밝혀짐에 따라 새로운 기능성 식품소재로서의 이용 가능성이 크게 기대되고 있다. 지금까지 조사된 바에 의하면 한천올리고당은 전분노화에 대한 억제작용이 강하고, 정균작용, 정장작용과 같은 특성을 지니고, 당뇨병, 비만, 변비 등의 치료효과가 있는 것으로 알려져 왔다 (6-8) 이와같은 한천올리고당은 한천의 산가수분해 또는 효소분해에 의해 생성되지만, 산가수분해시에는 한천에 함유되어 있는 고유의 비타민이나 무기질 등이 다량 파괴되고 올리고당의 기능성 유지 및 안정성 유지등이 문제가 되기 때문에 효소분해에 의한 방법이 보다 유용한 것으로 알려져 있다. 따라서, 한천올리고당의 대량생산 또는 산업적 이용을 위해서는 우선적으로 고활성을 지닌 한천분해효소 및 이를 이용한 한천올리고당의 대량생산에 관한 연구개발이 이루어져야만 할 것이다. 이미 본 연구자 등은 한국 남해안으로부터 뛰어난 한천분해능을 지닌 새로운 해양세균을 분리하여 그 특성에 관하여 보고한 바 있으며, *Bacillus cereus* ASK202로 명명된 본 균주는 최적배양조건하에서 161 units/L

† Corresponding author : Dept. of Biotech & Bioeng, Pukyong National University, 599-1, Deayeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea
Tel : 82-51-620-6181, Fax : 82-51-620-6181
e-mail : kongjy@dolphin.pknu.ac.kr

의 한천분해효소를 생산하였다 (9). 이미 보고된 *Vibrio* sp. strain JT0107 (10, 11), *Pseudomonas* sp. PT-5 (12), *Vibrio* sp. AP-2 (13) 그리고 *Pseudomonas atlantica* (14) 유래 한천분해효소 생산량과 비교한 결과, 본 실험에 사용한 *Bacillus cereus* ASK202 균주가 생산하는 한천분해효소는 약 2.5 ~ 35 배 가량 생산능이 뛰어난 것으로 확인되었다.

이에 본 연구에서는 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 한천분해효소를 이용하여 한천올리고당의 생성을 위한 효소의 최적반응조건을 검토하고, 생성된 한천올리고당의 특성에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

시약

한천(Agar)은 Junsei Co. (Japan)로부터 구입하였고, 생성되는 한천올리고당의 분석을 위하여 사용된 neoagarohexaose, neoagartetraose, neoagarobiose 등은 Sigma Chemical Co. (USA)의 특급시약을 사용하였다. 기타 다른 시약들은 특급 혹은 분석용 시약을 사용하였다

미생물 배양 및 배지조성

Bacillus cereus ASK202 배양을 위한 기본배지로서는 1L의 인공해수 (중류수 1L에 NaCl 230 g, KCl 0.7 g, MgCl₂ · 6H₂O 10.6 g, CaCl₂ 1.1 g, Na₂SO₄ 3.9 g, NaHCO₃ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 10 g, K₂HPO₄ 0.01 g, Tris-base 6.05 g를 첨가, pH 7.8)에 Bacto peptone 5 g, yeast extract 1 g, ferric citrate 0.1 g, ammonium nitrate 0.0016 g, disodium phosphate 0.008 g이 첨가된 배지를 사용하였다 (9).

효소생산을 위한 균주배양시에는 기본배지에 0.3 % (w/v)의 한천을 첨가하여, 25°C에서 48시간동안 1차 증균배양 시킨 후, 그 배양액 10 mL를 기본배지 500 mL가 들어있는 1 L 삼각 flask에 접종하여 25°C에서 180 rpm으로 36시간 진탕배양하였다.

조효소의 제조

2차배양에서 얻어진 세균배양액을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여, 균체를 제거한 후 배양 상층액을 회수하였다. 회수된 배양상층액은 Millipore Co. (Massachusetts, USA)의 한외여과장치(PREP/scale™-TFF cartridge, 30kDa)를 이용하여 부분정제하였으며, 부분정제된 한천분해효소는 10 mM MOPS 완충용액 (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid, pH 7.0)으로 투석한 후 동결건조를 행하였다. 동결건조된 조효소는 이후 한천올리고당의 생성실험에 이용하였다.

환원당 및 전당량의 측정

한천분해효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogyi-Nelson 법(15)으로 행하였다. 0.1 % (w/v)의 agar가 첨가된 10mM MOPS 완충용액 (pH 7.0)을 중탕가열하고 40°C까지 서서히 냉각시킨 후에 agarase를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 효소반응에 의해 생성되는 환원당량은 Somogyi시약을 첨가하여 10분간 끓이고, 실온으로 냉각시킨 후, arsenomolybdate 시약을 첨가하여, 12,000 rpm에서 2분간 원심분리한 반응 상층액의 환원당 값을 510 nm에서 측정함으로써 구하였다. 한편, 한천분해효소의

활성에 대해서는 1분당 1 μmol의 galactose를 생산할 수 있는 효소의 양을 1unit로 정의하였다(9).

전당량(total sugar)은 Phenol-sulfuric acid 법(5)에 의해 구하였다. 시료 용액 0.2 mL를 시험관에 취하여, 5 % (v/v) phenol용액 0.2 mL를 첨가한 후, 진한 황산 1.0 mL를 서서히 적하하여 느린속도로 발열반응을 진행시키면서 혼합하였다. 이 반응액을 20-30분간 실온에서 방치한 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선으로부터 전당량을 계산하였다. 반응 후 생성된 올리고당의 분리는 채취된 시료를 15,000 rpm에서 30분간 원심분리한 다음, 분리된 상층액을 이용하여 생성된 올리고당을 측정하였다.

분해물(전환율) 측정

효소반응에 따른 한천의 분해율은 아래와 같이 반응전 기질로 사용된 한천의 전당량에 대한 생성 올리고당의 전당량의 비로써 나타내었다.

$$\text{분해율 (\%)} = \text{생성 올리고당의 전당/반응전 한천의 전당} \times 100$$

Thin layer chromatography (TLC)

올리고당의 생성에 대한 확인은 박층크로마토그래피를 이용하였다. 이때 사용된 전개판은 Merck사의 Kieselgel 60 plate를 이용하였으며, 전개용매로서는 n-butanol, acetic acid, distilled water를 2:1:1의 부피비로 섞어 사용하였다. 전개판은 ethanolic sulphuric acid (375 mL of ethanol plus 100 mL of conc. sulphuric acid)로 처리하여 건조시켰으며, 0.2 % (w/v) naphthoresorcinol solution (naphthoresorcinol in ethanol)으로 도포한 후 110°C에서 10분간 가열함으로써 발색되는 올리고당을 표준 올리고당과 비교하여 확인하였다 (16).

생성된 올리고당의 분석

생성된 한천올리고당의 정량분석은 HPLC를 이용하였으며, 당 분석용 칼럼으로서 Aminex HPX-42A (300 mm × 7.8 mm, Bio-Rad, USA)를 이용하였다 (17). 그리고, 당굴절을 검출기로는 Hewlett Packard Co.의 HP1047A 모델을 사용하였고, 초순수 증류수(18 megaohm · cm)를 이동상으로 사용(0.8 mL/min)하였으며, 칼럼온도는 80°C로 일정하게 유지하였다.

결과 및 고찰

한천분해효소의 활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

Figure 1은 한천분해효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과이다. 0.1 % (w/v)의 한천기질용액에 10 unit에 해당하는 한천분해효소를 첨가한 후, 20~60°C의 범위에서 각 온도별로 40분 동안 반응시킨 결과, 40°C에서 최대활성을 나타내었다. 또한, 실험에 사용된 효소는 35~45°C의 온도범위에서는 상대적으로 매우 안정된 활성을 보였으나, 50°C 이상에서는 효소활성이 급격히 감소하여 60°C 이상에서는 효소활성이 거의 상실되었다.

한천분해효소의 활성에 미치는 pH의 영향에 대해서도 조사하였다 (Figure 2). 이때의 pH조절에 사용된 완충용액으로서 pH 3.0~7.0까지는 10 mM Citric acid-sodium citrate buffer, pH 6.0~8.0까지는 10 mM MOPS buffer, pH 7.0~9.0까지는

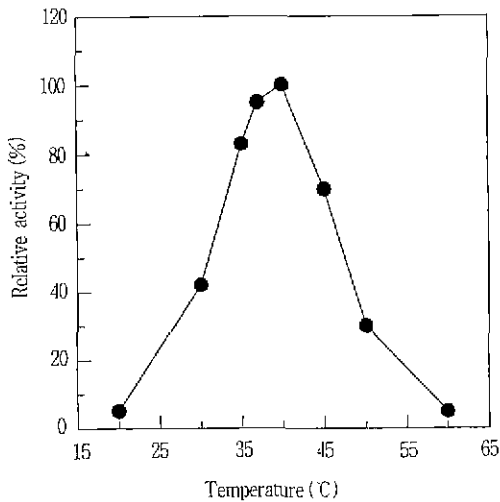


Figure 1. Effect of temperature on the agarase activity. Enzyme activity was measured at various temperatures in 10mM MOPS buffer, pH 7.0 for 40 min.

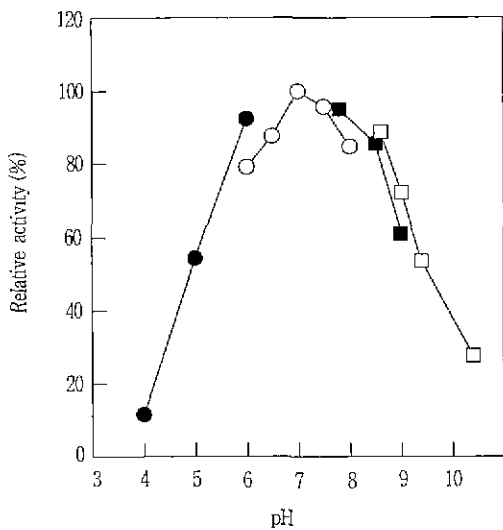


Figure 2. Effect of pH on the agarase activity.

●, 10mM Citrate acid-sodium citrate buffer (pH 3.0 to 7.0); ○, 10mM 3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid (pH 6.0 to 8.0); ■, 10mM Tris-HCl buffer (pH 7.0 to 9.0) and □, 10mM Glycine-NaOH buffer (pH 8.0 to 10.6)

10 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0~10.6까지는 10 mM Glycine-NaOH buffer를 사용하였다. 그 결과 그림에서 보여주는 바와 같이 pH 6.0~9.0의 범위에서 효소의 활성이 비교적 높게 나타났으며, pH 7.0에서 최대값을 보였다. 이는 보고된 다른 미생물유래 한천분해효소의 최적온도 범위 25~50°C와 최적 pH 범위 5.0~8.0로 보고된 것과 거의 유사한 효소학적 특성을 가지는 것으로 확인되었다(18-20) 따라서, 이후의 실험에서는 온도 40°C, pH 7.0에서 효소반응 실험을 행하였다.

한천올리고당의 생성에 미치는 초기기질 및 효소농도의 영향

초기 기질 농도를 달리하여 한천올리고당의 생성량을 조사한 결과, Figure 3에서 나타난 바와 같이 한천의 농도별로 반응초기

에는 빠른 속도로 한천올리고당이 생성되어 반응시간 약 1시간 30분 이후부터는 생성량이 일정한 값을 나타내었다. 특히, 초기 반응속도는 0.2%(w/v)의 기질농도에서 가장 빠른 것으로 나타났으며 0.3%(w/v)이상에서는 기질농도가 증가함에 따라 오히려 초기 반응속도가 감소하는 경향을 보였다. 이는 한천의 경우 0.3%(w/v) 이상의 농도에서는 그 특성상 37~39°C 범위에서 겔화가 시작되어 겔형성에 의한 효소와의 친화력이 감소하기 때문인 것으로 사료된다. 그러나, 0.3%(w/v)의 한천농도에서는 비록 효소의 초기반응속도는 감소하였으나, 최종적인 올리고당의 생성량은 최대값을 보여, 이후 실험에서는 최적 기질농도를 0.3%(w/v)로 하였다.

한천의 효소학적 가수분해 반응에서 0.3%(w/v) 한천기질용액 50 mL를 기준으로 한천분해효소를 0.5 ~ 3.0 units 첨가하여 반응하였을 때 효소농도에 따른 한천올리고당의 생성량을 조사하였다 (Figure 4). Figure 4에서 나타난 바와 같이 한천농도를 0.3%(w/v)로 고정된 후 그에 따른 한천분해효소 첨가량을 증가시켜 2시간동안 반응시킨 후 생성된 한천올리고당을 조사한 결과

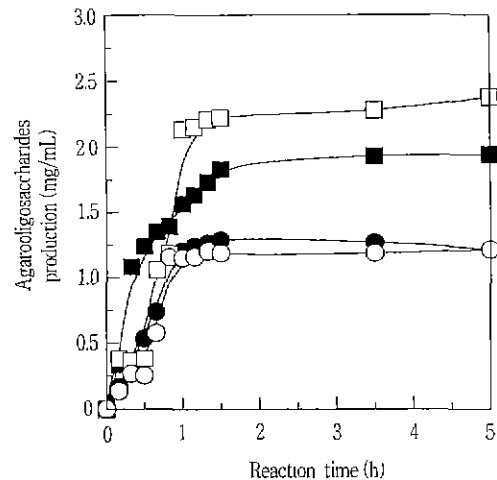


Figure 3. Effect of agar concentration on the neoagarooligosaccharides production with 10U agarase.

○, 0.1%; ■, 0.2%; □, 0.3%, ●, 0.4%

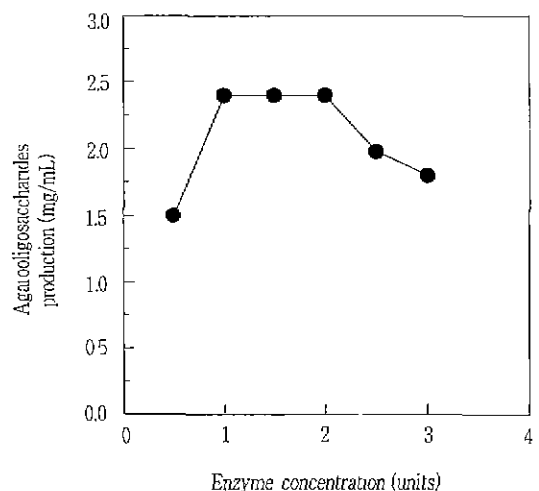


Figure 4. Effect of enzyme concentration on the agarooligosaccharides production with 0.3% (w/v) agar.

1 ~ 2 units 첨가시에 가장 높은 전환율을 나타내었다. 이에 비하여 2 units 이상 효소를 첨가하였을 경우에는 오히려 한천올리고당의 생성량이 조금 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 본 실험에 사용한 한천분해효소의 경우, 부분정제된 효소를 사용하였기 때문에 순수정제된 효소를 사용하였을 때와는 달리 효소중에 포함되어 있는 불순물의 영향인 것으로 사료된다. 이후 실험에서는 0.3 % (w/v) 한천기질과 효소첨가량은 1.0 unit를 사용하여 실험을 행하였다.

생성 올리고당의 분석

부분정제한 한천분해효소를 이용하여 agar, agarose, neoagarohexaose, neoagarotetraose 등의 기질과 반응시킨 후 그 분해 생성물에 대해서 TLC를 이용하여 분석하였다 (Figure 5). 그 결과 올리고당류의 생성을 확인하였으며, 이들 생성올리고당류에 대하여 R_f값을 표준올리고당과 비교한 결과, 중합도 2, 4, 6의 올리고당으로 이루어져 있음을 알 수 있었다 (Table 1).

또한, 0.3 % (w/v)의 agar와 1 unit의 부분정제효소를 이용하여 10분간 반응시킨후, 생성물에 대하여 HPLC를 이용한 정량 분석 결과에서도 neoagarobiose, neoagarotetraose 및 neoagarohexaose가 생성됨을 확인하였다 (Figure 6). 한천은 galactose를 기본으로 한 α-1,3, β-1,4의 반복구조로서 분해산물은 중합도 2, 4, 6당이 주로 생성되는 것으로 보아 *Bacillus cereus* ASK202 유래 한천분해효소는 β-1,4 결합구조만 절단하는 β-agarase인 것으로 사료된다.

Table 1. Comparison of agarooligosaccharides obtained from agar and neoagarooligosaccharides by agarase^a.

substrate	Okigosaccharide	Degrees of polymerization	R _f ^b
Standard	Neoagarohexaose	6	0.27
	Neoagarotetraose	4	0.40
	Neoagarobiose	2	0.53
	Galactose		0.46
A	Product 1		0.54
	Product 2		0.39
	Product 3		0.27
B	Product 1		0.54
	Product 2		0.40
C	Product 1		0.54
	Product 2		0.40

^a Thin-layer chromatography was perform on glass plates containing silica gel 60

^b Solvent is n-butanol-acetic acid-water (2:1:1, v/v/v)

A · agar

B · neoagarohexaose

C · neoagarotetraose

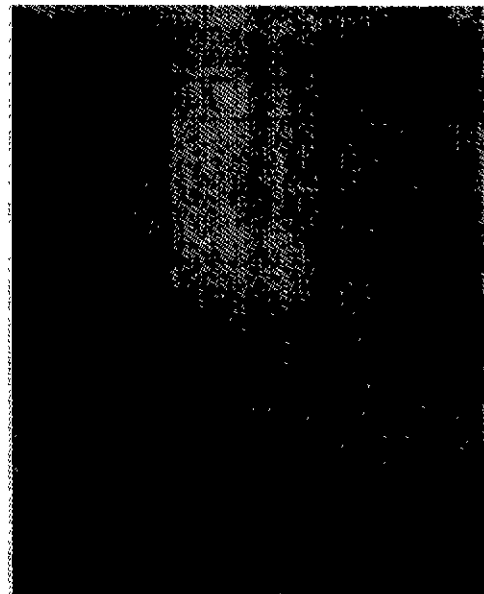


Figure 5. TLC analysis of the enzymatic hydrolysis products from agar(L), neoagarohexaose (M) and neoagarotetraose (N). Samples taken at 10 min were analyzed by TLC Lane A, galactose. B, neoagarobiose; C, neoagarotetraose; D, neoagarohexaose represents the standard sugars, respectively.

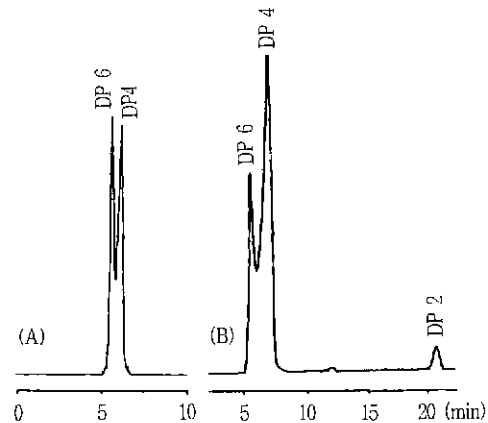


Figure 6. HPLC analysis of the agar hydrolysis products, numbers in the under mean the retention time (min) and DP refer to the degree of polymerization of the products (A) Standard of agarooligosaccharides; (B) agar hydrolyzates

최적반응조건하에서 한천올리고당의 생산

앞선 실험에서 결정된 최적반응조건하에서 반응시간에 따른 각 한천올리고당의 생성율을 HPLC를 사용하여 조사한 결과, 반응초기에 각 한천올리고당은 빠른 속도로 생성되어 반응 1시간 이후부터는 일정한 양상을 보였다.

그리고, 본 실험결과로부터 agarobiose가 본 반응의 주생성물임을 알 수 있었으며, 일부 agarotetraose가 생성됨을 확인하였다 (Figure 7). 한편 agarohexaose의 경우에는 그 생성이 확인되지 않았으며, 이는 반응초기에 효소와 기질의 반응이 빠르게 진행되어 생성된 agarohexaose가 agarobiose 및 agarotetraose로

Table 2. Composition of agarooligosaccharides produced from agar by agarase at the optimized reaction condition

Agarooligosaccharides	Composition (%. w/w)
Agar	16.3
DP2	77.5
DP4	6.2
DP6	-
Total	100.0

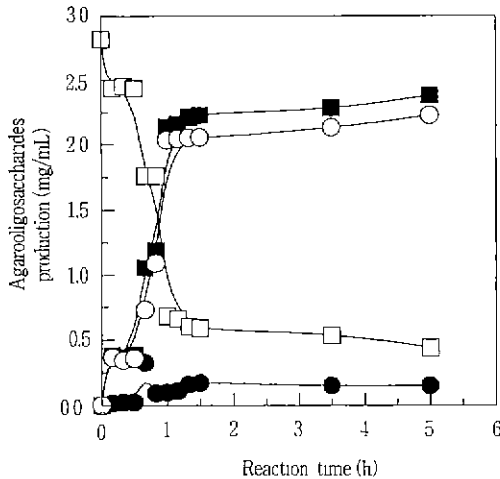


Figure 7. Production of agarooligosaccharides under optimum reaction condition, □, agar, ■, total agarooligosaccharides; ○, DP2, ●, DP4

전환되었기 때문으로 사료된다. 또한 기질로 사용된 한천으로부터 한천올리고당의 전환율을 조사한 결과 agarobiose가 77.5 % 그리고 agarotetraose가 6.2% 생성되었으며, 효소에 의해서 분해되지 않은 잔존 한천량이 16.3%임을 확인하였다 (Table 2).

이상의 결과로부터 0.3%(w/v) 한천기질과 10 unit 한천분해효소를 사용하여 40°C, pH 7.0의 조건하에서 약 2시간동안 반응시켰을 경우, 약 83.7%의 높은 전환율의 한천올리고당이 생성됨을 알 수 있었다. 더우기, 기질과 효소의 비율(S/E) 및 반응시간을 적절히 조절함으로써 필요로 하는 각 한천올리고당의 분리가 가능할 것으로 사료된다.

요약

한국 남해안으로부터 분리되어 한천분해능이 뛰어난 것으로 확인된 해양세균 *Bacillus cereus* ASK202를 이용하여, 그 배양액으로부터 한천분해효소를 부분 정제하였다. 부분 정제된 한천분해효소의 최적 온도 및 pH는 각각 40°C와 7.0이었으며, 0.3%(w/v)의 한천을 기질로 사용하여 1 unit에 해당하는 부분 정제효소와 반응시킨 결과 최대의 한천올리고당 생성량을 보였다. 생성된 올리고당에 대하여 TLC와 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 중합도 2, 4, 6 당의 neoagarobiose, neoagarotetraose, neoagarohexaose로 이루어져 있음을 확인하였다. 또한, 상기조건하에서 2시간 동안 반응시킨 후, 기질로부터 생성되는 올리고당의 전환율을 조사한 결과, 77.5%의 neoagarobiose와 6.4%의 neoagarotetraose가 생성되어 최종

올리고당의 전환율은 83.7%로 높은 수율을 보였다. 한편, 기질과 효소의 장시간 반응시에는 반응초기에 생성되는 agarohexaose가 agarobiose 및 agarotetraose로 전환되는 것으로 사료되며, 기질 및 효소의 농도비와 반응시간을 적절히 조절함으로써 필요로 하는 각 한천올리고당의 선택적 분리가 가능할 것으로 기대된다.

사사

본 연구는 1996년도 해양수산부 특정연구과제 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 깊은 감사를 드립니다.

참고 문헌

1. 佐佐木隆造(1993), 糖鎖の生物機能, 日本農藝化學會誌, 67, 1727-1731.
2. Yoshika, H., K. Fujita, H. Sakata, K. Murono, and K. Iseki (1991), Development of The Normal Intestinal Flora and Its Clinical Significance In Infants and Children, *Bifidobacteria Microflora*, 10, 11-17
3. Kindness, G. F. B. Williamson, and W. F. Long (1980), Inhibition by Antithrombin III of Carrageenan and Xylan SP54-induced Aggregation of Human Blood Platelets, *Biochem. Soc Trans*, 8, 84-92.
4. Joo, D. S., J. S. Lee, J. J. Park, and S. Y. Cho (1996), Preparation of Oligosaccharides from Alginic Acid by Enzymic Hydrolysis, *Korean J. Food Sci Technol*, 28, 146-151
5. 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. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 11, 37-45
6. 河野敏明, 徳永隆久, 日高秀昌, 三好照三, 北川廣進, 平賀哲男, 片所 功 (1987), 新規有用ヘテロオリゴの研究 - ネオアガロオリゴ糖の性質. 日本農藝化學會人 會講演要旨集, p777, Tokyo.
7. 河野敏明, 日高秀昌 (1989), ネオアガロオリゴ糖の特性とその生産技術. 日本農 藝化學會誌, 63(6), 1126-1129.
8. 河野敏明, 山口美樹, 山口吾一, 日高秀昌, 三好照三, 北川廣進, 平賀哲男, 片所功 (1988), 寒天分解酵素生産菌の分離とその酵素の性質, 日本水産學會大會講 演要旨集, p. 345, Tokyo.
9. Lee, H. W., B. J. Kim, S. H. Hwang, and J. Y. Kong (1997), Isolation and Identification of Marine Bacterium *Bacillus cereus* ASK202 and Optimal Culture Conditions for The Production of Agarase, *Korean J Biotechnol Bioeng.*, 12, 228-235.
10. Yamazaki, Y. (1995), Production and Characteristics of Some New β -Agarase from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Fermentation Bioengineering.*, 79, 549-554.
11. Sugano, Y., H. Kodama, I. Terada, Y. Yamazaki, and M. Noma (1994), Purification and Characterization of

- Novel Enzyme, α -Neoagaroolig- α -D-glucopyranoside Hydrolase (α -NAOS Hydrolase), from a Marine Bacterium, *Vibrio* sp. Strain JT0107, *J. Bacteriol.*, **176**(22), 6812-6818.
12. 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.
 13. Aoki, T., T. Araki, and M. Kitanikado (1990), Purification and Characterization of a Novel β -Agarase from *Vibrio* sp. AP-2. *Eur. J. Biochem.* **187**:461-465.
 14. Groleau, D. and W. Yaphe (1997), Enzymatic Hydrolysis of Agar: Purification and Characterization of β -neoagarotetraose Hydrolase from *Pseudomonas atlantica*, *Can. J. Microbiol.*, **23**, 672-679.
 15. Somogyi, M. (1952), Notes on Sugar Determination, *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23.
 16. Duckworth, M., and W. Yaphe (1970), Thin-layer Chromatographic Analysis of Enzymic Hydrolysates of Agar, *J. Chromatogr.*, **49**, 482-487.
 17. Kim, D. H., Y. J. Choi, S. K. Song, and J. W. Yun (1997), Production of Inulo-oligosaccharides using Endo-inulinase from a *Pseudomonas* sp., *Biotech. Lett.*, **19**, 369-371.
 18. 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**, 1594-1554.
 19. Potin, P., C. Richard, C. Rochas, and B. Kloareg (1993), Purification and Characterization of The α -agarase from *Alteromonas agaralyticus* (Cataldi) comb. nov., strain GJ1B, *Eur. J. Biochem.*, **214**, 599-607.
 20. Leon, O., L. Quntana, 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.