

한천분해효소를 생산하는 *Agarivorans sp. JA-1*의 배양조건 및 Fed-batch 배양

²이 송 애 · ²김 진 옥 · ²정 종 근 · ¹김 인 혜 · ^{1,2}이 상 현 · ³김 상 진 · † ^{1,2}이 재 화
¹신라대학교 의생명과학대학 제약공학과, ²신라대학교 공과대학 생명공학과, ³한국 해양 연구원, 해양자원 연구본부
(접수 : 2006. 7. 28., 게재승인 : 2006. 10. 23.)

Production of β -agarase in Batch and Fed-batch Culture by *Agarivorans sp. JA-1*

Song-Ae Lee², Jin-Uk Kim², Jong-Geun Jung², In Hae Kim¹, Sang-Hyeon Lee^{1,2}, Sang-Jin Kim³, and Jae-Hwa Lee^{1,2}

¹Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science

²Department of Bioscience and Biotechnology, College of Engineering,
Silla University, Kwaebop-dong 1-1, Sasang-gu, Busan 607-736, Korea

³Department of Marine Resources Research, Korean Ocean Research and Development

(Received : 2006. 7. 28., Accepted : 2006. 10. 23.)

Characteristics of β -agarase production of *Agarivorans sp. JA-1* isolated from north-eastern sea of Jeju marine environment was studied. Optimal cell growth was definite that the medium containing agar is 0.2%. The decreasing pattern of viscosity and agar concentration was same and they reached almost zero after 15 hours. Fed-batch culture was studied to improve agarase productivity by *Agarivorans sp. JA-1* in marine broth containing 2.0 g/L agar with intermittent addition of 0.8 g agar two times. The hydrolysis products were identified oligosaccharide of degrees of polymerization 6.

Key Words : *Agarivorans sp. JA-1*, agar, agarase, oligosaccharide, fed-batch culture

서 론

한천 (agar)은 몇몇 적조류 (red algae)의 세포벽을 구성하는 성분으로써 agarose와 agaropectin으로 구성된다. Agarose는 3-O-linked β -D-galactopyranose와 4-O-linked 3,6-anhydro- α -L-galactose가 한 단위로 β -1,4 결합으로 이루어져 있다 (Fig. 1). Agaropectin은 agarose와 같은 기본적인 당사슬의 반복적 결합으로 이루어져 있으며 수산화 결합의 3,6-anhydro- α -L-galactose 잔기가 sulfoxy, methoxy, pyruvate 등의 결합으로 이루어져 있다(1, 2).

현재 한천은 식품첨가물, 의약품, 화장품, 가축사료 및 공업원료 등으로 널리 이용되고 있는 대표적인 해조류 유래의 생물고분자이다. 그러나 국내에서 생산되고 있는 한천의 경우, 연간 생산량이 3,600 톤 (약 50억원)에 이르고

있으나, 이 중에서 6.5% 정도만 단순 가공되어 값싼 원료로 사용되어질 뿐이며 그 나머지의 대부분은 방치되고 있다. 특히 시약용이나 의약용으로 사용되고 있는 고가제품의 경우에는 오히려 수입에 의존하고 있어, 풍부한 국내 생산량을 지닌 한천의 새로운 용도개발을 통한 고부가가치 향상에 관한 연구가 요구되고 있다(3).

한천의 분해산물인 한천 올리고당은 세균 성장억제, 대식세포의 활성화, 보습 및 미백효과 등과 같은 많은 유용한 기능을 나타내며, 이러한 점을 활용한 제품은 부가가치가 매우 높은 것으로 알려져 있다(4). 특히 기존의 다른 올리고당에 비하여 전분노화의 억제작용이 강할 뿐만 아니라 기존의 상업적으로 생산되고 있는 각종 올리고당 제품에 비하여 체내 흡수율이 높으며, 단당류의 함량이 가장 낮은 올리고당으로 확인된 바 있다. 한천을 이용하여 기능성 한천올리고당을 생산하기 위해서는 한천분해능을 지닌 한천분해효소 (agarase)의 생산이 우선적으로 필요하며, 지금까지 보고된 한천분해효소는 미생물을 중심으로 한천분해효소의 생산에 관한 연구만이 이루어지고 있는 실정이다(5). 그 예를 보면, Morrice 등은 *Pseudomonas atlantica*로부터 2종류의 agarase를 발견하였고(6), Aoki 등은 *Vibrio*

† Corresponding Author : Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical Life Science, Silla University, Kwaebop-dong 1-1, Busan 617-736, Korea

Tel : +82-51-999-5748, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : jhalee@silla.ac.kr

sp. AP-2로부터 neogalactose를 생산하는 agarase를 발견하는 등(7), 현재까지 한천을 분해하는 효소는 bacteria, actinomycetes(8)등에서 많이 연구 보고되었으며, 특히 *Pseudomonas sp.*를 대상으로 많은 연구가 수행되어져 왔다 (6, 10, 11).

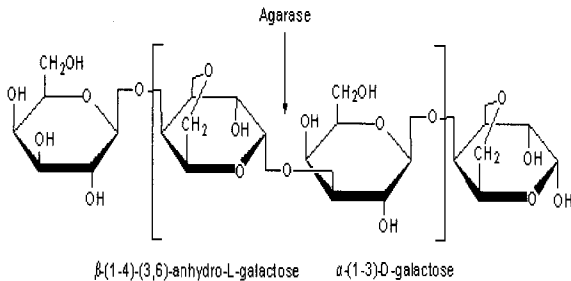


Figure 1. Schematic diagram showing a oligosaccharide unit of agar. The dawn arrow was β -(1,4) bond cleaved by agarase.

본 연구진은 지금까지 보고되지 않은 우수한 한천 분해능을 지닌 해양미생물을 제주도 연안해에서 분리, 높은 한천분해능을 가지는 균주를 발견하였다. 분리된 균주의 유전적 서열을 동정한 결과 *Agarivorans* 속 (genus)으로 확인하였으며, 이후 *Agarivorans sp. JA-1*로 명명하였고, 효소 반응의 최적조건으로 pH 7.8~8.0, 30~60°C에서 활성을 보이는 고열성 효소로 확인되었다(9).

이에 본 연구에서는 해양유래의 한천분해효소를 생산하는 *Agarivorans sp. JA-1*의 교반배양에 의한 agarase 생산수율을 향상시키기 위하여 한천을 탄소원으로 하여 fed-batch 배양을 통한 agarase 생산에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

배양조건 및 배지 내 한천농도 측정

실험에 사용한 배지는 marine broth 2216 (Difco, Detroit, USA)을 사용 하였으며, 시험관에 marine broth 배지 5.0 mL에 균주를 접종하여 12시간 배양 후, 50 mL의 배지가 들어 있는 300 mL의 삼각플라스크에 1% (v/v)의 농도로 균체를 접종하고 shaking incubator를 이용하여 배양조건 30°C, 250 rpm에서 계대배양 하였다. 균주 배양은 300 mL의 삼각플라스크에 50 mL를 working volume으로 하여 단위 시간마다 600 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. 배지 내 한천 농도에 따른 성장곡선은 균주 배양 방법과 동일하게 계대 배양한 후, 삼각플라스크 내 한천의 농도를 각각 0~0.6% (w/v)를 첨가한 새로운 배지에 균주를 접종하여 균주 성장을 확인하였다.

Fed-batch 배양에서는 *Agarivorans sp. JA-1*의 탄소원인 한천을 일정량 공급하였다. 1.0 L 삼각 플라스크에 0.2%의 한천이 첨가된 marine broth 400 mL에 균주를 접종한 후 48시간 진탕배양 하였다. 첨가한 탄소원으로는 배양배지 내 한천농도가 0.2%가 되도록 농축한 한천용액 (8.0 g/L)과 marine broth 용액을 일정량 공급하였다. 3시간별로 20 mL

씩 sampling하였으며 15시간 때와 21시간 때 한천을 첨가하였고, marine broth 첨가는 15시간 때 첨가한 후 21시간 때는 균체가 더 이상 자라지 않아 첨가하지 않았다.

탄소원에 따른 균주의 성장측정

탄소원에 따른 균주의 성장은 균주 배양 방법과 동일하게 계대배양한 후, 기본배지 내 1.0% (w/v)의 농도로 탄소원을 첨가하여 배양하였다. 탄소원으로는 D-glucose (Daejung chemical, Korea), D-galactose (Research chemical, England), D-sucrose (Yakuri, Japan), D-fructose (Junsei, Japan)를 사용하였다.

효소활성 측정

효소활성은 균주 배양 시간에 따라 회수한 배양액을 원심 분리 (12000 × g, 4.0°C, 10 min)한 후 얻어진 상층액을 사용하였다. 0.2%의 한천 (w/v)이 포함된 50 mM TAPS (N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropane sulfonic acid-NaOH (Sigma, St, Louis) buffer (pH 7.8) 1.0 mL에 상층액 500 μ l를 혼합한 후, 30분 동안 항온조에서 반응시킨 다음 효소활성을 측정하였다. 한천분해효소의 반응산물인 환원당의 측정 은 Somogy-Nelson법(12)으로 행하였다. 그 방법은 반응액 500 μ l에 2.0 mL Somogy-Nelson 시약 (10% CuSO₄; 80 mL, 1N NaOH; 100 mL, Na₂SO₄; 180 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O; 71 g, C₄H₄O₆KNa · 4H₂O; 40 g /ddH₂O; 1.0 L)을 시험관 내에서 혼합한 후 끓는 물에 10분 동안 반응시켜 냉각시킨 다음 UV-spectrophotometer를 이용하여 540 nm의 흡광도에서 측정하였다. 한천분해 효소의 활성은 1분당 1.0 μ g/mL의 galactose를 생산하는 효소의 양으로 1.0 unit로 정의하였다.

균주성장에 따른 한천농도 및 점도의 변화

기본배지 50 mL에 한천 0%, 0.2% (w/v)를 각각 첨가하여 균주를 접종하였으며, 단위 시간마다 1.0 mL sampling하여 원심분리하였다. 원심분리한 후 상층액을 제거하고 dry oven (60°C)에서 24시간 동안 건조하여 한천의 농도를 측정하였다. 배양 시간에 따른 점도 변화는 배지 내 0.2% (v/v)의 농도로 한천을 첨가하여 시간에 따라 회수한 후 점도를 측정하였다. 점도계는 LVDV-III+ (Brookfield, USA, spindle No. 31)를 사용하였으며, 분석조건으로는 40 rpm, 60°C에서 점도를 측정하였다.

한천올리고당의 성분 분석

한천올리고당의 성분은 TLC (Thin-Layer Chromatography)를 이용하여 분석하였다. 전개판 (silica gel 60 glass plate, Merck co.)에 배양액 5.0 μ l를 spotting한 후 전개용매에 5시간정도 전개하였다. 전개용매는 n-butanol, acetic acid, ddH₂O (2 : 1 : 1, v/v)로 혼합한 것을 사용하였다. 시료를 전개시킨 후 검출시약으로 ethanolic sulphuric acid (375 mL of ethanol + 100 mL sulphuric acid)를 처리하여 건조시킨 다음 ethanol에 녹인 0.2% (W/V) naphthoresorcinol solution을 분사하여 110°C에서 10분간 가열 후 나타나는 spot로 한천올리고당을 분석하였다.

결과 및 고찰

배지 내 한천의 농도에 따른 성장 측정

각 배지에 초기 한천농도를 다르게 하여 균주의 성장을 확인하였다(Fig. 2). 그 결과 배양 후 최대 흡광도 값을 나타내는 15시간에 0%의 한천배지의 경우 $OD_{600} = 0.422$, 0.2%의 한천배지의 경우 $OD_{600} = 0.998$, 0.4%의 한천배지의 경우 $OD_{600} = 0.996$, 0.6%의 한천배지의 경우 $OD_{600} = 1.102$ 로 0.2% 이상에서 큰 차이는 없었으나 약간의 성장을 확인할 수 있었다. 이는 배양액 중에 한천이외의 다른 영양분의 고갈로 추측되며 아울러 한천의 물리적 특성상 0.3% 이상일 때 점도 증가로 인해 배지 내 충분한 영양원이 존재함에도 교반에 있어서 저항이 크게 증가하여 성장은 일정하게 유지된다는 것을 확인할 수 있었다. 이에 0.3% (w/v) 이상의 농도에서는 그 특성상 37~39°C 범위에서 겔화가 시작되어 겔 형성에 의한 효소와의 친화력이 감소하기 때문에 이후 fed-batch 실험에서는 최적 기질농도를 0.2% (w/v)로 하였다.

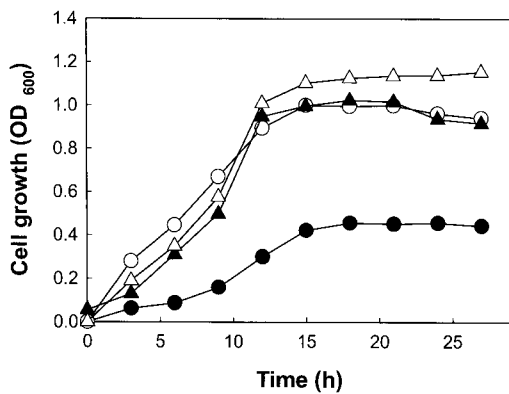


Figure 2. Growth kinetics of *Agarivorans* sp. JA-1 at various agar concentration in batch culture condition (●; without agar, ○; 0.2% agar, ▲; 0.4% agar, △; 0.6% agar).

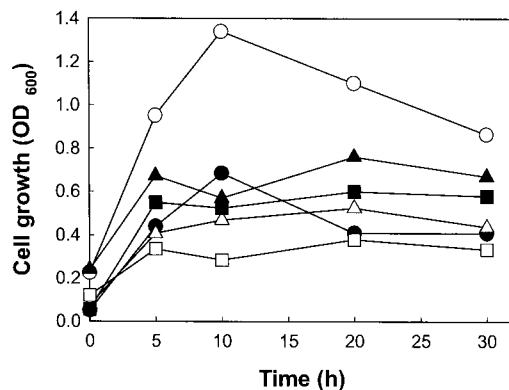


Figure 3. Growth kinetics of *Agarivorans* sp. JA-1 at various carbon sources in batch culture condition (●; without agar, ○; agar, ▲; fructose, △; galactose, ■; sucrose, □; glucose).

탄소원의 영향

각 탄소원인 agar, D-glucose, D-galactose, D-sucrose 및 D-fructose에 따른 균주의 성장차이를 확인해 보았다(Fig. 3).

그 결과 한천을 첨가하였을 때와 달리 D-glucose, D-galactose, D-sucrose 및 D-fructose는 탄소원으로 이용되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 또한 한천을 첨가하지 않았을 경우 10시간 때의 흡광도 $OD_{600} = 0.685$ 와 0.2%의 한천이 첨가된 경우의 흡광도 $OD_{600} = 1.340$ 를 비교한 결과 한천이 포함되어 있을 때의 균주성장이 약 2배 정도 좋은 것을 알 수 있었다. 한천의 구성 성분인 galactose가 균주의 성장에 효과적일 것이라는 예상과 달리 D-galactose는 다른 탄소원과 비슷하게 성장이 미비한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 보아 본 균주가 한천의 가수분해시 생성되는 L-anhydro-galactopyranose를 주된 탄소원으로 사용한다는 것을 예상할 수 있다. 한천분해효소를 생산하는 *Streptomyces*의 경우 Glucose가 성장을 추진시키는 것(16)과 다르게 본 연구의 균주는 4종류의 당당류를 이용하지 못한다는 것을 확인할 수 있었다.

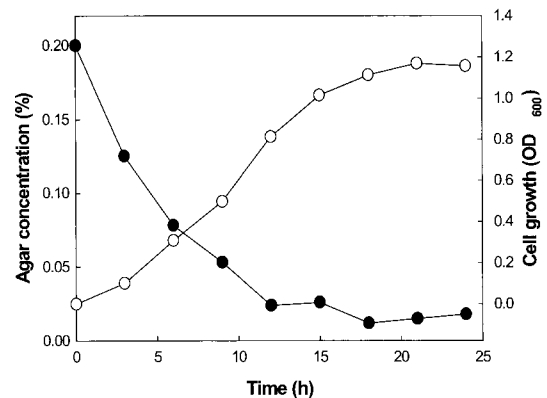


Figure 4. Kinetics of growth and agar concentration from the *Agarivorans* sp. JA-1 in batch culture condition (●; agar concentration, ○; cell).

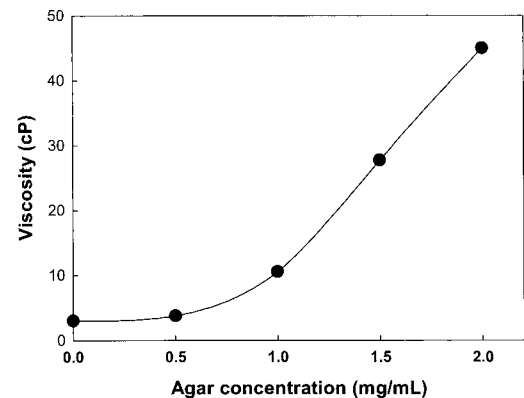


Figure 5. The relationship between the concentration and the viscosity of the agar solution.

균주의 성장에 따른 한천농도 및 점도의 변화

시간에 따른 한천의 분해정도를 확인한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 균주 배양 초기 한천농도 0.2%에서 시간에 따라 일정하게 감소하여 배양 15시간 후 한천은 0.02%로 거의 대부분의 한천이 분해되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 균체의 성장이 대수증식기 이후 정지기로 접어들 때의 15시간과 동일하며 균체가 모든 한천을 분해한 후

정지기에 들어간다는 것을 확인할 수 있었다. 한천분해효소의 생산을 위한 산업적 공정에서 점도는 매우 중요한 요인으로 판단되며, 이는 발효기 내외부의 열 발생이나 흐름, 기기장치의 마모 등에 영향을 미칠 것으로 생각되어(14), 배지 내 한천 농도에 따른 점도의 변화를 관찰하기 위해 한천농도에 따른 점도에 관한 표준곡선을 측정하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 한천이 농도의 증가에 따라 dilatant fluid의 성질을 가진다는 것을 알 수 있었다. 또한 이를 이용하여 점도에 따른 한천의 농도를 쉽게 측정할 수가 있어 실제 생산 공정에 용이할 것으로 생각된다. Fig. 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 초기점도 42 cP에서 3시간 후 15 cP로 급격히 감소한다는 것을 확인할 수 있었고 이후 15시간까지 감소하여 18시간에 3.02 cP로 점도가 낮아지는 것을 볼 수 있었다. 한천농도도 점도와 비슷하게 초기 1.96 mg/mL에서 3시간 후 1.01 mg/mL로 감소한 것을 확인할 수 있으며 이후 15시간까지 계속 감소하여 18시간에는 0.58 mg/mL로 한천농도가 줄어든 것을 알 수 있었다. 이는 균주가 성장함에 따라 한천을 탄소원으로 이용하는 것으로 확인할 수 있었다.

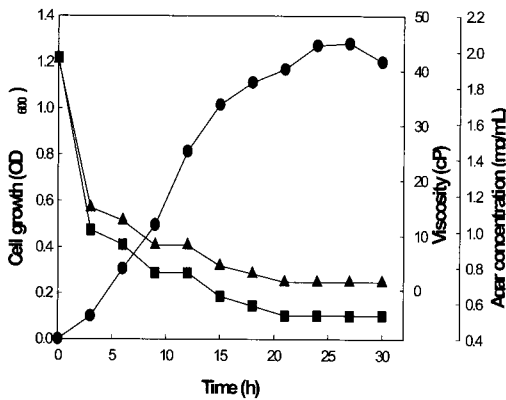
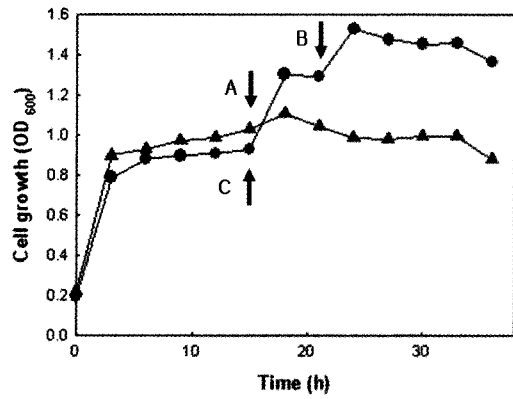


Figure 6. Time course of agar concentration and viscosity variation during flask bath culture of *Agarivorans sp. JA-1* (●; growth, ▲; viscosity, ■; agar concentration).

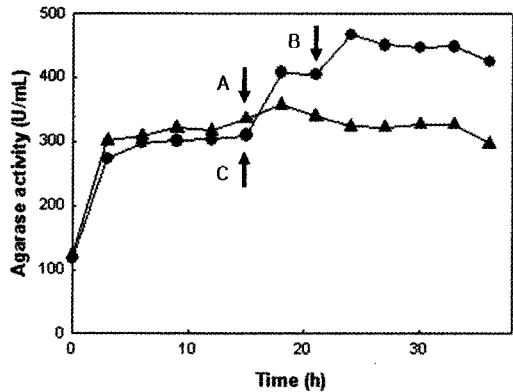
Fed-batch 배양

Agarase 생산수율을 향상시키기 위하여 탄소원인 agar 또는 marine broth를 가지고 fed-batch 실험을 하였다(Fig. 7). 초기 한천농도 2.0 g/L가 첨가된 marine broth 400 mL를 사용하여 초기배양을 시작하였으며 한천이 거의 소비된 배양 15시간에 배지 내 한천농도가 0.2%가 되도록 0.8g의 한천을 15시간과 21시간에 2회 첨가하였다. Fig. 7(A)의 결과와 같이 한천을 첨가한 fed-batch 배양을 살펴보면 15시간 때의 흡광도 OD₆₀₀ = 0.929에서 첫 번째 한천을 첨가한 후 18시간 때의 흡광도 OD₆₀₀ = 1.303와 두 번째 한천을 첨가한 후 24시간 때의 흡광도 OD₆₀₀ = 1.529를 비교하여 보았을 때 한천을 첨가할 때마다 균체의 성장이 증가한다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 균체의 성장에 따른 활성 Fig. 7(B)을 살펴보면 15시간에서의 효소활성 309 U/mL와 첫 번째 한천을 첨가한 후 18시간에의 효소활성 407.42 U/mL를 비교해 보았을 때 약 32%정도 효소활성이 향상되었고, 또한 두 번째 한천을 첨가한 후 24시간에 효소활성

은 466.89 U/mL로 약 14% 정도의 활성이 향상되었다. 이러한 결과로 보아 한천의 첨가가 세포 성장에 비해 효소 활성에 많은 영향을 끼침을 확인할 수 있었다. Marine broth만 첨가한 fed-batch 배양의 경우를 살펴보면 15시간 때 흡광도 OD₆₀₀ = 1.030과 marine broth를 첨가한 후 흡광도 OD₆₀₀ = 1.111로 보아 marine broth는 균체의 성장에 영향을 미치지 않거나 이미 충분한 양의 배지가 존재하고 있는 것으로 예상된다. 앞서 실험한 초기 배양배지 내 0.6%한천을 첨가한 경우 높은 점도의 영향으로 인해 균주의 성장에 저해를 받았으나 한천이 고갈된 15시간에 한천을 추가로 첨가하였을 경우에는 균주의 성장이 높아짐을 확인할 수 있었다.



(A)



(B)

Figure 7. Kinetics of growth and agarase production of *Agarivorans sp. JA-1* in fed-batch culture. The down arrow A; added agar, B; added agar, C; added marine broth ((A) Growth of *Agarivorans sp. JA-1*. (B) Agarase activity. (●; agar, ▲; marine broth)).

한천올리고당의 성분분석

한천을 기질로 하여 생산된 한천올리고당의 조성성분을 확인하기 위하여 TLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 8). Fed-batch 배양에서 12시간과 15시간, 18시간 때의 반응산물을 TLC로 분석한 결과, 그림에서 보는 바와 같이 중합도 (degrees of polymerization, DP)가 6인 당이 주생산물임을 알 수 있었고 시간의 경과에 따라 중합도 4인 당도 희미하게 확인할 수 있었다. 한천의 구성성분인 galactose

(data not shown)는 중합도 4인 당보다 위쪽에서 확인되었으며 본 실험에 사용한 균주는 TLC상에서 galactose를 확인할 수 없었다. 배양 후 12시간에서 15시간의 결과를 보면 균주가 한천을 이용하여 올리고당을 생산하는데 TLC상에서 시간이 지날수록 진하게 나타날 것으로 예상했으나, 그림에서 보는 바와 같이 12시간 때보다 15시간에 희미하게 나타남을 볼 수 있었다. 한천을 첫 번째 첨가한 후 18 시간에는 15시간보다 진하게 나타난 결과를 토대로 한천을 추가 첨가한 만큼 올리고당생산이 증가할 것으로 예상한 결과와 달리 두드러지게 그 생산이 증가하지는 않았다. 따라서 이는 한천을 기질로 하여 생성된 올리고당을 균주의 성장에 사용하는 것으로 예측되어진다.

많은 양의 한천올리고당을 얻기 위해서는 agarase를 분리하여 적절한 양의 한천을 공급해 주어야 하는 것으로 생각되나 이 점에 대해서는 차후 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

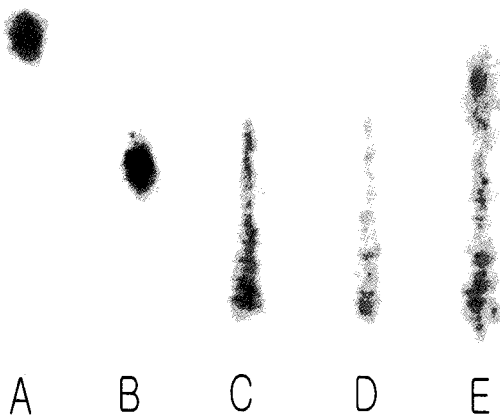


Figure 8. Thin-layer chromatogram of hydrolyzates of agar digested with agarase from *Agarivorans* sp. JA-1 (A; neogaretetraose (1 mg/mL), B; neogaroheptaose (1 mg/mL), C; 12h, D; 15h, E; 18h).

요약

제주도 연안에서 분리 동정된 한천분해효소를 생산하는 *Agarivorans* sp. JA-1의 배양특성을 연구하였다. 균주가 기질로 이용하는 한천은 배지 내의 한천의 농도가 0.2%일 때 가장 효율적인 성장을 하였으며 4종의 탄소원에 대해서는 성장에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 배양시간에 따른 한천농도는 15시간 이후 모두 분해되었으며 점도의 변화도 이와 유사한 것으로 나타났다. 또한 fed-batch 배양에서 0.8 g 한천을 2회 첨가하였으며 한천을 첨가한 후 agarase생산이 증가되는 것으로 나타났다. 한천올리고당의 성분분석을 한 결과 중합도가 6인 당이 확인되었다.

감사

본 연구는 해양수산부 마린바이오21사업 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Yukari, O., Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, and Y. Hatada (2004), Enzymatic properties and nucleotide and amino acid sequences of a thermostable β -agarase from the novel marine isolated JAMB-A94, *J. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1073-1091.
2. Araki, C. (1966), Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes, Proceedings of the 5th international seaweed symposium, 3-17.
3. Kim, B. J., S. D. Ha, D. J. Lim, C. M. Song, and J. Y. Kong (1998), Production of agroligosaccharides using of agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 524-529.
4. Yukari, O., H. Yuji, S. Ito, and K. Horikoshi (2005), High-level expression of neogaroheptaose-producing β -agarase gene from *Agarivorans* sp. JAMB-A11 on *Bacillus subtilis* and enzymatic properties of the recombinant enzyme, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **41**, 183-191.
5. Kadota, H. (1951), Memoris of the college of science, Kyoto university, **59**, 54-57.
6. Morrice, L. M., M. W. McLean, F. B. Williamson, and W. F. Long (1983), β -agarase I and II from *Pseudomonas atlantica*: Purifications and some properties, *Eur. J. Biochem.* **135**, 553-558.
7. Aoki, T., T. Araki, and M. Kitamukado (1990), Purification and characterization of a novel β -agarase from *Vibrio* sp. AP-2, *Eur. J. Biochem.* **187**, 461-466.
8. Stanier, R. Y. (1942), Agar-decomposing strains of the actinomycetes coelicolor species-group, *J. Bacteriol.* **44**, 555-570.
9. 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, *Korean J. Life Sci.* **15**, 884-888.
10. Kong, J. Y., S. H. Hwang, B. J. Kim, S. D. Ha, S. K. Kim, and J. D. Kim (1995), Purification of extracellular agarase of marine microorganism (*Pseudomonas* sp. W7) and molecular cloning of the agarase. The First Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference **95**, 57, Shimizu, Japan.
11. 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.
12. Somogyi, M. (1952), Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
13. Parro, V. and R. P. Mellado (1994), Effect of glucose on agarase over production by *Streptomyces*, *Gene.* **145**, 49-55.
14. Kirimura, K., N. Masuda, Y. Iwasaka, H. Nakagawa, R. Kobayashi, and S. Usami (1999), Purification and characterization of novel β -agarase from an alkaliphilic bacterium, *Alteromonas* sp. E-1, *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 436-441.
15. 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.
16. Van de Meulen, H. J. and W. Harder (1975), Production and characterization of the agarase of *Cytophaga flevensis*, *Atonie Van Leeuwenhoek*, **41**, 431-447.