

한천분해효소를 생산하는 해양유래 세균 *Glaciecola* sp. SL-12의 분리 및 특성

이동근 · 이옥희 · 장효정 · 장민경 · 유기환 · 이상현*

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과

Received November 22, 2007 / Accepted December 6, 2007

Isolation and Characterization of a Marine Derived Bacterium *Glaciecola* sp. SL-12 Producing β -agarase. Dong-Geun Lee, Ok-Hee Lee, Hyo Jung Jang, Min-Kyung Jang, Ki Hwan Yoo 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-12 was isolated from seashore of Kijang at Busan, Korea, and cultured in marine broth 2216 media. Isolated bacterium SL-12 was identified as *Glaciecola* genus by 16S rDNA sequencing with 98% identity. The optimum pH of the enzyme activity was 7.0 and the optimum temperature for the reaction was 30°C. The enzyme hydrolyzed neoagarohexaose to yield neoagarobiose as the main product, indicating that the enzyme is β -agarase. Thus, isolated bacterium and the enzyme would be useful for the industrial production of neoagarobiose.

Key words : β -agarase, marine, *Glaciecola* sp., neoagarobiose

서 론

한천(agar)은 홍조류 유래의 다당류이며 galactose와 galactopyranose로 구성된 중합체로[4] 젤리 등을 생산하는 식품산업과 다이어트 식품으로 널리 이용되어 왔다[2]. 한천을 정제하여 미생물배지로 사용하거나 agaropectin 등의 성분을 제거하고 agarose만을 순수정제하여 분자생물학 실험에서 전기영동의 매체로 이용되고 있다. 또한, 한천의 분해산물인 한천올리고당은 생체에 다양한 기능성을 나타내는 것으로 알려져 있는데 현재까지 세균성장 억제, 전분노화 방지, 대식세포 활성화, 보습효과, 미백효과, 항산화효과, 항암활성 등이 보고되어 있다[1,8,12,20]. 신약개발에도 활용될 수 있는 등 고부가가치 소재로서의 활용 가능성이 높은 한천올리고당을 생산하기 위한 방법으로는 산가수분해법[7]과 한천분해효소(agarase)를 이용하는 효소적 방법이 있다. 산가수분해법은 반응속도는 빠르나 올리고당의 기능성과 안정성이 떨어지는 문제가 있어 한천유래 기능성올리고당 생산에는 한천분해효소가 더 유용한 것으로 알려져 있다[15]. 이에 본 연구를 비롯한 많은 연구진들이 한천분해효소 생성균주 탐색에 노력을 기울여왔다[10,13,17].

한천분해효소에는 α -agarase와 β -agarase의 두 종류의 효소가 보고되어 있는데, 특히 β -agarase를 이용한 한천분해산물인 neoagarooligosaccharide는 α -agarase의 분해산물인 agarooligosaccharide 보다 기능성이 탁월한 것으로 알려져 있으며 이들을 활용한 제품은 부가가치가 높을 것으로 기대할 수 있다[1,8]. 우리나라는 3면이 바다이고 제주도와 남해안

일대에서 한천이 대량으로 생산되고 있지만, 현재는 단순한 1차 가공 형태가 대부분이어서 한천을 이용한 고부가가치화는 수산 경제 발전을 위해 필수적이라 할 것이다.

본 연구에서는 한천의 고부가가치화를 위하여 한천분해효소를 생산하는 신규의 해양유래 세균을 동해안의 기장 연안 해역에서 분리하여 분류학적 위치를 확인하였으며, 이 세균이 생산하는 한천분해효소의 특성을 검토하여 산업적 응용의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

분리용 시료 및 한천분해 균주의 분리 배양

동해안 기장 연안의 해수를 시료액으로 사용하였다. 시료액을 2% NaCl이 첨가된 멸균회석수를 이용하여 연속적으로 희석하였고 원액과 희석수 100 μ l 씩을 배지 위에 도말하였다. 배지는 한천을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 한 무기염 한천배지와[13] 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 한천무기염 평판 배지를 함몰시키는 균주를 선별하였다.

한천분해 균주의 선정 및 동정

한천분해로 함몰이 일어난 부위의 지름이 3 mm 이상인 집락을 대상으로 함몰부위의 지름이 큰 집락부터 내림차순

*Corresponding author

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

E-mail : slee@silla.ac.kr

으로 15개의 집락을 선택하고 백금이를 이용하여 균을 채취하고 멸균된 무기염 배지로 적절히 희석한 후에 무기염 한천 배지에 도말하는 것을 3차례 이상 반복한 후 균주들을 순수 분리하였다[10]. 한천분해능을 가진 분리 균주들을 0.2% (w/v)의 한천을 포함한 marine broth 2216 배지에서 25°C, 250 rpm에서 60시간 진탕 배양한 후 배양액의 환원당 값을 측정하여 선별된 균주들의 한천분해능을 검토하였다. 이들 균주들의 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였고, 분석된 염기서열은 Blast를 사용하여 공시균주와 유사도를 검토하였으며, 윈도우 버전의 Clustal 프로그램을 (ClustalX ver. 1.8) 이용하여 다중염기배열(multiple alignment)을 수행한 후 neighbor-joining method와 bootstrap method (n=1,000)로 분석하여 계통분류학적 위치를 파악하였다.

한천분해 균주의 생육 및 조효소액의 제조

Marine broth 2216 배지 50 ml가 들어있는 250 ml 삼각 플라스크에 순수분리한 SL-12 균주를 접종한 후 shaking incubator를 이용하여 27°C, 250 rpm에서 진탕 배양하였다. 배양 1일 후 배양액을 원심분리하여(12,000× g, 4°C, 10 min) 균체를 제거한 후 얻어진 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

한천분해 효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogy-Nelson법으로 실시하였다[13]. 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 효소반응을 중지시키고 10분간 끓였다. 실온으로 냉각된 용액에 arseno-molybdate 시약을 첨가하고 14,000 ×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.

반응온도에 따른 한천분해 효소의 활성

조효소액을 이용하여 온도에 따른 한천분해능의 안정성을 실시하였다. 표준 기질용액으로는 0.2% (w/v)의 한천을 포함한 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[10].

pH에 따른 한천분해 효소의 활성

최적 pH와 pH에 따른 한천분해 효소의 활성을 측정하기 위하여 100 mM sodium acetate 완충용액(pH 3.0-5.0), 20

mM sodium phosphate 완충용액 (pH 5.0-8.0), 50 mM TAPS (3-[tris(hydroxymethyl)methyl amino]-1-propane sulfonic acid) 완충용액(pH 8.0-9.0)을 이용하였다. 0.2% (w/v) 한천을 포함한 완충용액을 증탕가열하고 40°C까지 냉각시킨 후 반응수조를 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[3,5]. TLC 분석은 n-butanol/acetic acid/H₂O (2/1/1, by vol.)를 이용하여 전개시켰고, 10% (v/v) H₂SO₄로 가시화시켰다. 표준물질로 D-galactose (Sigma), neoagarohexaose (Sigma)와 neoagarotetraose (V-Labs Inc., St. Covington, LA, USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

한천분해균주의 분리 및 배양

해수시료액의 배양결과, 총 5,000여 개의 집락(colony)에서 한천분해 활성을 나타냈으며 한천분해능으로 함몰된 한천의 지름이 큰 균주 15개를 선발하였다. 통상적인 세균 순수분리 방법인 배지상의 집락을 채취한 후 한천배지 위에 streaking으로 분리하는 방법으로는 한천분해세균의 순수분리가 어려워 한천분해로 함몰이 일어난 부위의 균을 백금이를 이용하여 채취하고 이를 무기염 배지로 적절히 희석한 후에 무기염 한천배지에 도말하고 함몰된 한천의 지름이 큰 집락을 선택하여 다시 희석하는 것을 3차례 이상 반복한 후 균주들을 순수분리하였다[10]. 분리한 균주들을 0.2% (w/v)의 한천을 포함한 marine broth 2216 배지에서 25°C, 250 rpm에서 60시간 진탕 배양한 후 배양액의 환원당 값을 측정하여 선별된 균주의 한천분해능을 검토하였으며 가장 분해능이 우수한 균주 3종을 최종적으로 선정하였다. 이들 균주들의 16S rDNA 염기서열분석을 실시하여 본 연구자들에 의해 이미 보고된 β-agarase 생산균주인 *Agarivorans* 속 균주[13]와 높은(99%) 상동성을 나타내는 균주 두 종을 제외시켰고, 최종적으로 SL-12 균주 한 종을 선정하였다. 분리된 균주는 NaCl이 첨가되지 않는 배지에서는 성장이 거의 없고 NaCl이 존재 하에서만 성장하는 호염성 균주로 확인되었다 (data not shown). 분리한 SL-12 균주가 나타내는 한천분해 양상을 Fig. 1에 나타내었다.

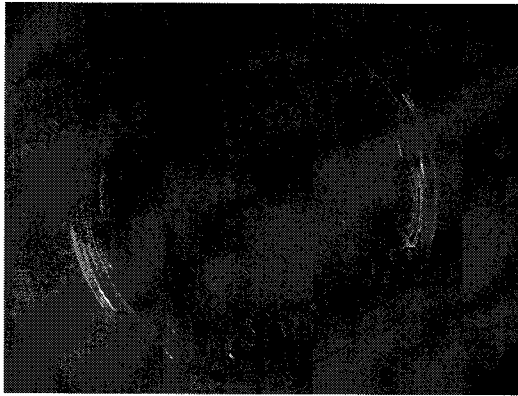


Fig. 1. Agar degrading activity of the isolated bacterium SL-12 on a marine broth 2216 agar medium.

한천분해 균주의 동정

분리된 한천분해균 SL-12 균주의 16S rDNA 염기서열분석 결과 Gamma-Proteobacteria인 *Glaciecola mesophila* [14] 및 dimethylsulfide를 분해하는 *Glaciecola* 속 세균[15]과 가장 높은 유사도(98%)를 보였으므로(Fig. 2) *Glaciecola* sp. SL-12로 명명하였다. 그 외 유사도가 높은 서열을 가지며 agarase를 생산하는 균주는 *Bacterium* QM28 (NCBI No. DQ822527)과 *Bacterium* QM15 (NCBI No. DQ822523) 세균 등이 있었지만 이들의 동정이나 특성에 관한 보고는 아직 이루어지지 않고 있다. 분리 균주와 가장 유사한 *Glaciecola* 속 세균들이

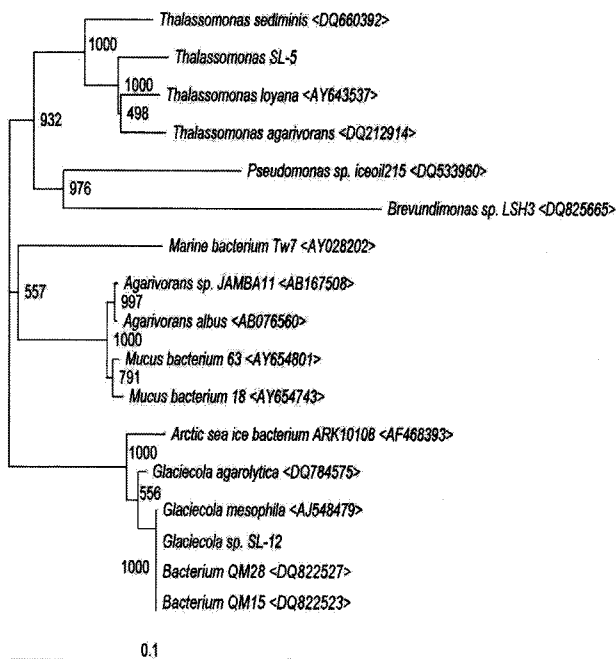


Fig. 2. Phylogenetic tree based on almost complete 16S rDNA sequence comparing SL-12 with members of *Glaciecola* sp. and related genera. The numbers at the branch node are bootstrap values and numbers in parenthesis are access numbers at NCBI.

agarase를 생산한다는 보고는 있었지만 α -agarase를 생산한다는 유일한 보고[12] 외에는 주로 분류학적 특성 보고가 위주였고 생산된 agarase의 특성에 관한 보고는 거의 이루어지지 않고 있다[6,19].

pH에 따른 한천분해 효소의 활성

각 pH에서 보이는 한천분해효소의 활성을 Fig. 3에 나타냈다. 사용한 완충용액과 pH 중 최고의 활성을 나타내는 것은 20 mM sodium phosphate 완충용액에서 pH 7.0으로 나타났다. 이는 *Thalassomonas* sp. SL-5 [10]와 동일하였다. 또한 pH 5.0과 6.0에서 한천분해 활성이 85% 이상 유지되고 pH 8.0에서는 70% 정도로 중성과 약산성 범위에서 높은 활성을 보이는 것도 *Thalassomonas* sp. SL-5 [10] 유래의 한천분해효소와 유사하였다. 균주에 따른 한천분해의 최적 pH는 *Agarivorans* sp. JA-1 [13]과 *Vibrio* sp. JT0107의 경우 pH 8.0 [15]이었고 *Bacillus* sp. MK03는 pH 6.1 [16], *Bacillus cereus* ASK 202는 pH 7.8 [9], *Pseudomonas* sp. PT-5는 pH 8.5 [18] 등으로 균주에 따라 다양한 것으로 보고되어 있다. pH 8.0에서의 활성을 비교하면 20 mM sodium phosphate 완충용액에 비해 50 mM TAPS 완충용액에서 활성이 낮은 것으로 나타났는데(Fig. 3) 이는 TAPS에 의한 영향과 염농도에 의한 영향일 가능성이 있다. 그리고 *Agarivorans* sp. JA-1 균주 유래의 β -agarase는 20 mM sodium phosphate (pH 8.0) 완충용액에 비해 50 mM glycine-NaOH (pH 8.0) 완충용액에서 더 높은 활성을 보여[13] 효소에 의한 영향도 있을 것이므로 추후에 이에 대한 확인이 필요할 것으로 생각된다.

온도에 따른 한천분해 효소의 활성

각 온도별로 보이는 한천분해효소의 활성을 Fig. 4에 나타냈다. 한천분해활성은 30°C에서 233 units/l로 최고치를 나타냈으며 30°C의 반응온도에서 나타난 효소활성을 100%로

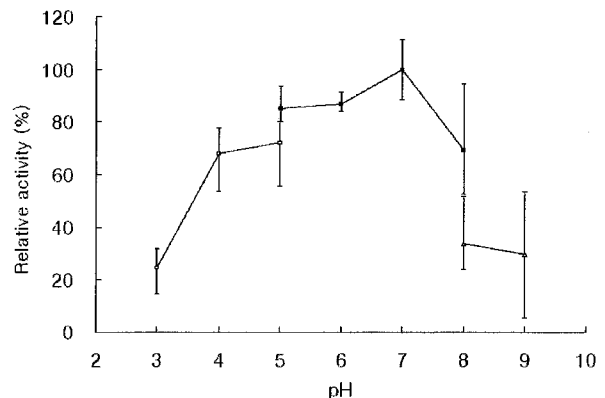


Fig. 3. Effect of pH on agarase activity. (□ 100 mM sodium acetate buffer, pH 3.0-5.0; ■ 20 mM sodium phosphate buffer, pH 5.0-8.0; ▲ 50 mM glycine NaOH buffer, pH 8.0-9.0).

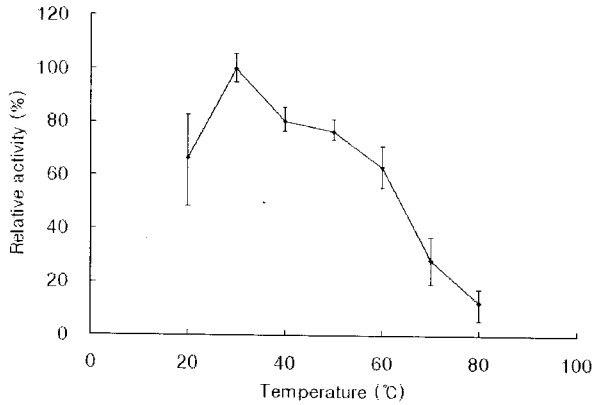


Fig. 4. Effect of reaction temperature on agarase activity. The reaction was carried out at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80°C with 1 ml of 0.2% (w/v) agar in 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) buffer and 0.5 ml of enzyme solution for 30 min.

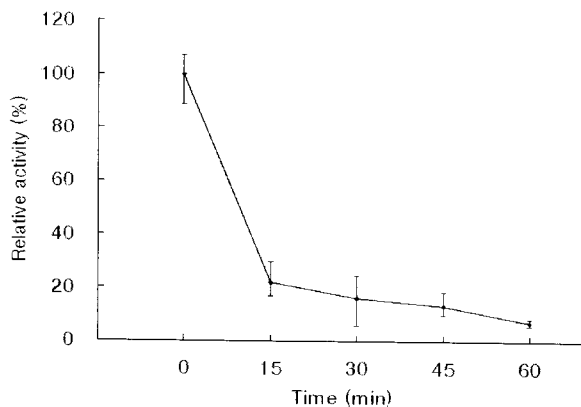


Fig. 5. Heat stability of agarase of *Glaciecola* sp. SL-12 at 70°C. Agarase activity was measured with the crude enzyme exposed to 70°C water for 0, 15, 30, 45 and 60 minute. Reaction was carried out at 30°C with 1 ml of 0.2% (w/v) agar in 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) buffer and 0.5 ml of heat treated enzyme solution for 30 min.

하였을 때 40°C에서 80%, 50°C에서 76%, 60°C에서 63%의 상대 활성을 나타냈으며 70°C에서는 28%의 활성을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 4). 조효소액을 70°C에서 시간별로 처리한 후에 나타나는 활성을 측정 한 결과, 15분 만에 22% 정도의 잔존 활성을 나타냈다(Fig. 5). 이러한 결과로 이 효소는 고온에 민감한 내열성을 나타내지 않는 효소라는 것을 알 수 있다. 반면, *Thalassomonas* sp. SL-5의 경우 70°C에서 15분간 처리 후에도 76% 정도의 잔존 활성을 나타냈고, 60분간 처리 후에도 약 30%의 잔존 활성을 나타냈다[10].

한천올리고당 가수분해산물의 TLC 분석

Glaciecola sp. SL-12 균주를 1일간 배양하여 제조된 조효소액에 neoagarohexaose를 기질로 첨가하여 1일 혹은 3일 동안

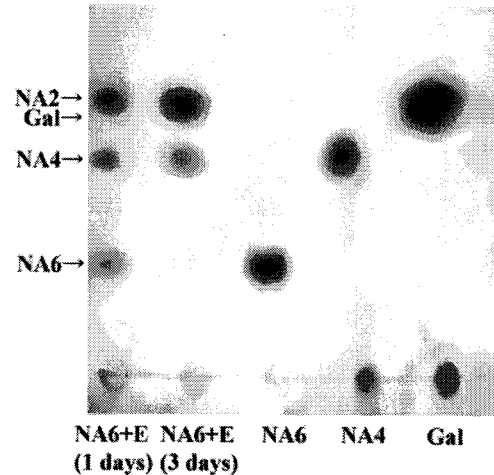


Fig. 6. TLC of the products of neoagarobiose hydrolysis by agarase. The reaction was carried out at 40°C in 20 mM sodium phosphate (pH 7.0) buffer and 1.0% neoagarohexaose (NA6) with enzyme solutions (1 day, 1 day reaction; 3 days, 3 days reaction). The reaction mixture was developed by TLC. Gal, D-galactose; NA2, neoagarobiose; NA4, neoagarotetraose; NA6, neoagarohexaose; NA6+E, hydrolyzed products from NA6.

반응시킨 결과를 Fig. 6에 나타냈다. Neoagarohexaose를 기질로 사용하면 β-agarase는 neoagarotetraose와 neoagarobiose를 생성하며 α-agarase는 agaropentose와 agarotriose를 생성한다[1,12,20]. *Glaciecola* sp. SL-12 균주의 한천분해효소의 분해산물을 TLC로 분석한 결과, 3일 내에 neoagarohexaose를 모두 분해하여 주로 neoagarobiose를 생산하고(72.7%) 일부 neoagarotetraose도 생산하는(27.3%) 것으로 나타나 이 효소가 β-agarase에 속하는 것을 확인되었다(Fig. 6).

확보된 Glaciecola sp. SL-12 균주의 활용방안

현재까지 *Glaciecola* sp.를 대상으로 하는 연구결과로는 α-agarase를 생산하는 결과만 보고되어 있어[12], 본 연구로 β-agarase를 생산하는 신규의 *Glaciecola* sp. 균주를 확보한 점에 큰 의미를 둘 수 있다. 한천의 β-agarase 분해산물인 neoagarooligosaccharide는 세균성장 억제, 전분노화 방지, 대식세포 활성화, 보습효과, 미백효과, 항산화효과, 항암활성 등이 보고되어 있어[1,8,12,20] 향장품 산업과 식의약산업의 소재로 활용될 가능성이 높다. 본 연구로 본 연구진이 이미 확보한 β-agarase 생성 해양성 균주인 *Agarivorans* sp. JA-1 [13], *Thalassomonas* sp. SL-5 [10] 등과 함께 *Glaciecola* sp. SL-12 균주에서 생산되는 β-agarase를 이용하면 균주 유래에 따라 각 β-agarase의 최적 온도와 pH 등 특성이 서로 다르므로, 이들을 조합하여 한천의 액화와 당화공정 등에 이용하면 고부가가치 기능성 한천올리고당의 산업적 생산을 위한 생산성 개선에 도움이 될 수 있을 것으로 기대하고 있다.

요 약

기능성 한천올리고당 생산에 사용할 수 있는 유전자원을 확보하기 위하여 동해안 기장 해수에서 한천분해활성을 보이는 해양유래 세균 SL-12를 분리하였으며 16S rDNA 염기서열 분석으로 해양기원의 *Glaciecola* 속과 가장 유사한 균주임을 확인하였다. SL-12 균주가 생성하는 한천분해효소(agarase)의 최적 pH는 pH 7.0 (20 mM sodium phosphate 완충용액)이고 최적 온도는 30°C로 나타났다. 분리된 *Glaciecola* sp. SL-12 균주가 생산하는 한천분해효소의 분해산물에 대한 TLC 분석결과, 기능성 한천올리고당을 생산하는 β -agarase로 판명되어 산업적 활용 가능성이 높은 것으로 기대된다.

감사의 글

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

References

- Araki, T., Z. Lu and T. Morishita. 1998. Optimization of parameters for isolation of protoplasts from *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *J. Marine Biotechnol.* **6**, 193-197.
- Do, J. H. 1997. Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *J. Korean Fish. Soc.* **30**, 423-427.
- Duckworth, M. and 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. and Yaphe. 1977. Enzymatic hydrolysis of agar: purification and characterization of β -neogagarotetraose hydrolase from *Pseudomonas atlantica*. *Can. J. Microbiol.* **23**, 672-679.
- Jean, W. D., W. Y. Shieh and T. Y. Liu. 2006. *Glaciecola agarivorans* sp. nov., a marine agarolytic bacterium isolated from shallow coastal water of An-Ping Harbour, Taiwan, and emended description of the genus *Glaciecola*. *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 antitumorogenic 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.
- 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 β -agarase. *J. Life Sci.* **17**, 70-75.
- Michaux, J. R., R. Libois, A. Davison, P. Chevret and R. Rosoux. 2004. Is the western population of the European mink, (*Mustela lutreola*), a distinct management unit for conservation?. *Biol. Conserv.* **115**, 357-367.
- 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.
- 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.
- Romanenko, L. A., N. V. Zhukova, M. Rohde, A. M. Lysenko, V. V. Mikhailov and E. Stachebrandt. 2003. *Glaciecola mesophila* sp. nov., a novel marine agar-digesting bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 647-651.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yong, J. J., S. J. Park, H. J. Kim and S. K. Rhee. 2007. *Glaciecola agarilytica* sp. nov., an agar-digesting marine bacterium from the East Sea, Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**, 951-953.
- 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.