

효모 표층 Arylsulfatase에 의해 제조된 Agarose의 특성

조은수¹ · 김정환¹ · 김연희^{1,2} · 남수완^{1,2*}

¹동의대학교 바이오품질제어학과, ²동의대학교 생명공학과

Characterization of Agarose Produced by Yeast Cell Surface Displayed-Arylsulfatase. Cho, Eun-Soo¹, Jeong-Hwan Kim¹, Yeon-Hee Kim^{1,2}, and Soo-Wan Nam^{1,2*}. ¹Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – Enzymatic hydrolysis of sulfate groups in agaropectin or agar simplifies the production process of high-quality or low sulfate-content agarose. This study was investigated that cell surface displayed arylsulfatase can be applied to desulfatation of agar for production of agarose. Sulfate content of agarose prepared by treatment of yeast surface-displayed arylsulfatase was decreased in a enzyme dose-dependent manner. Especially, 35 unit/mL of yeast surface arylsulfatase attenuated sulfate content of agarose up to 0.2%. In the 0.6% agar(Junsei), 35 unit/mL enzyme treated at 40°C for 3 h showed the lowest content of sulfate. Therefore, this result was determined to be the optimal condition to desulfatation of agar for production of agarose. In addition, the gel strength of yeast surface arylsulfatase treated agar and commercial agarose were compared. Agarose prepared by treatment of yeast surface arylsulfatase showed 559.8±0.12 of gel strength, and it is a similar compared to the commercial agarose.

Key words: Yeast cell-surface, arylsulfatase, *Saccharomyces cerevisiae*, desulfatation, agar, agarose

서 론

한천(Agar)은 해조류 유래의 점질성의 다당류로, agarose와 agaropectin으로 구성되어 있다. Agarose는 탄소 1,3과 bbb-D-galactopyranosyl 잔기들이 연결되어 있고 탄소 1,4와 3,6-anhydro- α -L-galactopyranosyl 잔기들이 연결되어 교차되어 있을 뿐만 아니라 반복된 구조로 구성되어 있으며, agaropectin은 agarose에 황산기, pyruvic acid 및 uronic acid 잔기를 함유하고 있다[1, 14, 26, 27, 30, 33]. 한천에 결합된 이러한 산성기들은 전기장하에서 물질의 이동에 영향을 줄 뿐만 아니라 겔 강도를 약화시키는 주요 원인이 된다[8]. 따라서 여러 단계의 유기 용매 분획을 통하여 한천 중의 agaropectin을 제거함으로써 agarose 순도를 높여 의학과 생명공학 분야에 사용되고 있다.

Agarose를 정제하기 위하여 제조사들은 여러 가지 방법들, 즉, pyridine-무수초산법[11], dimethylsulfoxide 분리법[2], cetylpyridinium chloride 및 cetyltrimethyl ammonium 추출법[2], polyethylene glycol 추출법[9], sodium iodide 분리법[8], nal-acrinol 분리법[15], ethanol 침전법[12] 및 양이온 계면활성제 분리법[8] 중에서 2-3가지 정제 방법을 병용하고 있다. 하지만 이러한 유기용매에 의한 agarose의 정제

법은 공정비가 과도하게 소요될 뿐만 아니라 고가의 장비와 이에 따른 고도의 기술을 요구하고 있다. 하지만 agar의 황을 가수 분해하는 효소를 사용할 경우 agarose 제조 시 공정과정을 획기적으로 간소화 할 수 있다[17, 23]. 따라서 최근 탈황효소를 이용한 생물학적 생산 공정법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[3, 6, 16, 13, 28].

Arylsulfatase는 agaropectin에서 황산기를 제거하는 기능을 가진 대표적인 탈황효소로 알려져 있다. 해조류를 섭취하는 해양 동물의 경우 소화효소의 일부로써 arylsulfatase가 분포하는 것으로 알려져 있으며, 이 효소는 해조류에 함유되어 있는 다당류의 sulfate ester 결합을 분해하여 해조 다당류의 체내 이용도를 높이고[14, 29], 특히 해조류에서의 황의 동화와 이화작용에 관여하는 것으로 알려져 있다[5]. 또한 미생물을 이용한 arylsulfatase 효소 생산을 위하여 *Klebsiella pneumoniae*[28], *Salmonella typhimurium*[13], *Pseudomonas aeruginosa*[3, 6] 및 *Escherichia coli*[16]와 같은 병원성 미생물을 이용한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 최근 보고된 연구에 따르면 *E. coli*에서 과발현되어 생산된 재조합 arylsulfatase 효소를 이용하여 제조한 agarose의 경우 황 함량과 gel 강도 측면에서 상업적 agarose와 상당히 유사한 결과를 보여 줌으로써 고순도 agarose의 생물학적 생산 공정에 적용 가능함을 확인하였다[22, 24]. 그러나 원핵세포나 효모세포 내에서 재조합 단백질이 발현 생산될 경우 불용성, 불활성, 부정확한 아미노말단 등의 다양한 문제가 발생된다[30]. 따라서 최근 세포표면에 다양한 생리활성효소나 금속이온 결합

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2276, Fax: 82-52-890-2632

E-mail: swnam@deu.ac.kr

단백질의 고정화를 통하여 고부가가치의 물질생산을 위한 전세포 생물촉매(whole cell biocatalyst) 시스템은 그 이용성이 매우 다양하다[10, 18, 19, 25, 32]. 특히 유용 효소유전자의 표면발현의 측면에서 진핵세포인 효모의 사용은 다음과 같은 장점을 제공한다. 첫째, 효모는 다른 미생물에 비하여 외래단백질의 분비기구가 잘 발달하여 있으므로 표면발현의 전제조건인 목포단백질의 분비가 용이하다. 둘째, 효모는 다른 미생물에 비하여 세포벽이 매우 단단하며 표면에 부착되는 단백질들이 세포표면의 glucan 구조와 공유결합에 의하여 결합되므로 반응 중 추출되지 않는 장점을 있어 산업적 응용에 있어서 life-time이 길다. 셋째, 표면발현 시 단백질의 표면밀도 측면에서도 효모의 agglutinin의 경우 효모 세포 1개당 10^4 분자수로서 원핵세포 시스템에 비하여 매우 높다. 이러한 단백질의 효모 표면발현 시스템은 전통적 전세포 촉매제의 사용에서 기질과 생산물의 세포막 수송의 장벽을 제거하기 위하여 사용해야 했던 세포투과공정이 필요 없고, 이에 의하여 야기되었던 효소의 불활성화를 방지할 수 있을 뿐만 아니라 전세포 촉매제의 경우 cytoplasm 내에서 반응하므로 발생되었던 경쟁적 부반응에 의한 생산성 저하의 문제를 피할 수 있다. 또한 세포외에서의 반응으로 반응물과 생산물의 세포막 통과와 물질수송 문제를 피할 수 있으며 세포표면에 고정으로 반응 후 반응액으로부터 사용한 생체촉매제의 재사용이 가능하다는 장점을 가지고 있다[20, 21, 24, 31].

이전 논문에서 우리는 *Pseudoalteromonas carageenovora* 유래의 arylsulfatase 유전자를 표면 발현용 벡터로써 *GAL1* promoter를 가진 유도 발현용 벡터인 pCTcon에 구축을 하고 구축된 pCTAST(7.1 kb)를 *S. cerevisiae* EBY100을 이용하여 효모 세포벽에 성공적으로 표면 발현 시켰고, 표면 발현된 pCTAST(7.1 kb)를 처리하여 제조한 agarose와 시판용 agarose를 DNA 전기영동하여 분리능과 이동능을 비교한 결과, 시판용 agarose와 유사함을 확인하였다[4]. 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 효모 표면 발현된 재조합 arylsulfatase를 이용하여 효율적이고 친환경적인 방법으로 고순도 agarose 생산을 위한 최적 탈황반응 유도 조건을 확립하고, 효소 처리로 제조된 agarose의 황 함량과 gel 강도를 비교함으로써 agarose의 경제적 생산 공정에서의 적용 가능성을 모색하고자 한다.

재료 및 방법

Arylsulfatase 표면 발현 효소의 배양과 균체의 회수

이전 논문에서 *Pseudoalteromonas carageenovora* 유래의 arylsulfatase 유전자를 표면 발현용 벡터로써 *GAL1* promoter를 가진 유도 발현용 벡터인 pCTcon에 구축을 하고 구축된 pCTAST(7.1 kb)를 *S. cerevisiae* EBY100을 이용하여 효모 세포벽에 arylsulfatase를 성공적으로 표면 발현 시켰다

[4]. Arylsulfatase 효소는 YPDG 배지, 30°C, 48시간 배양한 후 배양액을 원심분리 하여 얻은 균체를 회수하였다.

Agar의 탈황에 미치는 효소 농도의 영향

Agar의 탈황 반응에 미치는 효소 농도의 영향을 알아보기 위하여 먼저 탈황반응은 0.6% agar(Junsei) 용액에 다양한 농도(1-50 unit/mL)의 효모 표층 arylsulfatase를 처리하고 3 시간 반응시켰다. 그 후 acetone으로 침전시킨 후 2-3배 양의 증류수에 세척한 후 동결 건조하여 분말 상태로 만들었다. 이렇게 효모 표층 arylsulfatase 처리로 제조된 agarose의 황 함량을 측정하여 각각 제조된 agarose의 황 함량을 비교하였다.

Agar의 탈황에 미치는 반응 온도의 영향

Agar의 탈황에 미치는 반응 온도의 영향을 알아보기 위해, 0.6% agar 용액에 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL을 처리하고 온도별(30°C, 35°C, 40°C, 45°C)로 3시간 반응시킨 후 300 mL의 acetone으로 침전시키고 3배 양의 증류수로 세척한 다음 동결건조하여 분말상태로 만들었다. 이렇게 제조된 agarose로 황 함량을 측정하였다.

Agar의 탈황에 미치는 Agar 농도의 영향

Agar의 탈황에 미치는 agar 농도의 영향을 알아보기 위해, 농도별 agar 용액(0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%)에 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL을 처리하고 40°C에서 3시간 반응시킨 후 300 mL의 acetone으로 침전시키고 3배 양의 증류수로 세척한 다음 동결건조 하여 분말상태로 만들었다. 이렇게 제조된 agarose로 황 함량을 측정 하였다.

Agar의 탈황에 미치는 Agar 종류의 영향

Agar의 탈황에 미치는 agar 종류의 영향을 알아보기 위해 agar 제조회사별(Junsei, Bacto, Sigma, Miryang)로 0.6% 용액을 준비하여 각각 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL로 처리하고 40°C에서 3시간 반응 한 후 300 mL의 acetone으로 침전시키고 3배 양의 증류수로 세척한 다음 동결건조 하여 분말상태로 만들었다. 이렇게 제조된 agarose로 황 함량을 측정하였다.

황 함량 측정법

시료 중의 황 함량 측정은 효소와 반응시킨 agar를 동결 건조하여 분말 상태로 만들어진 agarose를 증류수와 HCl을 첨가하여 가수분해하고, 13.3% BaCl₂·2H₂O, 2.67% Tween # 80 용액을 사용하여 1 시간 실온에 방치한 후 황을 침전 하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다[7].

Gel 강도 측정

Agar와 0.6% agar(Junsei)용액에 효모 표층 arylsulfatase

35 unit/mL로 처리한 후 40°C에서 3시간 반응하여 제조된 agarose, 그리고 상업적으로 시판되는 agarose와의 gel 강도 측정은 각각 1% 용액을 만들어 Reometer(Compac-100, Sun Scientific Co. Ltd., Japan)를 이용하여 측정하였다[7].

결과 및 고찰

효모 표층 Arylsulfatase 농도에 따른 Agar의 탈황

일반적으로 DNA 전기영동용 agarose의 품질을 평가하기 위하여 황 함량이 중요한 기준으로 사용된다. 따라서 본 연구에서는 효소 처리로 제조된 agarose의 황 함량을 시판 agarose와 비교하여 측정하였다. 본 실험에서 사용된 배양용 agar의 황 함량은 0.9% 이상으로 나타났고, 시판되는 전기영동용 agarose는 0.1% 이하로 나타났다. 실험 결과 처리한 효모 표층 arylsulfatase 처리 농도가 증가할수록 황 함량이 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 35 unit/mL의 효모 표층 arylsulfatase를 처리하였을 때 황 함량은 0.2%까지 감소하였으며, 35 unit/mL 이상의 효모 표층 arylsulfatase로 처리 하였을 때는 더 이상 황 함량이 감소하지 않았다(Fig. 1). 최근 연구 결과에 따르면 *E. coli*에서 과발현되어 생산된 재조합 arylsulfatase 효소의 경우 10 unit/mL의 농도에서 처리하였을 경우 황 함량이 0.3%까지 감소되었다[22, 24]. 이와 비교하여 agarose 제조 최적 효모 표층 arylsulfatase 처리 농도는 35 unit/mL로 다소 높았지만 제조된 agarose의 황 함량의 경우 0.2%로 상업적 agarose와 유사한 결과를 보였다. 따라서 35 unit/mL의 효모 표층 arylsulfatase의 처리가 agar의 탈황반응에 가장 효과적임을 알 수 있었다.

Agar의 탈황에 미치는 온도의 영향

효소에 의한 agar의 탈황에 미치는 반응 온도의 영향을 알

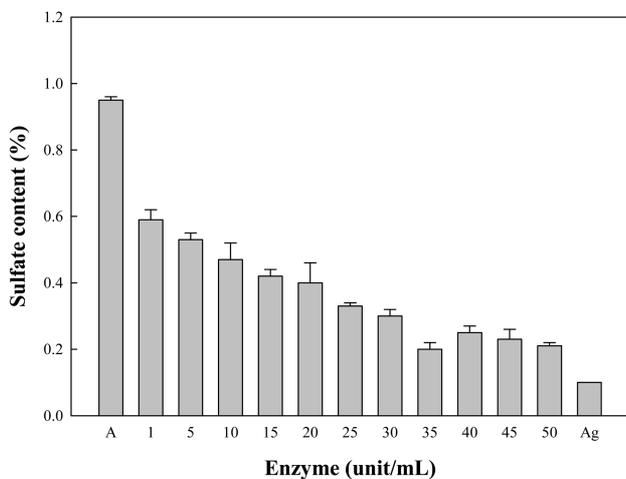


Fig. 1. Sulfate content of agarose prepared by various concentrations (1-50 unit/mL) of yeast surface arylsulfatase. Symbols: A, Agar (Junsei); Ag, Agarose (Cambrex Co.).

아보기 위하여 다양한 온도 조건에서 효모 표층 arylsulfatase에 의해 제조된 agarose의 황 함량을 측정하였다. 이를 위하여 0.6% agar 용액에 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL을 처리하고 반응온도를 30°C, 35°C, 40°C, 45°C로 달리하여 반응시켜 agarose를 제조하였다. 이렇게 제조된 각각의 agarose의 황 함량을 측정된 결과, 40°C까지는 황 함량이 유의성 있게 감소하는 것을 확인하였고 40°C 이상의 온도에서는 더 이상 황 함량이 감소하지 않았다. 40°C에서 반응시켜 제조한 agarose의 황 함량은 0.22%로 가장 낮았다(Fig. 2).

Agar 농도에 따른 효소에 의한 탈황 분석

효소에 의한 agar의 탈황반응에 미치는 agar 농도의 영향을 알아보기 위하여 다양한 농도(0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%)의 agar 용액에 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL로 처리하여 agarose를 제조하였다. 이렇게 제조된 agarose의 황 함량을 측정된 결과 0.6% agar 용액으로 제조한 agarose의 황 함량이 0.2%로 가장 낮았다(Fig. 3).

Agar 제조회사별에 따른 효소에 의한 Agar의 탈황 분석

Agar 종류별에 따른 탈황 조건을 알아보기 위해 각각 다른 제조회사의 agar(Junsei, Bacto, Sigma, Miryang) 용액 0.6%에 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL로 처리하여 agarose를 제조하였다. 이렇게 제조된 agarose의 황 함량을 측정된 결과, Junsei agar로 제조한 agarose의 황 함량이 0.2%로 가장 낮았으며, 이는 시판되는 agarose의 황 함량 0.1%와 유사했다(Fig. 4). 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 0.6% agar (Junsei) 용액에 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL를 처리하고 40°C에서 반응하여 제조된 agarose의 황 함량은 0.2%로, 이는 시중에 판매되는 agarose와 유사함을 알 수 있었다. *E. coli*에서 발현된 재조합 arylsulfatase 효소로

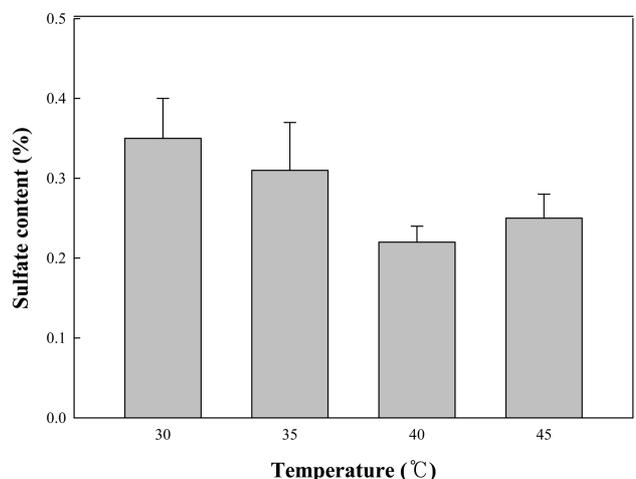


Fig. 2. Sulfate content of agarose prepared by yeast surface arylsulfatase in different temperatures (30°C, 35°C, 40°C and 45°C).

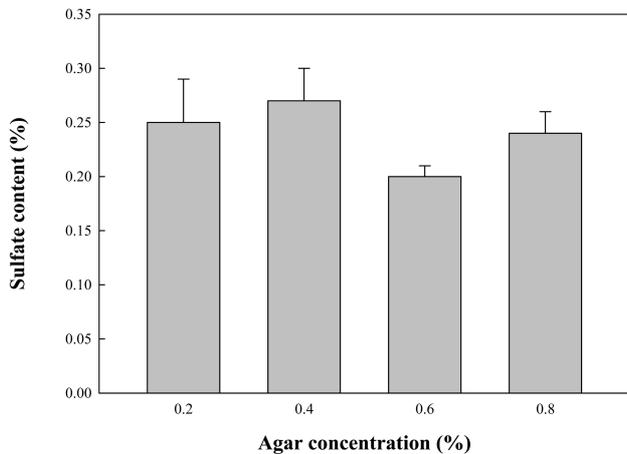


Fig. 3. Sulfate content of agarose prepared by yeast surface arylsulfatase in different agar concentrations (0.2%, 0.4%, 0.6% and 0.8%).

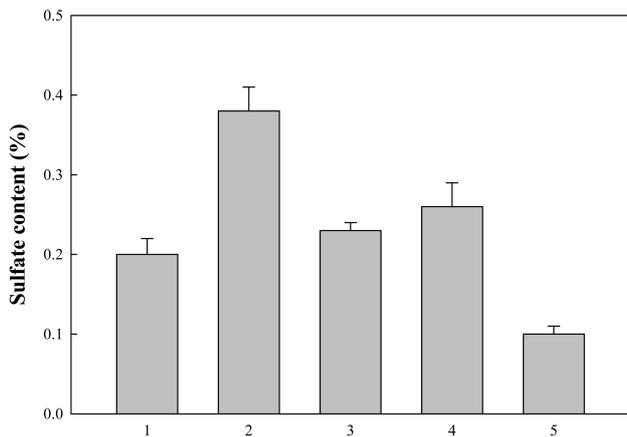


Fig. 4. Sulfate content of agarose prepared by yeast surface arylsulfatase in different agars. Symbols: 1, Agar (Junsei)+yeast surface arylsulfatase (35 unit/mL); 2, Agar (Bacto)+yeast surface arylsulfatase (35 unit/mL); 3, Agar (Sigma)+yeast surface arylsulfatase (35 unit/mL); 4, Agar (Miryang)+yeast surface arylsulfatase (35 unit/mL); 5, Ag, Agarose (Cambrex Co.).

제조한 agarose의 경우, 황 함량이 0.3% 정도인데 반해[22, 24], 효모 표층 arylsulfatase로 제조된 agarose의 경우 황 함량은 0.2%를 보여 효모 표층 arylsulfatase로 제조한 agarose가 보다 우수한 특성을 보였다.

효모 표층 Arylsulfatase에 의해 제조된 Agarose의 Gel 강도 측정

DNA 전기영동용 agarose의 품질평가에 중요 인자가 gel 강도이다. 따라서 황 함량이 가장 낮게 나왔던 조건(0.6% Junsei agar용액, 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL, 40°C, 3시간 반응)으로 제조된 agarose와 상업적으로 판매되는 agarose의 gel 강도를 측정하여 비교 분석하였다. *E. coli*에서 과발현되어 생산된 재조합 arylsulfatase 효소 10 unit/mL 처

Table 1. Physical and chemical properties of agarose prepared by treatment of yeast surface arylsulfatase.

	1% Gel	Gel strength (g/cm ²)	Sulfate content (%)
Control (Junseiagar)		<250.0	>0.9
Enzyme treated agarose (35 unit/mL)		559.8±0.12	0.20
Commercial agarose (Invitrogen Co.)		880.6±0.15	<0.15

리로 제조한 agarose의 경우 gel 강도는 800 g/cm²로 보고된 바 있다[22]. Gel 강도 측정 결과 시판되는 DNA 전기영동용 agarose의 gel 강도는 880.6±0.15 g/cm²이었고 agar(Junsei)는 250.0 g/cm²이하, 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL로 처리하여 제조한 agarose는 559.8±0.12 g/cm²였다. 따라서 효모 표층 arylsulfatase 처리로 제조한 agarose의 gel 강도는 *E. coli*에서 발현된 재조합 arylsulfatase를 처리하여 제조한 agarose의 gel 강도보다는 낮았는데, 이는 아마도 agarose 제조 시 효모세포의 완전 제거가 이루어지지 않은 것으로 사료된다. 본 실험에 연구된 황 함량과 gel 강도는 Table 1에 정리하였다. 결론적으로 세포표면에 arylsulfatase를 발현하는 효모 생축매는 저가의 agar로부터 친환경적인 방법으로 고순도 agarose를 생산하는 공정에 적용 가능성을 확인하였다.

요 약

Agar로부터 agarose 제조 시 유기용매를 이용해서 황을 제거하는 방법이 일반적으로 많이 사용되어진다. 하지만 agar의 황을 가수 분해하는 효소를 사용할 경우 agarose 제조 시 공정과정을 획기적으로 간소화할 수 있다. 따라서 arylsulfatase로 agaropectin에서 황 제거를 통해 agarose로 바꾸는 공정은 간단하고 높은 수율을 얻을 수 있기 때문에 agarose 생산에 효율적으로 적용할 수 있다. 본 연구에서는 arylsulfatase를 세포표면에 발현하는 효모생축매를 이용하여 제조한 agarose의 황 함량과 gel 강도를 측정하였다. 처리한 효모(효)소의 농도가 증가할수록 증가된 탈황 반응에 의해 황 함량이 줄어들었고, 특히 35 unit/mL의 효소 농도로 처리하였을 때 황 함량은 0.2%까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 황 함량을 가장 낮출 수 있는 최적 조건은 0.6% agar(Junsei) 용액에 효모 표층 arylsulfatase 35 unit/mL로 처리하고 40°C에서 3시간 반응시켰을 때 였다. 또한 1.0% DNA 전기영동용 agarose의 gel 강도는 효모 표층 arylsulfatase 처리로 제조된 agarose의 경우 559.8±0.12로 상업적 agarose의 gel 강도(880.6±0.15 g/cm²와) 보다는 낮았다. 따라서 효모 *S. cerevisiae*의 세포 표면에서 발현된 재조합 arylsulfatase 효소를 이용하여 agar로부터 전기영동용 agarose의 생산 공정에 적용 가능성을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교 2009년 일반 연구과제 지원에 의하여 이루어졌으며, 이 연구에 참여한 조은수와 김정환은 교육부의 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Allan, G., P. G. Johnson, Y. Lay, and K. V. Sarkanen. 1971. Marine polymers; Part I. A new procedure for the fractionation of agar. *Carbohydr. Res.* **17**: 234-236.
- Araki, C. 1937. Agar-agar. III. Acetylation of the agar-like substance of *Gelidium amansii*(L). *J. Chem. Soc. Japan* **58**: 1338-1350.
- Beil, S., H. Kehrl, J. Peter, W. Staudenmann, A. M. Cook, T. Leisinger, and M. A. Kertesz. 1995. Purification and characterization of the agaropectin sulfatase synthesized by *Pseudomonas aeruginosa* PAO during growth in sulfate-free medium and cloning of the arylsulfatase gene(*atsA*). *Eur. J. Biochem.* **229**: 385-394.
- Cho, E. S., H. J. Kim, J. H. Kim, Y. H. Kim, and S. W. Nam. 2009. Cell surface display of arylsulfatase gene from *Pseudoalteromonas carageenovora* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Mol. Biol.* **37**: 355-360.
- De Hostos, E. L., R. K. Togasaki, and A. Grossman. 1988. Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **106**: 29-37.
- Delisle, G. and F. H. Milazzo. 1970. The isolation of arylsulfatase isoenzymes from *pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **212**: 505-508.
- Dodgson, K. S. and R. G. Price. 1963. A note on the determination of the ester sulfate content of sulfated polysaccharides. *Biochem J.* **84**: 350-356.
- Duckworth, M. and W. Yaphe. 1971. The structure of agar. Part 1. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **16**: 189-197.
- Flemenger, G., B. Solomon, T. Wolf, and E. Hadas. 1990. Effect of polyethylene glycol on the non-specific adsorption of proteins to Eupergit C and agarose. *J. Chromatogr.* **510**: 271-279.
- Georgiou, G., H. L. Poetschke, C. Stathopoulos, and J. A. Francisco. 1993. Practical applications of engineering gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol.* **11**: 6-10.
- Guiseley, K. B. 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. *Carbohydr. Res.* **13**: 247-256.
- Guiseley, K. B., F. H. Kirpatrick, R. B. Provonchee, M. M. Dumais, and S. Nochumson. 1993. A further fractionation of agarose. *Hydrobiologia* **260**: 505-511.
- Henderson, M. J. and F. H. Milazzo. 1979. Arylsulfatase in salmonella typhimurium: Detection and influence of carbon source and tyramine on its synthesis. *J. Bacteriol.* **139**: 80-87.
- Hoshi, M. and T. Moriya. 1980. Arylsulfatase of sea-urchin sperm. 2. Arylsulfatase as a lysin of sea-urchins. *Dev. Biol.* **74**: 343-350.
- Izumi, K. 1970. A new method for fractionation of agar. *Agr. Biochem.* **34**: 1739-1740.
- Jansen, H. J., C. A. Hart, J. M. Rhodes, J. R. Saunders, and J. W. Smalley. 1999. A novel mucin-sulphatase activity found in *Bukholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **48**: 551-557.
- Kim, D. S., D. S. Lee, D. M. Cho, H. R. Kim, and J. H. Pyeon. 1995. Trace components and functional saccharides in marine algae 2. Dietary fiber content and distribution of the algal polysaccharides. *J. Korean Fis. Soc.* **28**: 270-278.
- Kim, H. C., H. J. Kim, W. B. Choi, and S. W. Nam. 2006. Inulooligosaccharides production from inulin by *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface endoinulinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 360-367.
- Kim, H. C., C. K. Lim, B. W. Kim, S. J. Jeon, and S. W. Nam. 2005. Surface display of bacillus CGTase on the cell of *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Life Sci.* **15**: 118-123.
- Kim, H. J., J. H. Lee, H. C. Kim, J. W. Lee, Y. H. Kim, and S. W. Nam. 2007. Characterization of cyclofructans from inulin by *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface cycloinulooligosaccharide fructanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 695-700.
- Kim, H. J., J. H. Lee, Y. H. Kim, and S. W. Nam. 2008. Production of xylooligosaccharides by yeast cell surface-displayed endoxylanase. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 307-313.
- Kim, M. J., Y. H. Jang, M. H. Sung, Y. H. Kim, and S. W. Nam. 2007. Constitutive expression of arylsulfatase from *Pseudoalteromonas carageenovora* in *E. coli* and its application to preparation of agarose. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 11-16.
- Lee, S. R., H. O. Cho, and S. K. Park. 1975. Extraction yield and quality attributes of agar from domestic seaweeds according to various pretreatments. *Korean J. Food Sci. Technol.* **7**: 109-114.
- Lim, J. M., Y. H. Jang, H. R. Kim, Y. T. Kim, T. J. Choi, J. K. Kim, and S. W. Nam. 2004. Overexpression of arylsulfatase in *E. coli* and its application to desulfatation of agar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 777-782.
- Little, M., P. Fuchs, F. Breitling, and S. Dubel. 1993. Bacterial surface presentation of proteins and peptides and alternative to phage technology. *Trends Biotechnol.* **11**: 3-5.
- Mackie, W. and R. D. Preston. 1974. Cell wall and intracellular region polysaccharides. In: Stewart WDP (eds) *Algal physiology and biochemistry*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp 64-65.
- Melo, M. R. S., J. P. A. Feitosa, A. L. P. Freitas, and R. C. M. de Paula. 2002. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Carbohydr. Polym.* **49**: 491-498.

28. Miech, C., T. Dierks, T. Selmer, K. V. Figura, and B. Schmidt. 1998. Arylsulfatase from *Klebsiella pneumoniae* carries a formylglycine generated from a serine. *J. Biol. Chem.* **273**: 4835-4837.
29. Milanesi, A. A. and J. W. C. Bind. 1972. Lysosomal enzymes in aquatic species II. Distribution and particle properties of thermally acclimated muscle lysosomes of rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* **41**: 473-491.
30. Renn, D. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: status, needs and prospects. *Trends Biotechnol.* **15**: 9-14.
31. Schekman, R. 1985. Protein localization and membrane traffic in yeast. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1**: 115-143.
32. Schreuder, M. P., A. T. Mooren, H. Y. Toschka, C. T. Verrips, and F. M. Klis. 1996. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* **14**: 115-120.
33. Yoon, H. S. and Y. H. Park. 1984. Studies on the composition of agarose and agartin in agar-agar. *Bull Kor. Fish. Soc.* **24**: 27-33.

(Received Nov. 19, 2010/Accepted Nov. 22, 2010)