

알긴산 분해 세균의 분리 및 생육 특성

주동식 · 조순영¹ · 이응호*

부산수산대학교 식품공학과, ¹강릉대학교 식품과학과

Isolation of Alginate-Degrading Bacteria and Production of Alginate-Degrading Activities by the Bacteria

Joo, Dong-Sik, Soon-Yeong Cho¹ and Eung-Ho Lee*

Dept. of Food Science and Technology, National Fisheries of Pusan, Pusan 608-737, Korea

¹Dept. of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

Abstract — Total 176 alginate-degrading bacterial strains were isolated from marine mollusc, marine echinodermata, seaweed, and soils. Among the isolates, five strains (No. 28, 51, 79, 135, and 145) had higher level of alginate-degrading activity. The isolate No. 28, 51, 79, and 135 were identified as the genus *Enterobacter* and the strain No. 145 as the genus *Vibrio*. We used these strains to examine the optimal conditions for the production of alginate-degrading activity. The five strains produced the highest level of alginate-degrading activity in the culture medium containing 0.7% sodium alginate and 0.7% peptone as a sole carbon and nitrogen source, respectively. Optimum temperature, initial pH, and culture time for the alginate-degrading activity were $28 \pm 2^\circ\text{C}$, 7.5 and 60 hours, respectively.

갈조류 세포벽 구성다당류인 알긴산은 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid가 여러가지 비율로 β-1,4 결합한 polyuronide이다(1-7).

미생물 효소에 의한 알긴산의 분해에 관한 연구로는 해수 및 해양토양으로부터 분리한 네 종류의 미생물이 정제된 알긴산 뿐만 아니라 해조도 분해한다고 Waksman 등(8)이 처음 보고한 이래 몇몇 연구자들의 계속적인 보고가 있었다. 즉, *Pseudomonas*속을 포함한 많은 알긴산 분해 효소 생산 미생물이 보고되었다(9-19).

한편, 지금까지의 알긴산 분해효소에 대한 연구는 대부분이 알긴산의 구조분석적인 측면이나 효소의 일반특성 측면에서만 연구되어 왔으며(20-23), 알긴산 올리고당에 대한 연구는 김川(24, 25)에 의해 triuronide의 제조 및 분리가 시도된 바 있으나 그 이후에는 거의 없으며, 최근에 일본에서 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 것으로 발표되고 있다.

본 연구에서는 알긴산으로부터 유용한 올리고당을 제조할 목적으로 알긴산을 특징적으로 분해하는 효소를 미생물로부터 획득하기 위해 자연계로부터 본 효소의 생산능이 우수한 세균 검색을 행하여, 다음의 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

알긴산 분해 세균 분리원

알긴산 분해 균주의 검색 분리를 위한 시료는 토양, 해수 및 전복(*Haliotis discus*), 고둥(*Omphalius pfeifferii*, *Chlorostoma argyrostoma*), 성게(*Aonothoidaris crassispina*, *Hemicentrotus pulcherrimus*), 해삼(*Stichopus japonicus*), 명게(*Halocynthia roretzi*), 피조개(*Scapharca broughtonii*), 홍합(*Mytilus coruscus* Gould), 미역 등의 해산동·식물을 시료로 하였다.

세균 분리 및 배양 배지

알긴산 분해 세균 분리 배지: 세균 분리 배지는 門田 등(26)이 보고한 배지를 사용하였으며, 배지의

Key words: Alginate, *Enterobacter*, *Vibrio*

*Corresponding author

조성은 하층배지로 NaCl 3.0%(토양시료 0.85%), KH₂PO₄ 0.1%, FeSO₄·6H₂O 0.001%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, Bacto-agar 2.0%, pH 7.5이었고, 상층배지로 sodium alginate 1.0%, bacto-agar 2.0%, pH 7.5이었다.

Peptone 배지 및 알긴산 분해능 측정 배지: peptone 배지는 5.0% bacto-peptone, 0.5% sodium alginate, 3% NaCl, pH 7.5였고, 분리한 균주의 알긴산 분해능 측정 배지는 분리 배지중 하층 배지에 bacto-agar만 제외한 배지였다.

알긴산 분해 세균 분리

알긴산 분해 활성을 갖는 세균의 분리는 분리 배지중 하층배지를 멸균한 후 petri dish에서 완전히 굳힌 다음, 상층 배지를 멸균하여 다시 그 위에 부어 굳힌 후 단계별로 희석된 시료를 0.1 ml씩 취하고 conradi 막대로 도말하여 28±2°C에서 4~6일간 배양한 후 형성된 colony를 분리하는 방법과 하층 배지를 굳힌 다음, 단계별로 희석된 시료를 0.1 ml씩 취하고 그 위에 상층 배지를 부어 시료와 혼합하여 배양한 후 형성된 colony를 분리하는 방법을 동시에 행하였다. 분리한 세균은 다시 streak culture로 독립 colony를 분리하여 분해능 측정 시험 균주로 하였다.

분리 세균의 알긴산 분해능 측정

분리된 세균은 peptone 배지에 접종하여 28±2°C에서 60시간 배양한 다음 이 배양액을 알긴산 분해능 측정 배지에 각각 2.0 ml씩 접종하고, 28±2°C에서 6일간 정지 배양하였다. 이 배양액을 끓는 물에 10분 정도 가열처리하여 성장을 저지하고 분해능 측정 시료로 하였다. 배양전·후의 배지속의 환원당 및 점도 변화를 측정하여 분해능을 비교하였다. 즉, 환원당 측정은 Somogyi-Nelson 법(25)으로 시료와 銅시약을 반응시켜 산화제1동(Cu₂O)을 생성시키고 여기에 몰리브덴 용액을 가하여 발색시킨 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여 표준당(mannuronic acid)을 사용, 작성한 표준곡선으로부터 구하였다. 점도는 회전점도계(Brookfield Co.)를 이용하여 25°C에서 측정하였다.

알긴산 분해효소 활성 측정

Peptone 배지를 기본배지로 하고 탄소원 및 질소원의 종류, 탄소원 및 질소원 농도, NaCl 농도, 배양 온도, 초기 pH 및 배양시간을 달리하면서 60시간 배양한 후 원심분리(12,000×g, 30 min)한 것을 조효

소액으로 하여 기질인 0.4% sodium alginate(50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.3 M NaCl) 5 ml와 이 조효소액 1 ml를 항온수조(37°C)에서 50분간 반응시킨 후 그 중 1 ml를 취하여 Somogyi-Nelson법(27)에 의해 환원당을 정량하였다. 효소 1 unit는 1분간에 1 μmole의 환원당을 생산하는 효소량으로 정의하였고, 상대활성으로 나타내었다.

결과 및 고찰

균주 분리

균주 분리를 위한 평판 배지에서 토양 21주, 해수 4주, 미역 25주, 전복 21주, 고동 19주, 성게에서 14주를 포함하여 총 176주를 분리하였다(Table 1). 이 분리 균주는 냉장(5±2°C) 보관하면서 실험에 이용하였다.

분리 균주의 알긴산 분해능

환원당 생성 및 점도 저하로부터 분해능을 측정한 결과, 100여 균주가 알긴산 분해능을 가지고 있는 것으로 나타났으며, 그 중에서도 14균주가 분해능이 특히 우수한 것으로 판단되었다(Table 2). 분해능이 우수했던 균주의 분리원을 살펴보면 23, 28, 43, 51 및 145균주가 미역에서 35, 71균주는 해삼에서 135, 136균주는 토양에서 79, 83 및 86균주는 전복에서 153, 168균주는 고동에서 각각 분리되었다. 이는 전복이나 고동과 같은 연체동물은 알긴산을 식이로 하여

Table 1. Samples used for isolation of alginate degrading bacteria and the number of bacterial strains isolated from the samples

Soil	21 strains
Sea water	4 strains
Sea mustard	25 strains
Sea cucumber, <i>Stichopus japonicus</i>	21 strains
Abalone shell, <i>Haliotis discus</i>	21 strains
Seaurchin, <i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	16 strains
Purple seaurchin, <i>Aonothodiaris crassispina</i>	14 strains
Top shell, <i>Omphalius pfeifferii</i>	19 strains
(<i>Chlorostoma argyrostoma</i> , <i>Omphalius rusticus</i>)	
Blue muscle, <i>Mytilus coruscus</i> Gould	10 strains
Ark shell, <i>Scapharca broughtonii</i>	4 strains
Kaebul, <i>Urechis unicinctus</i>	3 strains
Sea squirt, <i>Halocynthia roretzi</i>	3 strains
Putrefacted sea mustard	15 strains

Table 2. The alginate degrading ability of the isolated strains

Strain no.	Cell growth ¹ (O.D)	Reducing sugar ² (mg/ml)	Viscosity ³ (cps)
23	1.112	0.099	19.0
28	1.095	0.734	6.8
35	1.329	0.736	8.4
43	0.920	0.350	7.9
51	1.010	0.520	7.5
71	0.727	0.155	9.9
79	0.645	0.129	10.8
83	0.820	0.166	8.7
86	0.741	0.130	9.2
135	1.077	0.450	7.9
136	1.102	0.325	8.8
145	1.513	0.748	8.3
153	1.135	0.344	7.2
168	0.863	0.172	10.3

¹O.D. value at 620 nm

²Determined by Somogyi-Nelson method

³Viscosity determined with rotatory viscometer(Brookfield Co.제, LVTDV-II); temp. 25°C, Control(1.1% Na-alginate)-146 cps

성장한다는 보고와도 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다(28-32). 한편, 냉장 및 상온 보관중 23, 35, 43, 71, 83, 136, 153 및 168균주의 경우, 급격하게 알긴산 분해능이 소실되었다. 따라서 이들 균주들을 제외한 28, 51, 79, 135 및 145균주에 대한 성장조건에 따른 알긴산 분해능 실험을 계속하였다.

분리 균주의 생육조건에 따른 조효소액의 활성

탄소원의 종류와 농도 : 알긴산 이외의 탄소원을 첨가하여 얻은 조효소액의 알긴산 분해 활성을 측정한다(결과 Table 3) 실험 균주로 사용한 다섯 균주 모두 알긴산이 첨가되었을 때 가장 높은 활성을 보였고, 그외의 단당류 또는 이당류는 알긴산 분해 효소를 생산하는데 거의 영향을 미치지 않았으며, 이로 미루어 볼 때 이들 균들이 생산하는 효소는 알긴산에 의해 유도되는 유도효소의 일종인 것으로 사료된다(33). 다음은 알긴산 분해 효소 생성에 탄소원으로 절대적으로 필요한 알긴산의 농도를 달리하면서 그때의 분해 활성을 측정하여본 결과 135균주를 제외한 네 균주는 알긴산 농도 0.7%에서 가장 높은 활성을 보였고, 토양에서 분리한 균인 135균주는 0.5% 농도

Table 3. Influence of carbohydrates as carbon source on the crude enzyme activity

Carbon source (0.5% conc.)	Relative activity (%)				
	28*	51	79	135	145
Sodium alginate	100	100	100	100	100
Soluble starch	—	—	—	21.2	—
Glucose	18.6	—	27.3	—	—
Lactose	—	—	—	—	—
Galactose	—	—	—	—	—
Mannose	34.5	20.2	8.4	—	25.2
Xylose	—	7.1	—	—	—
Arabinose	—	—	—	—	—
Sucrose	29.1	12.9	—	19.6	35.1

*Strain no.

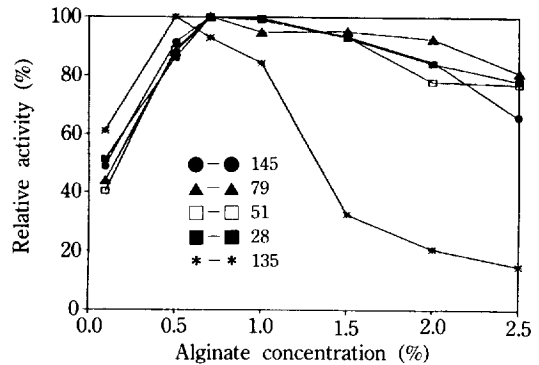


Fig. 1. Effect of sodium alginate concentration on the production of alginolytic enzyme.

Base medium and growth condition; peptone-0.5%, NaCl-2.5%(135 strain-0.85%), pH-7.5, temp. 28±2°C incubation time-48 h.

에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 1).

질소원의 종류와 농도 : 질소원을 달리하면서 얻어진 조효소액의 알긴산 분해 활성을 측정한다(결과 다섯 균주 모두 peptone 0.5% 첨가시 가장 높은 활성을 보였으며, 28, 79, 145균주는 yeast extract 0.5% 첨가시 90% 이상의 상대활성을 보였으며, 51균주는 casamino acid가 1%로 첨가되었을 때 92%의 상대활성을 나타내었다(Table 4). 한편, peptone의 농도를 각각 달리하여 첨가하면서 조효소액의 활성을 측정한다(결과 peptone 농도 0.7%에서 최대 활성을 보인 후 그 이상의 농도에서는 활성에 큰 영향을 주지 못하였다(Fig. 2).

NaCl 농도 : 최종 선별한 대다수의 공시균주가 해

Table 4. Influence of nitrogen compounds as nitrogen source on the crude enzyme activity

Nitrogen source (0.5% conc.)	Relative activity (%)				
	28 ¹	51	79	135	145
Peptone	100	100	100	100	100
Yeast extract	93.2	72.4	95.8	66.8	89.1
Casamino acid ²	43.6	92.2	40.0	32.1	53.2
Malt extract	20.2	15.8	—	41.9	—
Urea	—	—	—	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	11.9	24.2	—	—	—
NH ₄ Cl	—	—	—	—	—
NaNO ₃	—	—	—	—	—

¹Strain no.

²1.0% concentration

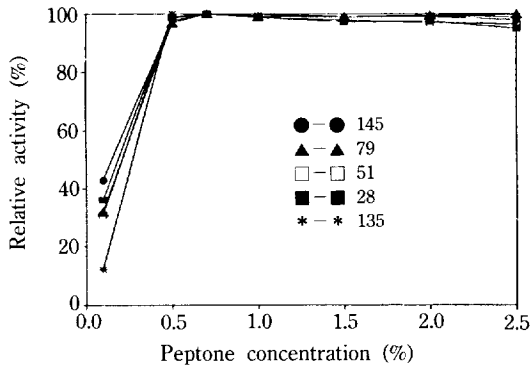


Fig. 2. Effect of bacto-peptone concentration on the production of alginolytic enzyme.

Base medium and growth condition; Na-alginate-0.7%, (135 strain 0.5%), NaCl-2.5%(135 strain-0.85%), pH-7.5, temp. 28±2°C, incubation time-48 h.

양환경으로부터 분리되었기에 일정농도의 NaCl이 요구될 것으로 판단되어(34), NaCl 농도를 변화시키면서 생성된 조효소액의 분해 활성을 Fig. 3에 나타내었다. 예상했던대로 미역 등 해양생물로부터 분리된 28, 51, 79, 145균주는 NaCl 농도 2.5~3.0%에 가장 높은 활성을 보였고, 토양에서 분리한 135균주는 0~0.85% 농도에서 가장 높은 활성을 보였다.

온도: 배양온도가 조효소의 알긴산 분해 활성에 미치는 영향을 실험한 결과(Fig. 4), 해양생물로부터 분리한 균주는 모두 25~30°C 에서 가장 높은 활성을 보여 주었으며, 30°C 이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 저하하였으며, 37°C 부근에서는 거의 활성을 보이지 않았다. 한편, 토양에서 분리한 135균주는

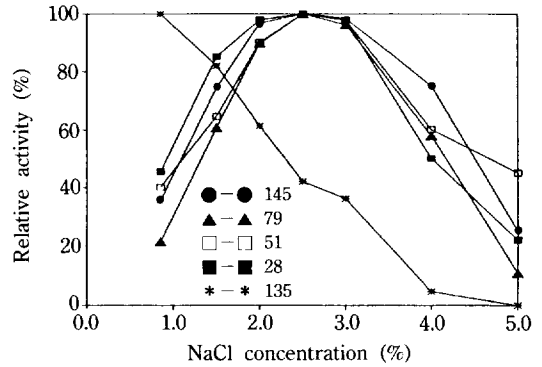


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the production of alginolytic enzyme.

Base medium and growth condition; Na-alginate-0.7%, (135 strain 0.5%), peptone-0.7%, pH-7.5, temp. 28±2°C, incubation time-48 h.

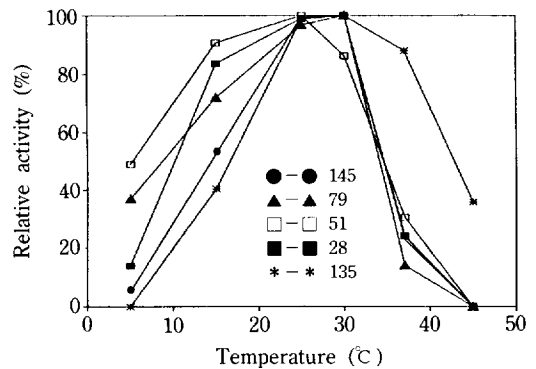


Fig. 4. Effect of incubation temperature on the production of alginolytic enzyme.

Base medium and growth condition; Na-alginate-0.7%, (135 strain 0.5%), peptone-0.7%, NaCl-2.5% (135 strain-0.85%), pH-7.5, incubation time-48 h.

25~37°C 에서 높은 활성을 나타내어(Fig. 4) 해양생물로부터 분리된 균주는 차이를 보였는데, 이는 해양환경에서 분리되었기 때문에 다소 저온에서 활발한 성장 및 활성을 나타내는 것으로 생각되었다.

초기 pH 및 배양시간: 초기 pH를 4.0에서 9.0까지 변화시키면서 얻어진 조효소액의 활성을 측정 한 결과 pH 7.0~7.5에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH 6.5 이하, 8.0 이상에서는 급격히 활성이 떨어짐을 알 수 있었다(Fig. 5). 60시간 배양후 초기 pH가 알칼리성이었던 배양 배지의 pH를 측정 한 결과 pH가 중성 영역으로 낮아졌는데 이는 배지중의 알긴산의 분해 때문인 것으로 생각된다. 다섯 균주 모두 배양 60시간 때 최대 활성을 보였고, 그 이후로는 효소활성이 거의

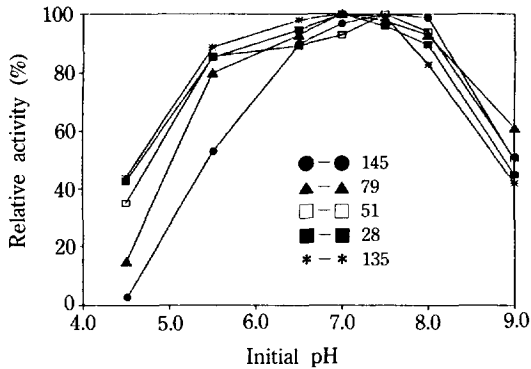


Fig. 5. Effect of initial pH on the production of alginolytic enzyme.

Base medium and growth condition; Na-alginate-0.7%, (135 strain 0.5%), peptone-0.7%, NaCl-2.5% (135 strain-0.85%), temp. 28±2°C, incubation time-48 h.

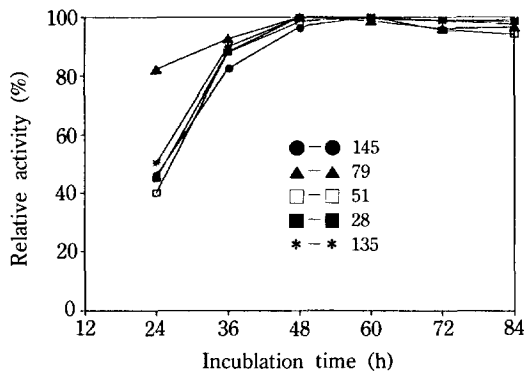


Fig. 6. Effect of incubation time on the production of alginolytic enzyme.

Base medium and growth condition; Na-alginate-0.7%, (135 strain 0.5%), peptone-0.7%, NaCl-2.5% (135 strain-0.85%), pH-7.5, temp. 28±2°C.

변화가 없었다(Fig. 6).

환원당 생성

각 균주의 최적 배양조건에서 배양을 행한 후 얻어진 효소액으로 환원당 생성능을 비교하여 본 결과 (Fig. 7) 145균주가 0.355 mg/ml로 가장 많은 환원당을 생성하였고, 그 다음으로 51, 28, 79균주의 순이었으며, 토양으로부터 분리한 135균주는 0.097 mg/ml로 환원당 생성량이 가장 낮았다.

균주의 동정

다섯 균주 모두 그람 음성 간균으로 운동성이 있고, catalase 생성, oxidase는 145균주만 생성, indole 비

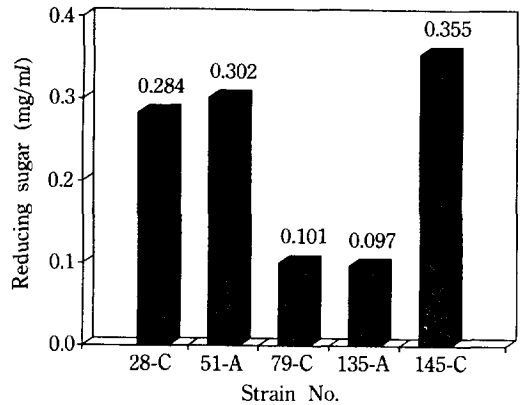


Fig. 7. Comparison of production alginolytic enzyme by the isolated bacteria.

Reaction mixture in total volume of 6 ml contained 0.4% sodium alginate (5 ml, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5). Reaction carried out at 37°C for 50 min. A portion of 1.0 ml was withdrawn and reducing sugar was determined.

생성, VP-MR 음성, 145균주 citrate 이용, lysine 이용, glucose · maltose · sucrose · mannitol 이용, 145균주 0% NaCl 비성장 및 MacConkey agar 성장 등의 특징을 Gibbs와 Skinner(35), 清水(36) 및 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라 동정해 볼 때, 28, 51, 79, 135균주는 *Enterobacter*속으로, 145균주는 *Vibrio*속으로 판단되었다.

요 약

해양생물 및 토양 등으로부터 총 176주의 알긴산 분해능을 나타내는 균주를 분리하여 이중 분해능이 특히 강력했던 28, 51, 79, 135 및 145균주의 최적 효소 생산 및 배양조건을 실험하였고, 토양으로부터 분리한 135균주를 제외한 4균주는 알긴산 0.7%, peptone 0.7%, NaCl 2.5~3.0%, 배양온도 25~30°C 로 60 시간 배양했을 때 조효소액의 효소활성이 가장 높았으며, 135균주는 NaCl 요구성과 배양 온도에서 다른 네 균주와 차이를 보였다. 환원당 생성량은 145균주가 0.355 mg/ml로 가장 높았다. 145균주는 *Vibrio*속으로, 나머지 네 균주는 *Enterobacter*속으로 분류 · 동정되었다.

감사의 말

본 연구는 1991년 한국과학재단 연구비 지원(과제

번호 : 91-07-0014)으로 수행된 연구결과의 일부이며, 이를 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Fisher, F.G. and H. Dorfel. 1955. The polyuronic acids of brown algae. Part I. *Z. Physiol. Chem.* **302**: 186-203.
- Hirst, E.L., E. Percival and J.K. Wold. 1964. The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. Chem. Society.* **8**: 1493-1499.
- Hirst, E.L. and D.A. Rees. 1965. The structure of alginic acid. Part V. Isolation and unambiguous characterization of some hydrolysis products of the methylated polysaccharide. *J. Chem. Society.* **7**: 1182-1187.
- Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrod. 1966. A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chemica Scandinavica.* **20**: 183-190.
- Haug, A., B. Larsen and O. Smidsrod. 1967. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica.* **21**: 691-704.
- Penman, A. and G.R. Sanderson. 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Res.* **25**: 273-282.
- 金東洙, 朴榮浩. 1984. 알긴산의 化學的 組成 및 物性에 關한 研究. (1) 감태 알긴산의 우론산 組成. *韓國水産學會誌* **17**: 391-397.
- Waksman, S.A. and M.C. Allen. 1934. Decomposition of polyuronides by fungi and bacteria. *J. Bacteriol.* **28**: 213-220.
- 吉川三吉. 1954. *Pseudomonas alginoliquefaciens* I의 알긴산분해酵素 について. *兵庫農科大學研究報告* **1**: 53-56.
- Eller, J. and W.J. Payne. 1960. Studies on bacterial utilization of uronic acid. IV. Alginolytic and mannuronic acid oxidizing isolates. *J. Bacteriol.* **80**: 193-199.
- Ando, Y. and K. Inoue. 1961. Decomposition of alginic acid by microorganism-IV. On the *Vibriotype* bacteria, newly isolated from the decaying *Laminaria*. *Bull. of Jap. Soc. Sci. Fish.* **27**: 339-341.
- 安藤秀明, 井上勝弘. 1965. 微生物による 알긴산의 分解-VI. 2種 알기나제의 作用樣式 について. *日本水産學會誌* **31**: 552-557.
- Kashiwabara, Y., S. Hiroshi and K. Nisizawa. 1969. Alginate lyases of *Pseudomonas*. *J. Biochem.* **66**: 503-512.
- Davidson, I.W., I.W. Sutherland and C.J. Lawson. 1976. Purification and properties of an alginate lyase from a marine bacterium. *Biochem. J.* **159**: 707-713.
- Stevens, R.A. and R.E. Levin. 1976. Viscometric assay of bacterial alginase. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 896-899.
- Riesen, V.L. 1980. Digestion of algin by *Pseudomonas maltophilia* and *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 92-96.
- Linker, A. and L.R. Evans. 1984. Isolation and characterization of an alginase from mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **159**: 958-964.
- Hansen, J.B. and L.K. Nakamura. 1985. Distribution of alginate lyase activity among strains of *Bacillus circulans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1019-1021.
- Dunne, W.M., J. and F.L.A. Buckmire. 1985. Partial purification and characterization of a polymannuronic acid depolymerase produced by a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a patient with cystic fibrosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 562-567.
- Larsen, B., O. Smidsrod, A. Haug and T. Painter. 1969. Determination by a kinetic method of the nearest-neighbour frequencies in a fragment of alginic acid. *Acta Chemica Scandinavica.* **23**: 2375-2388.
- Tsujino, I. and T. Saito. 1961. A new unsaturated uronide isolated from alginase hydrolysate. *Nature* **192**: 970-971.
- Fujibayashi, S., H. Habe and K. Nisizawa. 1970. Heterogeneity of alginate in special reference to the enzymatic degradation. *J. Biochem.* **67**: 37-45.
- Min, K.H., S.F. Sasaki, Y. Kashiwabara, H. Suzuki and K. Nisizawa. 1977. Multiple components of endo-polyguluronide lyase of *Pseudomonas* sp.. *J. Biochem.* **81**: 539-546.
- 吉川三吉. 1961. 알긴산의 酵素的 分解 であられる 올리고우로나이드 について(I). *生化學* **33**: 794-798.
- 吉川三吉, 清原利文. 1964. 알긴산의 酵素的 分解 であられる 올리고우로나이드 について(II). *生化學*. *兵庫農科大學研究報告* **6**: 51-56.
- 門田 元, 多賀信夫. 1985. 海洋微生物研究法. 學會出版センター. Pp. 69-80.
- 日本食品工業學會. 1984. 食品分析法. 光琳. Pp. 170-172.
- Anzai, H., N. Uchida and E. Nishida. 1990. Determination of D-mannuronic to L-guluronic acids ratio in acid hydrolysis under improved conditions. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **56**: 73-81.

29. Onishi, T., M. Suzuki and R. Kikuchi. 1985. The distribution of polysaccharide hydrolase activity in gastropods and bivalves. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* **51**: 301-308.
30. Uki, N. and S. Kikuchi. 1979. Food value of six benthic micro-algae on growth of juvenile abalone, *Haliotisdiscus hannai* Bull *Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.* **40**: 47-50.
31. Sagara, J. and K. Sakai. 1974. Feeding experiment of juvenile abalones with four artificial diets. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.* **77**: 1-5.
32. Sakai, S. 1962. Ecological studies on the abalone, *Haliotisdiscus hannai* Ino-I. Experimental studies on the food habit. *Bull. Jan. Soc. Sci. Fish.* **28**: 766-779.
33. 安藤秀明, 井上勝弘. 1961. 微生物によるアルギン酸の分解-V. *Vibrio* sp. SO-20のアルギナ-ゼについて. *日本水産學會誌* **27**: 342-347.
34. Baxter, R.M. 1959. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.* **5**: 47-57.
35. Gibbs, B.M. and F.A. Skinner. 1966. Identification methods for microbiologist. Academic Press.
36. 清水 湖. 1978. 海洋學講座 No. 11, 海洋微生物, 東大出版, 東京, Pp. 45-46.

(Received May 6, 1993)