

## 알긴산 분해균 *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체내 효소의 정제 및 특성

주동식 · 이정석 · 박중제 · 조순영<sup>1</sup> · 안창범<sup>2</sup> · 이응호\*

부산수산대학교 식품공학과, <sup>1</sup>강릉대학교 식품과학과, <sup>2</sup>여수수산대학교 식품영양학과

### Purification and Characterization of the Intracellular Alginase from *Vibrio* sp. AL-145

Dong-Sik Joo, Jung-Suk Lee, Jung-Je Park, Soon-Yeong Cho<sup>1</sup>,  
Chang-Bum Ahn<sup>2</sup> and Eung-Ho Lee\*

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

<sup>1</sup>Department of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, National Fisheries University of Yosu, Yosu 550-749, Korea

**Abstract** — The intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145 was purified by ion chromatography on DEAE-Cellulose column, Q-Sepharose column, and gel filtration on Sephadex G-100 column. The optimum pH and temperature for the activity of the purified intracellular enzyme were 8.0 and 37°C, respectively. The enzyme was stable at the pH range of 7.5~8.5, and at 30°C for 30 min. The molecular weight of the intracellular enzyme was estimated to be about 23,000 daltons by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. NaCl was required for enzyme activity and the optimum concentration was 0.5 M. The activity of intracellular enzyme was inhibited by Co<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, 0-phenanthroline, ρ-CMB, EDTA and iodoacetate, and stimulated by Ca<sup>2+</sup>, L-cysteine and 2-mercaptoethanol. This enzyme was an alginase specifically degrading alginic acid.

해조 다당류의 한 종류인 알긴산(alginic acid)은 갈조류의 세포벽 구성 당류로 D-mannuronic acid와 L-guluronic acid가 결합한 hetero 형 다당류(1-6)로 식품 및 공업용으로 널리 이용되고 있고, 그 기능에 대해서도 많이 알려져 있다(7, 8). 최근, 알긴산 이용의 범위를 확대하기 위해 여러가지 연구가 행해지고 있으며, 그 한 분야로 미생물에 의한 알긴산의 분해에 대한 연구이다(9-11). 한편, 올리고당이 갖는 여러가지 기능성이 최근 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있으며(12-15), 공업적으로 생산되어 이용되는 올리고당도 있다(16, 17).

본 연구는 알긴산을 특징적으로 분해하는 효소를 이용하여 기능성을 가지는 알긴산 유래 올리고당류를 생산하는데 최종적인 목표를 두고, 먼저 알긴산을 특징적으로 분해하는 균주의 분리를 시도하였다. 그 결과 미역에서 알긴산을 강하게 분해하는 균주를 분리하였고(18), 분리된 균주가 생산하는 균체외 효소에 대한 정제, 특성을 보고한 바 있다(19). 본 보에서는

이 균주가 생산하는 균체내 효소의 정제 및 특성을 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

전보(18)에서 보고한 것처럼 미역으로부터 분리하여, 점도저하율과 환원당 생성능으로부터 알긴산 분해능이 우수한 것으로 나타난 *Vibrio* sp. AL-145 균주를 사용하였다.

#### 균체 회수 및 조효소액 제조

주 등(19)이 보고한 것처럼 배지의 조성은 즉, 0.7% sodium alginate, 0.7% peptone, 2.5% NaCl로 하였고, pH는 7.5였다. 이 배지에 균을 접종하고 28±2°C에서 96시간 정도 정치배양을 하였고, 이 배양액을 원심 분리(12,000×g, 30 min)하여 균체를 분리하였다. 얻어진 균체를 미리 냉각시킨 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 0.85% NaCl)로 세척하고, 냉각된 세포마쇄용 aluminum oxide(Junsei Chemical Co., Ltd)를 균체 무게에 대해 10~15배 량을 첨가하여 약 20분간 세

**Key words:** Alginase, intracellular enzyme, alginic acid, *Vibrio* sp. AL-145

\*Corresponding author

포를 파쇄하였다. 파쇄된 균체를 냉각된 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 현탁시킨 다음 원심분리(12,000 ×g, 20 min)하여 상층액을 0.45 μm membrane filter로 여과하고, 이 여액을 본 실험의 균체내 효소로 하였다.

#### 단백질 농도, 효소 활성 측정 및 분자량 측정

효소의 정제 과정중의 단백질 획득의 검색은 분광광도계(UV/V-spectrophotometer Shimadzu UV-120-02)로써 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, 단백질 농도는 Lowry 등(20)의 비색법에 의해 bovine serum albumin(Sigma Co., USA)을 표준단백질로 하여 얻은 검량 곡선으로부터 구하였다.

효소활성은 기질로써 0.4% 또는 0.8% Na-alginate (50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0, 0.3 M NaCl)를 사용하였고, 37°C에서 50분간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson 법(21)에 의해 흡광도를 측정하여 표준당(mannuronic acid)으로 작성한 표준 검량선으로부터 환원당을 측정하였다. 효소 1 단위는 1분간에 1 μmole의 환원당을 생산하는 효소량으로 하였다.

분자량 측정은 순도 검정을 위한 분석은 Davis(22)의 Disc-PAGE(7.5% polyacrylamide gel electrophoresis)에 의하였으며, 분자량의 측정은 Laemmli의 방법(23)에 따라 SDS-분자량 표준단백질의 전기영동 이동도를 대조로 하여 SDS화 한 효소의 전기영동 이동도를 비교하여 효소의 구성 subunit의 분자량을 측정하였다.

#### 효소 정제

상기 방법으로 제조한 조효소액을 한외여과기로 농축을 행하여 30 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 평형화된 DEAE-Cellulose(Φ 3.0×30 cm)에 시료를 흡착시킨 다음 동일 완충액으로 흡착되지 않은 단백질을 용출시키고, 동일 완충액으로 만든 염용액을 써서 농도구배법(0~1.0 M NaCl)으로 용출시켰다. 기질에 대해 활성이 강한획분을 모아 농축하고, 다시 동일 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-100(Φ 2.6×100 cm)에서 용출, 분획을 행하였다. 얻어진 활성 획분을 농축하여 30 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 평형화시킨 Q-Sepharose(Φ 1.5×25 cm)에 흡착시키고, 동일 완충액으로 만든 염용액을 사용하여 농도구배법(0~1.0 M NaCl)으로 용출, 분획하였다. 기질에 대해 활성이 강한 획분을 농축하여 전기영동으로 순도 검정을 행한 후 Sephadex G-100으로 재분획을 행하고 활성 획분을 모아 순도 검정을 한 후 최종 정제 효소를 제조하였으며, 이 효소를 특성 실험용 효소액으로

하였다.

#### 효소활성 최적조건

정제효소 0.1 ml에 대해 0.8% Na-alginate 1 ml와 각 pH 별 완충액(pH 4.0~6.0 ; 0.1 M sodium acetate-acetate buffer, pH 7.0~9.0 ; 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 10.0~11.0 ; 0.1 M sodium carbonate-sodium hydroxide carbonate) 1.0 ml를 혼합하여 반응(37°C, 50 min)시킨 후 환원당을 측정하여 활성 최적 pH를 결정하였다.

활성 최적 온도는 정제효소 0.1 ml와 0.4% 기질용액 2.0 ml를 혼합하여 반응온도를 20°C에서 60°C까지 5~10°C 간격으로 조절하면서 각각 50분간 반응시킨 후 환원당을 측정하였다.

#### 효소 안정성

효소 안정성에 미치는 pH의 영향은 정제효소를 pH 4.0에서 pH 11.0까지의 각 완충액에서 60분간 투석시킨 후 효소액 0.1 ml와 0.4% 기질용액 2.0 ml를 혼합하여 37°C에서 50분간 반응시킨 후 잔류 활성으로부터 측정하였다.

정제효소를 0~80°C의 각 온도대에서 30분간 교반하면서 가온한 후 잔류활성을 측정하여 온도에 대한 안정성을 측정하였다.

#### 효소 활성에 미치는 첨가물의 영향

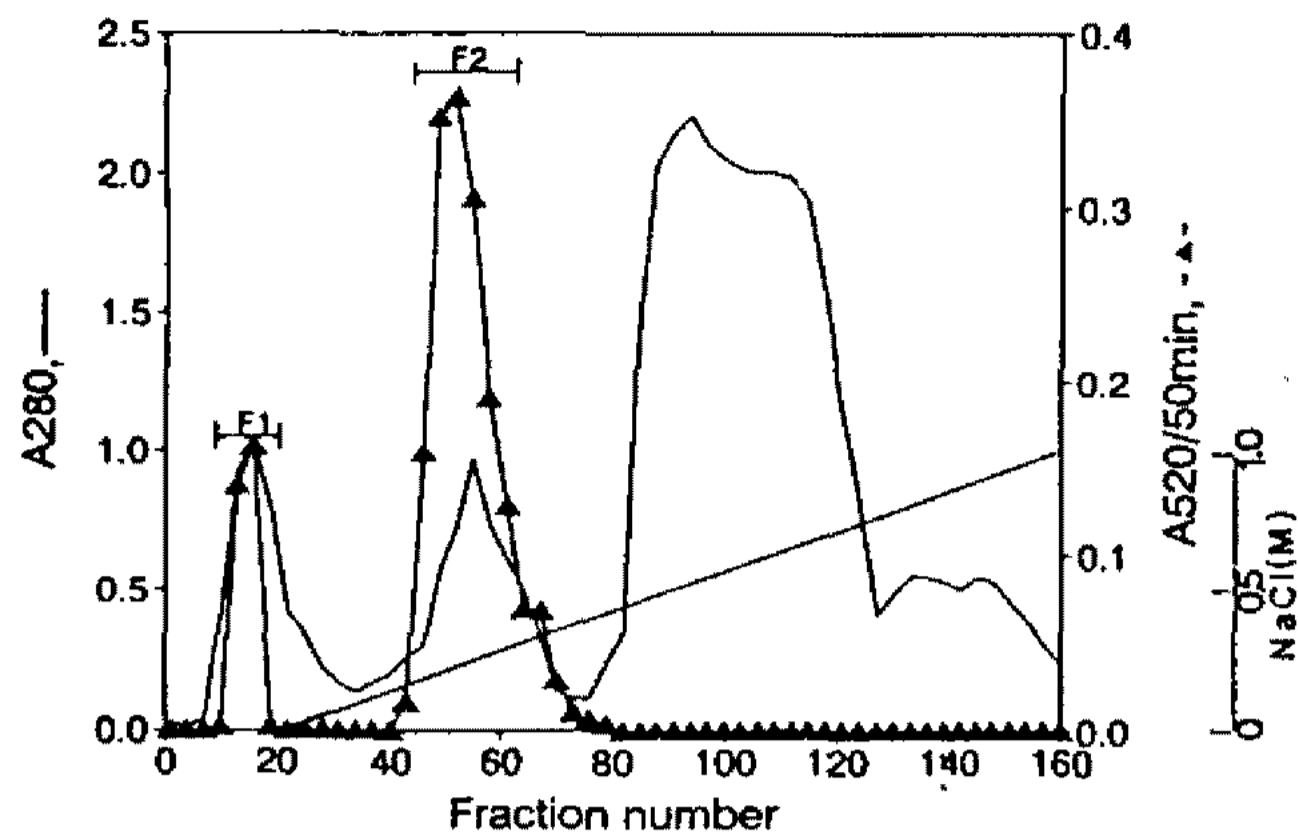
NaCl 농도 0.4% 기질용액에 NaCl 농도를 0~3.0 M로 하여, 효소활성에 미치는 NaCl의 영향을 측정하였다.

금속이온 및 화학약제 염화물(Cl) 형의 1, 2가 이온과 0.3 M NaCl을 기질과 혼합하여 효소와 반응시켰을 때 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 즉, 정제 효소 0.1 ml, 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 0.99 ml와 0.2 M 금속용액 0.01 ml를 혼합하여 37°C에서 예비 반응을 시킨 후 이 혼합액에 0.8% 기질 용액 1.0 ml를 가하여 37°C에서 50분간 반응시켜 환원당을 측정하여 금속이온의 영향을 조사하였다. 화학약제에 대한 영향은 각 약제의 농도별 용액과 효소액을 혼합하여 예비반응을 시킨 후 기질을 첨가하여 활성을 측정하였다.

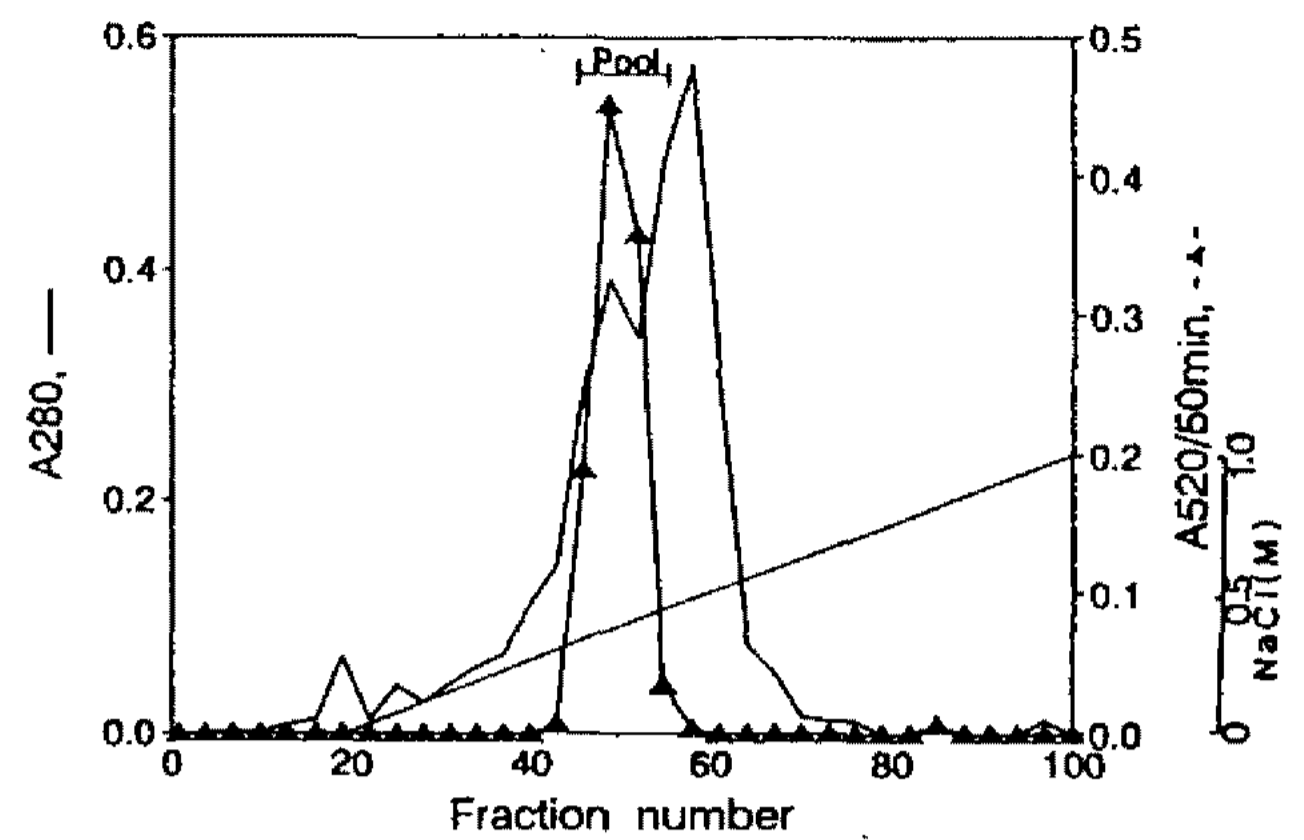
#### 결과 및 고찰

##### 효소의 정제

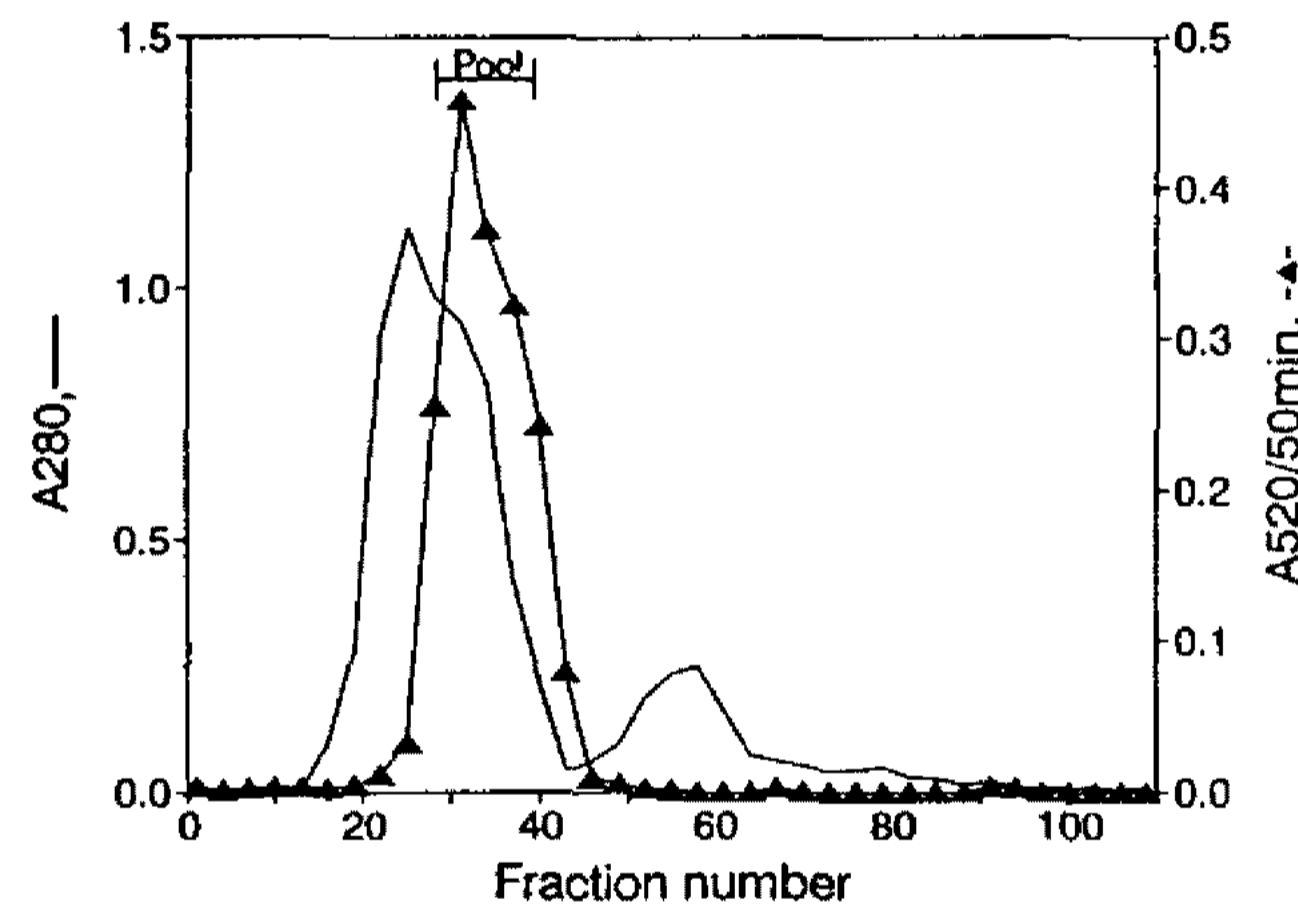
얻어진 조효소액을 투석, 농축한 후 DEAE-Cellulose 크로마토그래피를 행하여 Fig. 1과 같은 크로마



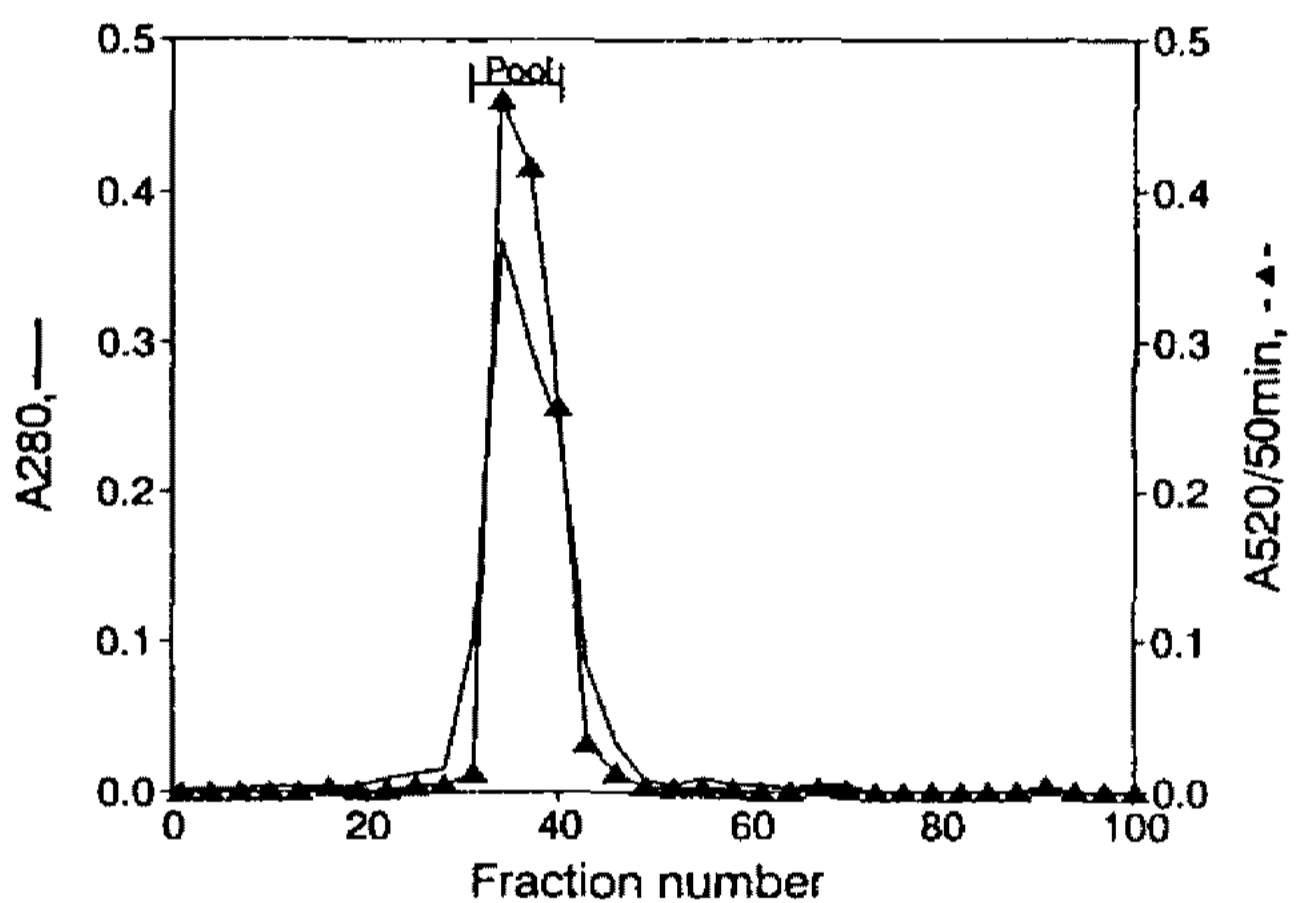
**Fig. 1. DEAE-Cellulose chromatogram ( $\Phi$  3.0 $\times$ 30 cm) of the crude enzyme obtained from cell extraction for purifying the intracellular alginase.**  
The enzymes were eluted with a gradient of 0~1.0 M NaCl in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The flow rate and fraction volume were 30 ml/hr and 4 ml, respectively.



**Fig. 3. Q-Sepharose chromatogram ( $\Phi$  1.5 $\times$ 25 cm) of the Na-alginate positive fraction obtained by the Sephadex G-100 chromatography for purifying the intracellular alginase.**  
The enzymes were eluted with a gradient of 0~1.0 M NaCl in 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The flow rate and fraction volume were 30 ml/hr and 4 ml, respectively.



**Fig. 2. Sephadex G-100 chromatogram ( $\Phi$  2.6 $\times$ 100 cm) of the Na-alginate positive fraction (B) obtained by the DEAE-Cellulose chromatography for purifying the intracellular alginase.**  
The enzymes were eluted with 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The flow rate and fraction volume were 40 ml/hr and 5 ml, respectively.



**Fig. 4. Sephadex G-100 rechromatogram ( $\Phi$  2.6 $\times$ 100 cm) of the Na-alginate positive fraction (B) obtained by the Q-Sepharose chromatography for purifying the intracellular alginase.**  
The enzymes were eluted with 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The flow rate and fraction volume were 40 ml/hr and 5 ml, respectively.

토그램을 얻었다. 기질에 대해 활성 획분이 2개 검출되었고, 우선 F2 획분을 정제하였다. 활성 획분을 투석, 농축하고 Sephadex G-100 크로마토그래피를 행하였고(Fig. 2), 기질에 대해 활성을 보이는 획분을 모아 투석, 농축 후 순도 검정을 행한 결과 6~7개의 미확인 band가 검출되었다. 이 농축액을 다시 음이온 교환 수지인 Q-Sepharose로 크로마토그래피를 행하고(Fig. 3), 이것을 다시 Sephadex G-100으로 다시 크로마토그래피를 행하였다(Fig. 4). 활성 획분은 모아 농축하여 순도 검정을 한 결과, 균일 상태의 효소 단백질이었음이 확인되었고, 이것을 효소 특성 실험에

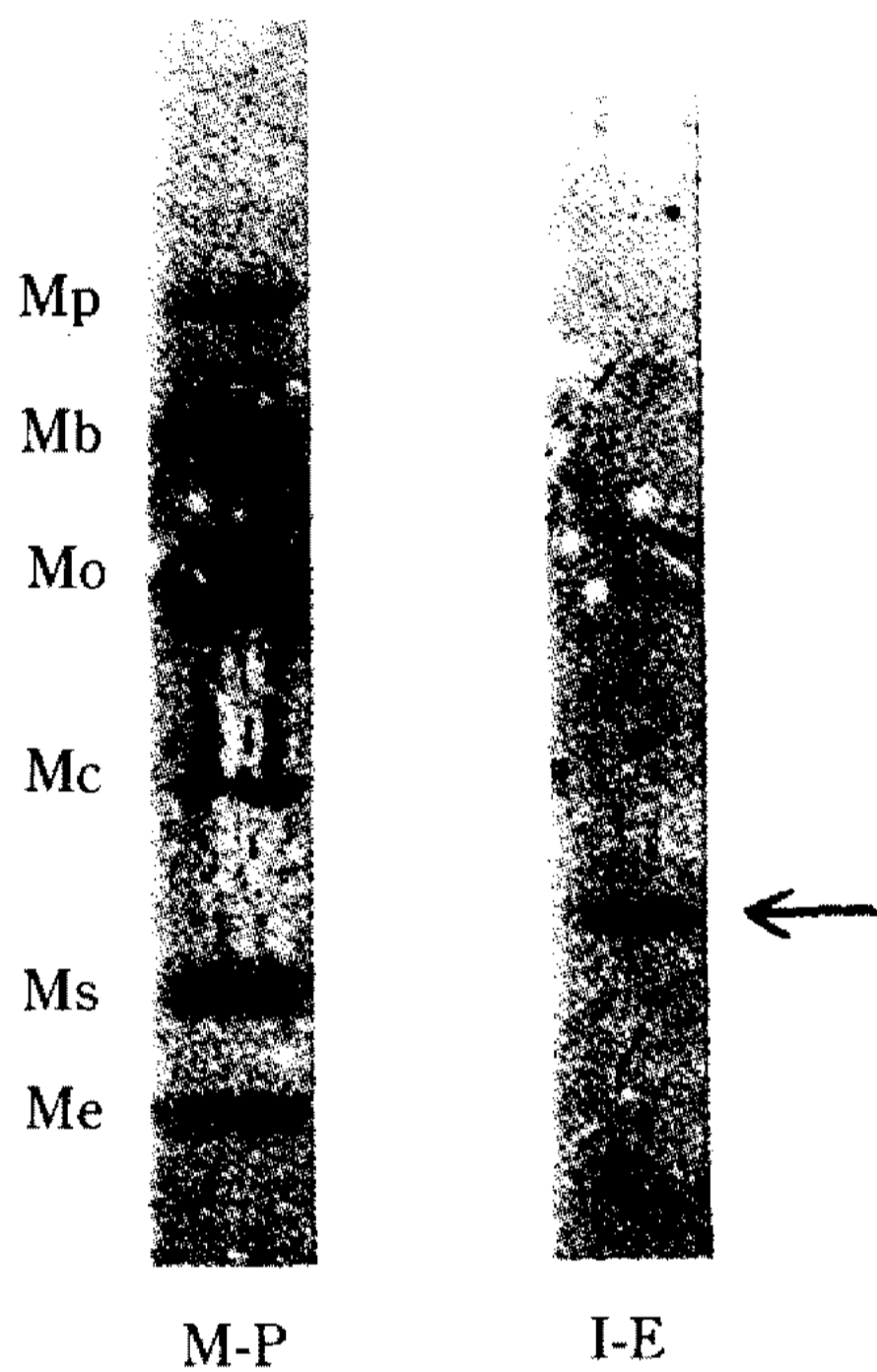
사용하였다.

각 정제 단계별 정제도와 수율은 Table 1에 나타내었다. 균체내 추출 조효소액의 고유활성은 0.84 U/mg이었는데, DEAE-Cellulose 크로마토그래피한 결과, 고유활성은 2.83 U/mg, 정제도는 3.3배였다. Sephadex G-100과 Q-Sepharose 크로마토그래피를 행한 효소의 고유활성 및 정제도는 각각 5.31, 6.67 U/mg 및 6.3배, 7.9배였으며, 최종적으로 정제된 효소의 고유활성은 10.14 U/mg, 정제도는 12.1배였다.

**Table 1. Purification of the intracellular alginase from *Vibrio* sp. AL-145**

Fraction	Protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme (Cell ext.)	75.8	63.4	0.84	100	1.0
DEAE-Cellulose chromatography	9.5	26.9	2.83	42.0	3.3
Sephadex G-100 chromatography	4.1	21.8	5.31	34.4	6.3
Q-Sepharose chromatography	1.5	10.1	6.67	15.9	7.9
Sephadex G-100 rechromatography	0.8	7.1	10.14	11.2	12.1

\*Total unit/mg-protein



**Fig. 5. SDS-Polyacrylamide gel electrophoretogram of the purified intracellular alginase.**

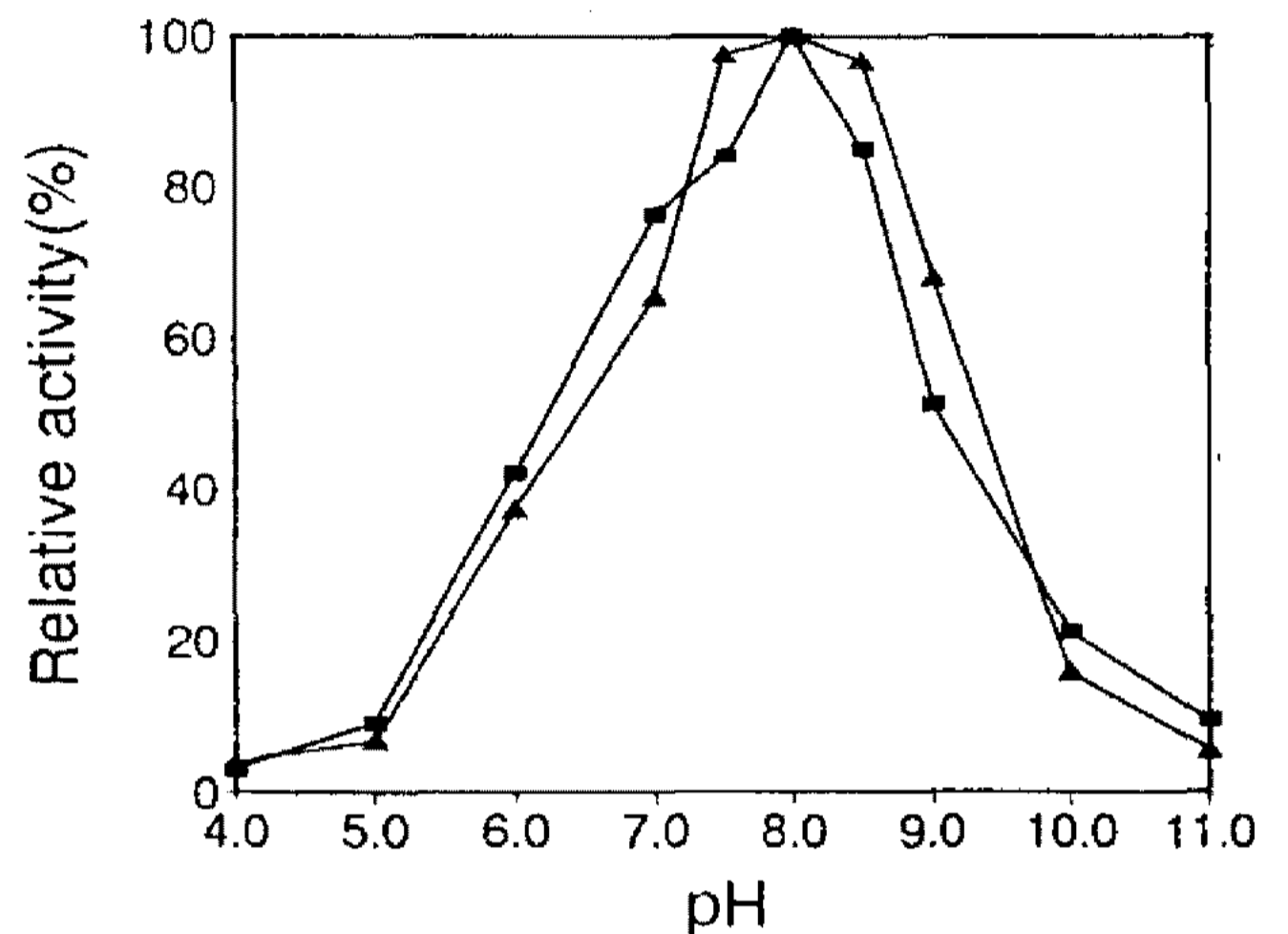
M-P; molecular weight marker proteins, I-E; intracellular enzyme, Mp; rabbit muscle phosphorylase 97,400 Da, Mb; bovine serum albumin 66,200 Da, Mo; ovalbumin 45,000 Da, Mc; bovine carbonic anhydrase 32,000 Da, Ms; soybean trypsin inhibitor 21,500 Da, Me; lysozyme 14,400 Da

**효소의 분자량**

정제 과정을 거쳐 얻어진 균체내 효소의 SDS-전기영동 결과, 단일 band로 나타나 subunit를 갖지 않는 것으로 생각되며, 표준단백질과 대조하여 분자량을 측정된 결과(Fig. 5), 약 23,000 정도의 분자량을 갖는 효소인 것으로 판단되었다. 본 균주의 균체외 효소(19)와도 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

**활성 최적 조건 및 안정성**

균체내 효소의 최적 pH 및 안정성을 시험한 결과는 Fig. 6과 같다. pH 8.0에서 최대 활성을 보였으며, pH



**Fig. 6. Effect of pH on the activity and stability of intracellular alginase.**

The used buffers in the mixture were 0.1 M sodium acetate-acetate (pH 4.0~6.0), 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0~9.0) and 0.1 M sodium carbonate-sodium hydroxide carbonate (pH 10.0~11.0). For stability, the enzymes were preincubated for 60 min by dialysing in the various buffer solutions of the different pH.

■: activity, ▲: stability

7.0 이하와 pH 9.0 이상의 반응 조건에서는 활성이 크게 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 안정성의 경우도 pH 8.0에서 가장 안정한 것으로 나타났고, pH 8.5 이상의 알칼리 영역과 pH 6.5 이하의 산성 영역에서 불안정함을 알 수 있었다. 지금까지 분리된 몇몇 알긴산 분해 균주의 경우 대개 미알칼리성 영역에서 최적활성을 나타내는 것으로 보고되었고, 근육 조직에서 분리된 효소의 경우 pH 9.0 부근에서 최적 활성을 나타내는 것도 보고된 바 있다(24-26). 이는 균이 어떤 환경에서 성장하였는가를 나타내는 것으로 특히 염이나 금속이온의 존재여부가 pH 조건에 영향을 주는 것으로 판단된다(27).

한편, Fig. 7에서는 본 효소의 활성 최적온도 및 열안정성을 나타내었다. 온도의 경우 35~37°C 부근에서 최대 활성을 나타내었고, 40°C 이상에서는 활성이 급격히 떨어졌다. 열안정성의 경우에도 30°C에서

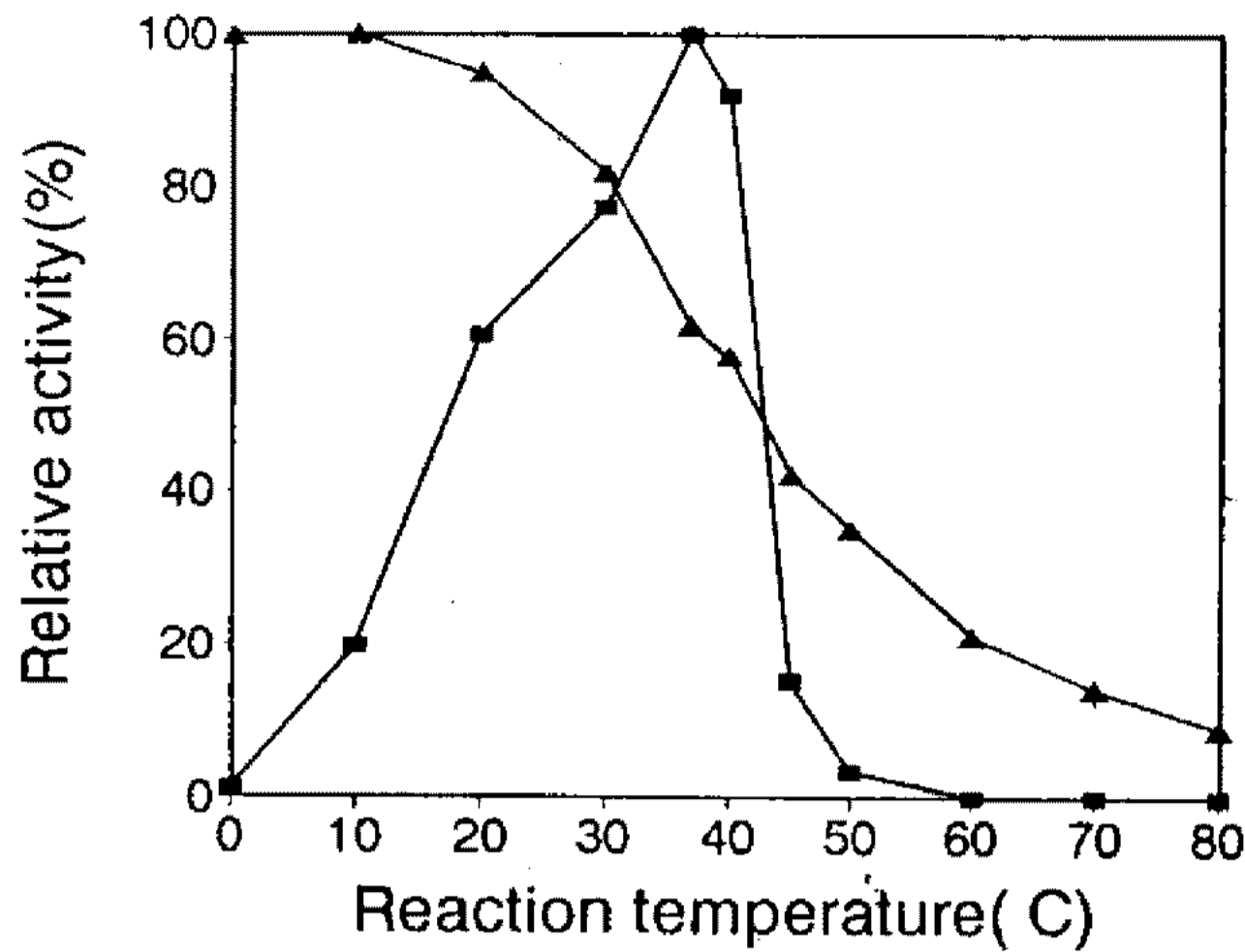


Fig. 7. Effect of temperature on the activity and stability of intracellular alginase.

The reaction was carried out under standard condition except that reaction temperature was varied. For stability, the enzymes were preincubated for 30 min at different temperature.

■: activity, ▲: stability

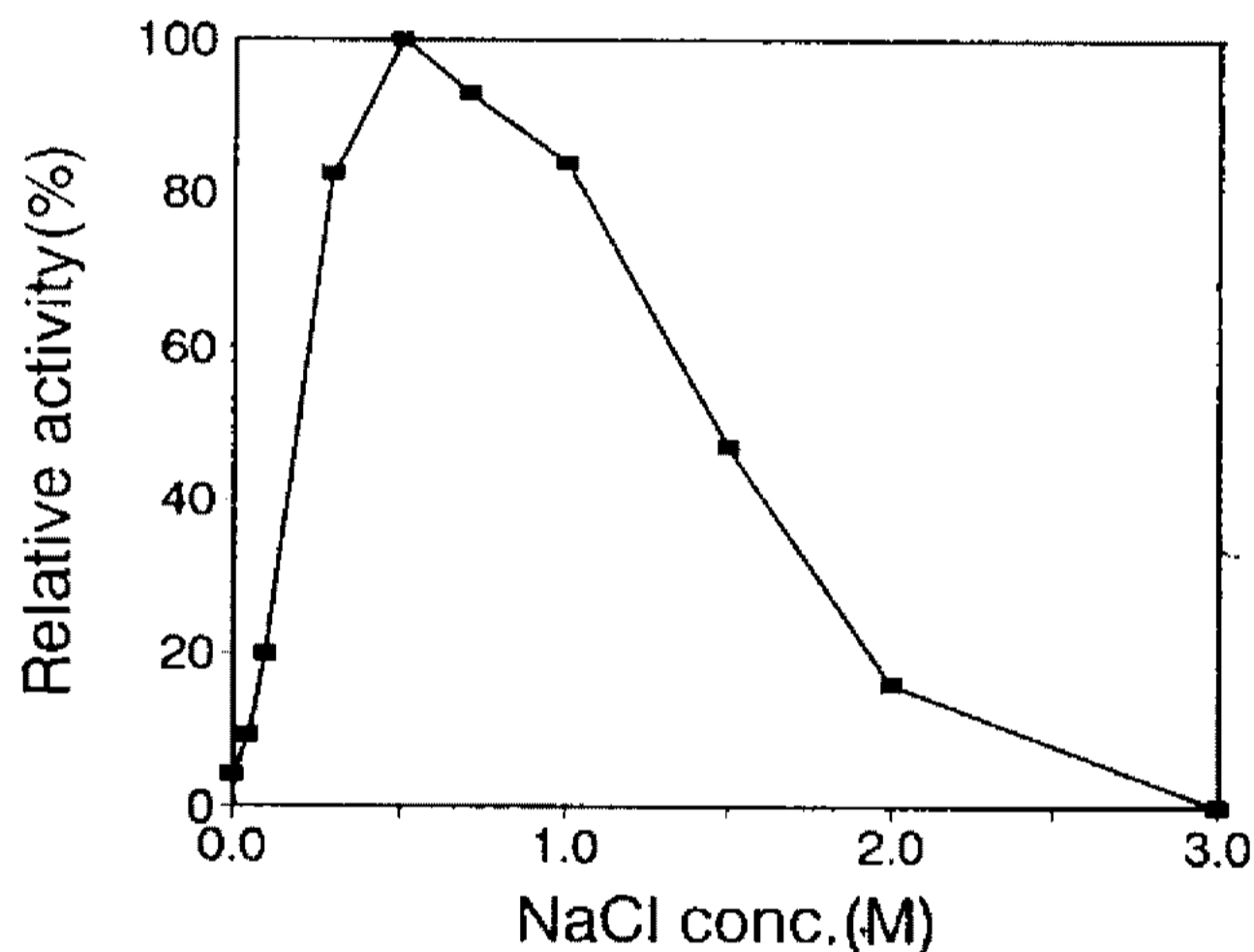


Fig. 8. Effect of NaCl concentration on the intracellular alginase activity.

The reaction was carried out under standard condition except that NaCl concentration was varied.

20%, 40°C에서는 50% 정도의 활성이 소실되었고, 최적온도와 열안정성 온도는 차이를 보이고 있는데 이는 기질의 유무에 의한 영향인 것으로 생각된다. 대개 알긴산 분해 효소가 열에 불안정한 것으로 보고되고 있으며, NaCl의 첨가로 열에 대한 안정성이 증가되는 것으로 알려져 있다(28).

#### 활성에 미치는 첨가물의 영향

Fig. 8에서는 효소 활성에 미치는 NaCl의 영향을 나타내고 있는데, 본 효소는 NaCl이 첨가되지 않는 경우 전혀 활성이 나타나지 않았고, NaCl 농도 0.5

Table 2. Effect of metal ions on the intracellular alginase activity

Metal ion	Relative activity (%)
None	100.0
K <sup>+</sup>	70.1
Li <sup>+</sup>	32.5
Ba <sup>2+</sup>	65.7
Ca <sup>2+</sup>	110.1
Co <sup>2+</sup>	5.5
Cu <sup>2+</sup>	81.0
Hg <sup>2+</sup>	10.6
Mg <sup>2+</sup>	100.7
Mn <sup>2+</sup>	64.6
Zn <sup>2+</sup>	27.4
NH <sup>4+</sup>	96.0

\*Chloride form

M까지 활성이 점차 상승하였고, 0.5 M 농도에서 최대 활성을 나타내고 그 이상의 농도에서는 활성이 점차 감소함을 알 수 있었다. 본 균주는 해양 환경에서 분리한 균으로 이러한 균주가 생산하는 효소의 경우 대개 1가의 양이온이 요구된다고 Baxter가 보고한 바 있다(29). 본 균체내 효소의 경우 균체의 효소와 상대 활성의 차이는 다소 있으나 거의 동일한 경향을 보이는 것으로 나타났다. 한편, 1, 2가 금속이온의 영향을 조사한 결과(Table 2), 0.05% 농도의 Co<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 이온에 의해서는 80~90%의 활성이 저해되었고, 1가 이온인 Li<sup>+</sup>에 의해서도 70% 정도의 활성이 저해되는 것으로 판명되었다. 한편, Ca<sup>2+</sup> 이온에 의해서는 약간의 활성 증대되는 것으로 나타났으며, Min 등(30)도 Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>에 의해 활성 저해를 저 농도의 Ca<sup>2+</sup>에 의해 활성 증대를 가져왔다고 보고한 바 있다. 한편, 화학약제의 경우 SH 화합물과 S-S 절단제에 의해서는 활성이 현저히 증가되는 것으로 나타났으며, SH기 차단제와 금속 킬레이트제에 의해서는 활성이 억제되는 것으로 보아(Table 3), 활성부위에 SH 기를 갖는 SH-enzyme 인 것으로 생각된다. 아울러 전분, 셀룰로오스, 펙틴 등과 같은 여러 다당류에 대해서도 분해 활성을 측정하여 본 결과(자료 제시는 하지 않았음) 본 효소는 알긴산에만 특이적으로 작용하는 alginase 또는 alginate lyase 인 것으로 판단되었다.

#### 요 약

알긴산을 선택적으로 분해하는 미역 조체에서 분리한 *Vibrio* sp. AL-145 균주가 생산하는 균체내 조

**Table 3. Effect of chemical reagents on the intracellular alginase activity**

Reagents	Conc. (mM)	Relative activity (%)
None		100.0
L-Cysteine	0.05	94.8
	0.5	140.4
	1.0	151.2
	5.0	345.4
EDTA	0.05	82.0
	0.5	15.0
	1.0	14.6
	5.0	9.0
Dithiothreitol	0.05	31.3
	0.5	57.2
	1.0	47.5
	5.0	94.9
Iodoacetate	0.05	94.7
	0.5	92.7
	1.0	33.9
	5.0	10.3
p-CMB	0.05	99.6
	0.5	44.2
	1.0	29.6
	5.0	22.7
o-Phenanthroline	0.05	104.3
	0.5	94.2
	1.0	90.2
	5.0	64.1
2-Mercaptoethanol	0.05	88.8
	0.5	96.4
	1.0	97.1
	5.0	140.4

효소를 정제하고 특성을 밝혔다. 몇가지 겔 여과 및 이온크로마토그래피로 정제하여 정제도가 12.1배, 비활성이 10.14 U/mg 정제효소를 얻었다. 얻어진 효소를 SDS-전기영동하여 분자량을 측정된 결과 23,000 정도인 것으로 추정되었다. 정제효소의 활성 최적 pH 및 온도는 각각 8.0 및 37°C였고, pH 6.5 이하, pH 9.0 이상의 조건에서는 상당히 불안정하였고, 30°C 이상의 온도에서 민감한 효소였다. NaCl 0.5 M 농도에서 최대 활성을 나타내었고, 무첨가시 분해 활성이 전혀 나타나지 않았다. Co<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 등과 같은 2가 금속이온에 의해서는 활성이 현저히 억제되었고, 특이

하게 1가 이온인 Li<sup>+</sup>에 의해서도 70% 정도의 활성이 억제되었다. 아울러 본 효소는 활성부위에 SH기를 가지는 것으로 생각되고, 알긴산에만 특이적으로 작용하는 alginase 또는 alginate lyase인 것으로 판단되었다.

### 감사의 말

본 연구는 1991년 한국과학재단 연구비 지원(과제 번호 ; 91-07-00-14)으로 수행된 연구 결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 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. Soc.* 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. Soc.* 7: 1182-1187.
- Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsröd. 1966. A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chemica Scand.* 20: 183-190.
- Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsröd. 1967. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scand.* 21: 691-704.
- Haug, A., B. Larsen, and O. Smidsröd. 1974. Uronic acid sequence in alginate from different sources. *Carbohydrate Research* 32: 217-225.
- Penman, A. and G.R. Sanderson. 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Research* 25: 273-282.
- 太田静行. 1987. ワカメ. *New Food Industry* 29: 33-45.
- 田中治夫. 1972. アルギン酸の金屬公害への藥理的効果について. *New Food Industry* 14: 30-32.
- Kaneko, Y., Y. Yonemoto, K. Okayama, A. Kimura, and K. Murata. 1990. Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. *J. Ferment. Bioeng.* 69: 192-194.
- Sawabe, T., Y. Ezura, and T. Kimura. 1992. Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying Rishiri-kombu *Laminaria japonica* var *ochotensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 141-145.
- Kashiwabara, Y., S. Hiroshi, and K. Nisizawa. 1969. Alginate lyases of *Pseudomonas* sp. *J. Biochem.* 66: 503-512.
- Alonso, S. and C. Setser. 1994. Functional replacements for sugars in foods. *Trends Food Sci. Te-*

- chnol.* **5**: 139.
13. Hidaka, H., T. Hara, T. Eida, A. Okada, K. Shimada, and T. Mitsuoka. 1984. Effect of fructooligosaccharides on human intestinal flora. *In Intestinal Microflora and Dietary Factors*, Pp. 39-64. Center for Academic Publications, Tokyo.
  14. 北畑壽美雄. 1993. オリゴ糖の機能. *Daiichi Fine News* **11**: 7-10.
  15. 齊藤 忠夫, 中澤 勇二. 1988. 含ビィズス活性オリゴ糖の研究結果とその利用性. *New Food Industry* **30**: 73-79.
  16. 日高秀昌, 榮田利章, 足立 暁, 齊藤安弘. 1987. フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用 開発. *日本農藝學會誌* **61**: 915-923.
  17. 正井 輝久. 1990. 大豆オリゴ糖の開発と今後の展望. *New Food Industry* **32**: 5-11.
  18. 주동식, 조순영, 이응호. 1993. 알긴산 분해 세균의 분리 및 생육 특성. *한국산업미생물학회지* **21**: 207-213.
  19. 주동식, 조순영, 이응호. 1993. *Vibrio* sp. AL-145가 생산하는 균체외 효소의 특성. *한국영양식량학회* **22**: 240-245.
  20. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
  21. 日本食品工業學會. 1984. 食品分析法. Pp. 170-172. 光琳.
  22. Davis, B.J. 1964. Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404-427.
  23. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the Bacteriophage T. *Nature* **227**: 680-686.
  24. Muramatsu, T., S. Hirose, and M. Katayose. 1977. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1939-1946.
  25. 安藤芳明, 井上勝弘. 1961. 微生物によるアルギン酸の分解-V. *Vibrio* sp. SO-20 のアルギナーゼについて. *日本水産學會誌* **27**: 342-347.
  26. Tseng, C.H., K. Yamaguchi, and M. Kitamikado. 1992. Two types of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-9. *Nippon Suisan Gakkaishi* **58**: 743-749.
  27. Tseng, C.H., K. Yamaguchi, and M. Kitamikado. 1992. Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **58**: 533-538.
  28. Yonemoto, Y., K. Murata, A. Kimura, H. Yamaguchi, and K. Okayama. 1991. Bacterial alginate lyase; characterization of alginate lyase producing bacteria and purification of enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 152-157.
  29. Baxter, R.M. 1959. An interpretation of the effects of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can. J. Microbiol.* **5**: 47-57.
  30. 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.

(Received 23 March 1995)