

알긴산 분해균 *Bacillus licheniformis* AL-577가 생산하는 균체외 효소의 정제 및 특성

어명희¹ · 주동식² · 조순영^{3*} · 민태선⁴

¹강릉대학교 해양생물산업협동과정, ²한중대학교 오리엔탈웰빙학부
³강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터, ⁴한국과학재단

Purification and Characterization of the Extracellular Alginase Produced by *Bacillus licheniformis* AL-577

Meung-Hee Uo¹, Dong-Sik Joo², Soon-Yeong Cho^{3*} and Tae-Sun Min⁴

¹Marine Bioindustry Course, Graduate School, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

²Division of Oriental Well-being, Hanzhong University, Donghae 240-713, Korea

³East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University,
Kangnung 210-702, Korea

⁴Korea Science and Engineering Foundation, Daejeon 305-350, Korea

Abstract

The extracellular enzyme alginase produced by *Bacillus licheniformis* AL-577 was purified by ion chromatography on CM-Cellulose column, DEAE-Sephrose column, and followed by gel filtration on Sephadex G-100 column. The optimum pH and temperature for the activity of the purified enzyme were 6.0 and 35°C, respectively. The enzyme was stable at the pH range of 6.0~9.0 and at 20°C. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 25,500 daltons by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. NaCl was required for high activity of the enzyme. The enzyme was inhibited by Ba²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, NH₄⁺, EDTA, L-cysteine, and 2-mercaptoethanol, while stimulated by DTT, O-phenanthroline, K⁺ and Li⁺. This enzyme was proposed to be an alginase specifically degrading alginic acid.

Key words: alginase, extracellular enzyme, alginic acid, *Bacillus licheniformis*

서 론

D-Mannuronic acid와 L-guluronic acid가 결합된 hetero형 해조 다당인 알긴산(alginic acid)은 다양한 기능과 물성으로 인해 식품 및 공업용으로 널리 이용되고 있다(1-7). 알긴산이 다량 함유된 해조류의 성분을 효과적으로 추출하기 위해서는 조체를 고온 고압처리하거나, 초고압이나 방사선으로 조체를 연화시킨 뒤 추출하는 방법(8,9) 그리고 산과 알칼리 처리에 의하여 수율을 높이려는 시도가 있다(10). 또한 알긴산의 이용도를 높이기 위해 다양한 연구가 행해지고 있으며, 알긴산의 분해에 의한 저분자화도 그 중 하나이다(11-15). 한편, 각종 올리고당이 갖는 여러 가지 기능이 밝혀지면서 올리고당의 제조나 이용(16-18), 연구와 함께 미생물 유래의 알긴산 분해효소(alginase)에 대한 생화학 및 분자생물학적 연구(19)도 활발히 진행되고 있다. 특히, 해조류 탄수화물의 대부분이 비소화성 복합다당류로서 산이나 알

칼리에 비교적 안정하고 특수한 세균효소에 의하지 않고서는 분해가 어렵다는 특성을 지니고 있기 때문에 최근에는 해조 다당을 화학적으로 분해하여 해조 올리고당을 제조하는 것보다는 효소적으로 올리고당을 제조하는데 대한 관심이 높아지고 있다(20-22).

국외에서는 이미 미생물을 이용한 알긴산 분해균으로서 *Alginomonas alginica*, *Vibrio* sp., *Pseudomonas* sp., *Klebsiella aerogenes*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* 및 *Bacillus* sp. 등을 분리 동정해내었으며, 이외에도 해수와 해양 토양, 분변 및 토양 등으로부터 알긴산 분해능이 우수한 균주들을 찾아내고 있다. 또한 미생물뿐만 아니라 해조를 섭식하는 성게, 전복, 불가사리 및 소라로부터 알긴산 분해 효소를 분리하고 특성을 밝힌 보고도 있다(23-26). 국내에서는 미생물을 이용한 해조의 가수 분해능을 연구·보고하였으며(27,28) 해조에서 알긴산을 강하게 분해하는 균주를 분리하여 생육특성을 연구한 바도 있다(29). 또한 미생물에서

*Corresponding author. E-mail: csykang@kangnung.ac.kr
Phone: 82-33-640-2335. Fax: 82-33-643-3832

분리된 균주가 생산하는 균체 외 효소에 대한 정제 및 특성을 보고한 바 있다(30).

본 연구에서는 알긴산을 분해하는 효소를 생산하는 여러 균주를 탐색 후 알긴산 분해에 가장 효율적이고 적합하다고 판단한 균주를 결정하여 그 균주가 생산하는 효소특성을 밝혔다. 즉, 이미 탐색 분리해낸 알긴산 분해효소 생산균주를 배양하여 그 효소를 정제해내고 그 효소의 특이한 특성 및 성질을 밝혀내고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

환원당 생성능으로부터 저자 등(in press)이 동정해 낸 알긴산 분해능이 우수하였던 *Bacillus licheniformis* AL-577 균주를 실험에 사용하였다.

균체 회수 및 조효소의 제조

적정 배지의 조성은 즉, 2.0% sodium alginate, 0.1% nutrient broth, 2% NaCl로 하였고, pH는 7.5였다. 이 배지에 균을 접종하고 30±2°C에서 150시간정도 정치배양으로 얻어진 배양액을 원심분리(10,000×g, 20 min, 4°C)하여 균체를 분리하였다. 원심분리한 후 얻어진 상등 효소액에 -20°C로 조절된 아세톤을 70% 농도가 되게 첨가하면서 교반하여 효소를 침전시켰다. 침전된 조효소를 원심분리(10,000×g, 20 min, 4°C)하여 모으고 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 용해시켰다. 또한 동일 완충액으로 저온에서 하룻밤 투석막(Sigma Co., USA, M.W. cut off 100,000)으로 투석을 행하였고, 이 조효소액을 원심분리(10,000×g, 20 min, 4°C)하여 얻어진 상등액을 본 실험의 효소로 사용하였다.

단백질의 농도, 효소활성 측정 및 분자량 측정

효소정제 과정중의 단백질 회분의 검색은 분광광도계(UV/VIS spectrophotometer, Shimadzu UV-1601)로써 280 nm에서 흡광도를 측정하였고, 단백질 농도는 Lowry 등(31)의 비색법에 의해 bovine serum albumin(Sigma Co., USA)을 표준단백질로 하여 구한 검량곡선으로부터 구하였다. 효소활성의 기질로는 0.4% 또는 0.8% Na-alginate(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.3 M NaCl)을 사용하였고, 효소액을 37°C에서 60분간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson법(32)에 의해 흡광도를 측정하여 표준당(mannuronic acid)으로 작성된 표준 검량선으로 환원당을 측정하였다. 효소 1 unit(단위)는 1분간에 1 μmole의 환원당(mannuronic acid로 환산)을 생산하는 효소량으로 정의하였다.

순도검정을 위한 분석은 Davis의 방법(33)에 따라 Disc-PAGE(7.5% polyacrylamide gel electrophoresis)에 의했고, 효소의 분자량 측정은 Laemmli의 방법(34)에 따라 10% acrylamide gel을 사용하여 SDS-PAGE를 행한 후 SDS-분자량 표준단백질의 전기영동 이동도를 대조로 하여 효소의

구성subunit의 분자량을 측정하였다.

효소정제

상기 방법으로 제조한 조효소액을 한외여과기로 농축을 행하고, 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 평형화된 양이온 교환 수지인 CM-Cellulose(φ 2.5×25 cm)에 농축시료를 흡착시킨 다음 동일완충액으로 흡착되지 않은 단백질을 용출시키고, 동일완충액으로 만든 염용액을 써서 농도구배법(0~1.0 N NaCl)으로 용출시켰다. 기질에 대해 활성이 강한 회분을 모아 농축하고, 다시 동일완충액으로 평형화시킨 음이온 교환 수지인 DEAE-Sephrose(φ 2.5×25 cm)에 흡착시키고, 동일완충액으로 만든 염용액을 사용하여 농도구배법(0~1.0 N NaCl)으로 용출 및 분획하였다. 기질에 대해 활성이 강한 회분을 농축하여 전기영동으로 순도검정을 행한 후 Sephadex G-100으로 재분획을 행하고 활성 회분을 모아 순도 검정을 한 후 최종 효소를 제조하였으며 이 효소를 특성실험용 효소액으로 하였다.

효소활성 최적조건

정제효소 각 0.1 mL에 대해 0.8% Na-alginate 1.0 mL와 각 pH별 완충용액(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 60 min)시킨 후 환원당을 측정하여 활성 최적 pH 조건을 구하였다. 활성 최적 온도는 정제효소 0.1 mL와 0.4% Na-alginate 2.0 mL를 혼합하여 반응온도를 0°C에서 50°C까지 조절하면서 각각 60분간 반응시킨 후 환원당을 측정하여 최적 활성온도를 구하였다. 또한 정제효소 0.1 mL와 0.4% 기질용액(0.3 M NaCl 함유) 2 mL를 37°C에서 반응시간별 환원당을 측정하여 적정반응 시간조건을 실험하였다.

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 60분간 반응시킨 후 잔류활성으로부터 측정하였다. 정제효소의 온도에 대한 안정성은 0~80°C의 각 온도대에서 30분간 교반하면서 가온한 후 효소액 0.1 mL와 0.4% 기질용액 2.0 mL를 혼합하여 37°C에서 60분간 반응시킨 후 잔류활성을 측정하였다.

효소활성에 미치는 첨가물의 영향

0.4% 기질용액에 NaCl 농도를 0~3.0 M로 달리하여 첨가하여 효소활성에 미치는 NaCl 농도의 영향을 측정하였다. 또한 금속이온의 영향은 염화물(-Cl)형의 1, 2가 이온을 기질과 혼합하여 효소 반응시켰을 때 활성에 미치는 영향을 측정하였다. 즉 정제효소 0.1 mL, 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 0.99 mL와 2 mM 금속 용액 0.01 mL를 혼합하여

37°C에서 30분간 전(前) 반응시킨 후 이 혼합액에 0.8% 기질 용액(0.3 M NaCl 함유) 1 mL를 가하여 37°C에서 60분간 반응시켜 환원당으로 활성 측정하였으며, 0.3 M NaCl만 첨가된 것을 대조실험으로 하여 금속이온의 영향을 조사하였다.

다른 다당류에 대한 효소의 분해활성

Na-alginate와 동일하게 soluble starch, dextrin, carra-geenan, carboxymethyl cellulose, pectic acid 및 agar를 각각 0.4%되게 제조하고, 동일조건에서 정제효소 0.1 mL와 각 기질 2.0 mL를 반응시켜 생성되는 환원당을 측정하여 반응성을 Na-alginate를 기질로 했을 때와 비교하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

동일완충액으로 평형화시킨 CM-Cellulose(φ 2.5 cm×25 cm)에 시료를 흡착시킨 다음 동일 완충액으로 만든 염용액을 사용하여 농도구배법(0~1.0 M NaCl gradient)으로 전개하여(Fig. 1) 기질에 대해 활성획분 1개를 확인하였다. 활성획분을 투석·농축하고 DEAE-Sephrose 크로마토그래피를 행하였고(Fig. 2), 기질에 대해 활성을 보이는 획분을 모아 투석, 농축 후 순도 검정을 행한 결과 2~3개의 미확인 band가 검출되었다. 이 농축액을 다시 Sephadex G-100으로 겔크로마토그래피를 행하였다(Fig. 3). 활성획분을 모아 농축하여 순도 검정을 한 결과 균일상태의 효소임을 확인하였고,

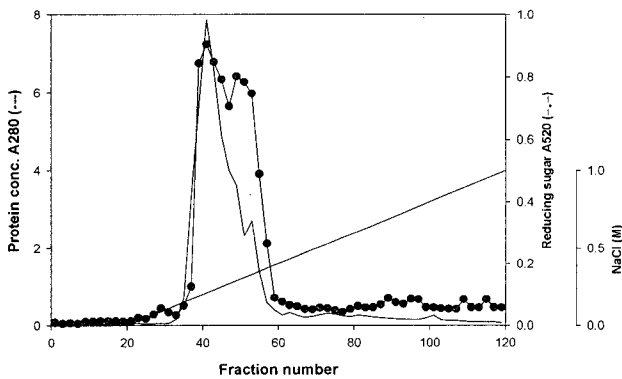


Fig. 1. CM-Cellulose chromatogram (φ 2.5 cm×25 cm) of the crude alginase from acetone precipitation. The enzyme was eluted with a gradient of 0~1.0 M NaCl in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The flow rate and fraction volume were 30 mL/hr and 6 mL/tube, respectively.

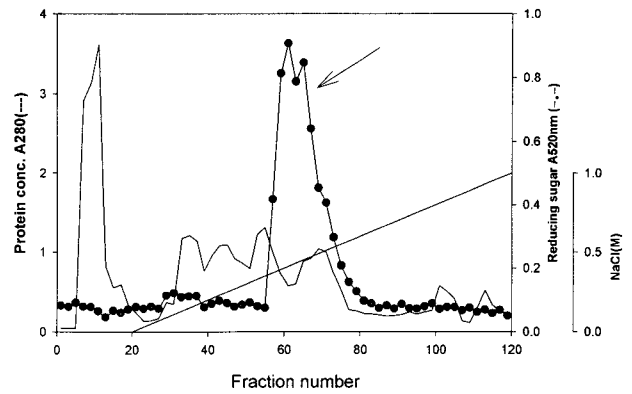


Fig. 2. DEAE-Sephrose chromatogram (φ 2.5 cm×25 cm) of alginase after CM-Cellulose chromatography. The enzyme was eluted with a gradient of 0~1.0 M NaCl in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The flow rate and fraction volume were 30 mL/hr and 6 mL/tube, respectively.

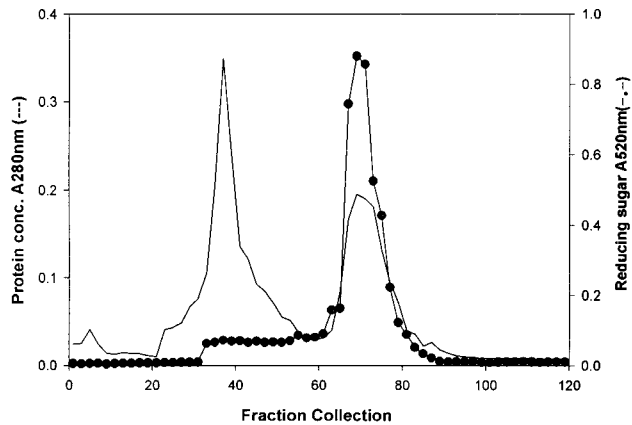


Fig. 3. Sephadex G-100 chromatogram (φ 2.4 cm×120 cm) of alginase from DEAE-Sephrose chromatography. The enzyme was eluted with 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5). The flow rate and fraction volume were 12 mL/hr and 4 mL/tube, respectively.

이것을 효소특성 실험에 사용하였다. 각 정제 단계별 정제도와 수율은 Table 1에 나타내었다. CM-Cellulose 크로마토그래피 수행 결과, 비활성은 7.85 U/mg, 정제도는 78배였다. DEAE-Sephrose 크로마토그래피를 행한 효소의 비활성 및 정제도는 각각 8.43 U/mg, 84.3배였으며, 최종적으로 정제된 효소의 비활성은 9.89 U/mg, 정제도는 약 98.8배였다.

효소의 분자량

정제 과정을 거쳐 얻어진 효소의 SDS-PAGE 분석에서

Table 1. Purification of the alginase produced by *Bacillus licheniformis* AL-577

Fraction	Vol (mL)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity ¹⁾	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	20,000	7,000	709	0.10	100	1.0
Acetone fraction	1,200	374.4	613	1.64	86.5	16.3
CM-Cellulose	150	39.5	309	7.85	43	78.4
DEAE-Sephrose	128	32	270	8.43	42	84.3
Sephadex G-100	57	13.9	137.5	9.89	19	98.8

¹⁾Total unit/mg-protein.

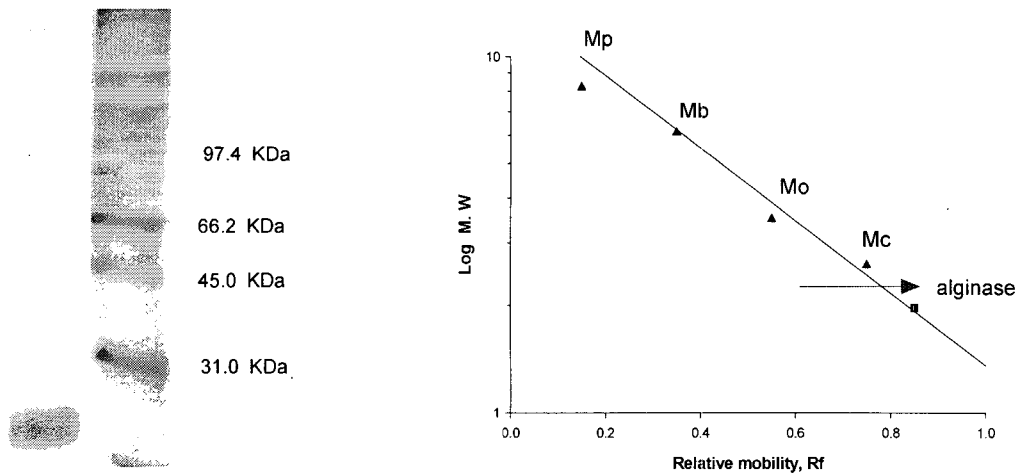


Fig. 4. Determination of molecular weight of alginase by SDS-PAGE.

Mc: bovine carbonic anhydrase, 31,000 Da, Mo: ovalbumin, 45,000 Da, Mb: bovine serum albumin, 66,200 Da, Mp: rabbit muscle phosphorylase b, 97,400 Da.

Regression equation: $MW = 8.96 - 1.18X$ ($r = -0.981$).

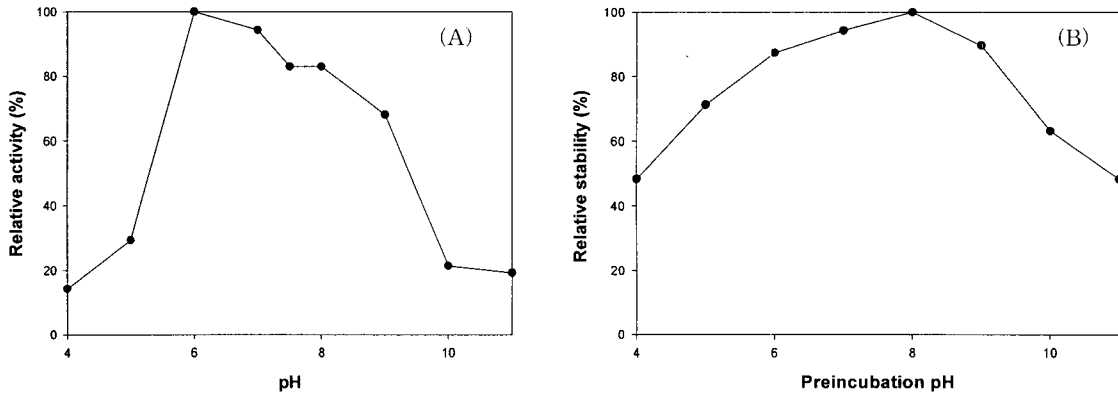


Fig. 5. Effects of pH on the activity (A) and stability (B) of alginase from *Bacillus licheniformis* AL-577.

표준 단백질과 대조하여 분자량을 측정한 결과(Fig. 4), 약 25,500 Da 정도의 분자량을 갖는 단량체 효소인 것으로 판단 되었으며, Tseng 등(35)이 분리한 *Vibrio* sp. AL-9가 생산 하는 alginate lyase와 분자량(약 25,000)이 유사한 것으로 나타났다.

활성 최적조건 및 안정성

균체 외 효소의 최적 pH 및 안정성을 시험한 결과는 Fig. 5와 같다. pH 6.0에서 최대 활성을 보였으며, pH 5.5이하와 pH 9.5이상의 반응조건에서는 활성이 크게 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 안정성의 경우는 pH 8에서 가장 안정한 것으로 나타났고, pH 9이상의 알칼리성과 pH 6이하의 산성 영역에서는 불안정함을 알 수 있었다. 지금까지의 분리된 몇몇 알긴산 분해균주의 경우 대개 미알칼리성 영역에서 최적 활성을 나타내는 것으로 보고되었고, 근육 조직에서 분리된 효소의 경우 pH 9.0 부근에서 최적 활성을 나타내는 것도 보고된 바 있다(36,37). 이는 균이 어떤 환경에서 성장하였는가를 나타내는 것으로 특히 염이나 금속이온의 존재여부가

pH 조건에 영향을 주는 것으로 판단된다(38).

한편 Fig. 6에서는 본 효소의 활성 최적온도 및 열 안정성을 나타내었다. 온도의 경우 37~40°C 부근에서 최대 활성을 나타내었고, 45°C부터는 활성이 급격히 떨어졌다. 열안정성의 경우에도 20°C에서 최고를 나타내었으며, 30°C부터는 급격히 저하됨을 보여주었다. 일반적으로 알긴산 분해효소가 열에 불안정한 것으로 보고되고 있으며, NaCl의 첨가로 열에 대한 안정성이 증가되는 것으로 알려져 있다(39). 또한 반응시간에 따른 변화(Fig. 7)도 80분에서 최고의 활성을 나타내었으나 그 이후 점차 감소하여 130분 이후는 급격히 떨어지는 것으로 나타내었다.

활성에 미치는 첨가물의 영향 및 다른 다당류에 대한 효소의 분해 활성

Fig. 8에서는 효소활성에 미치는 NaCl의 영향을 나타내고 있는데, 본 효소는 NaCl이 첨가되지 않는 경우에도 활성을 나타내었다. NaCl 농도는 0.2 M 농도에서 최대 활성을 나타내었고 그 이상의 농도에서는 활성이 점차 감소함을 알 수

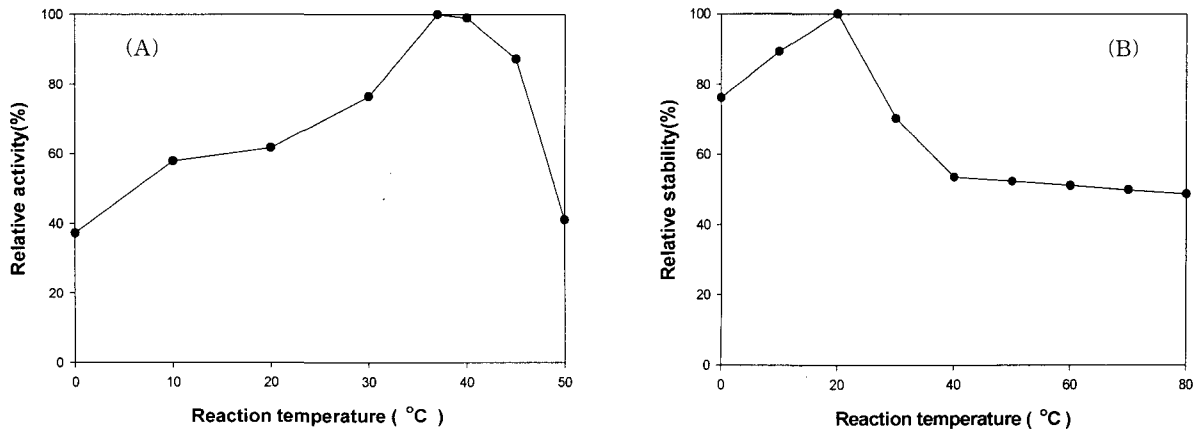


Fig. 6. Effects of temperature on the activity (A) and stability (B) of alginate from *Bacillus licheniformis* AL-577.

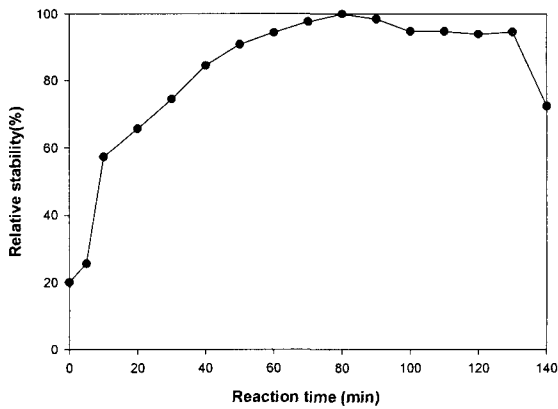


Fig. 7. Changes of stability on reaction time of alginate from *Bacillus licheniformis* AL-577.

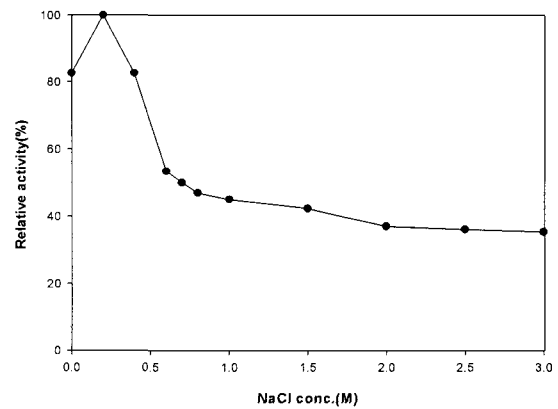


Fig. 8. Effect of NaCl concentration on the activity of alginate from *Bacillus licheniformis* AL-577.

있었다. 본 균주는 해양 환경에서 분리한 균으로 이러한 균주가 생산하는 효소의 경우 대개 1가의 양이온이 요구된다고 Baxter가 보고한 바 있다(40). 한편 1,2가 금속이온의 영향을 조사한 결과 Table 2와 같이 반응액 중에 2 mM 농도로 첨가된 Ba²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ 등의 이온에 의해서는 30~80%의 활성이 저해되었고, 1가 이온인 NH₄⁺에 의해서도 17% 정도의 활성이 저해되는 것으로 판명되었다. K⁺,

Li⁺, Ca²⁺ 등에 의해서는 10~30%정도 활성이 증가되는 것으로 나타났으며, Min 등(41)도 Ca²⁺이온에 의해 활성 증대를 가져왔다고 보고한 바 있다.

화약약제의 경우 SH화합물인 L-cysteine, TLCK, TPCK에 의해서는 현저하게 활성이 감소하였으며 SH기 차단제인 O-phenanthroline와 dithiothreitol에 의해서 가장 많이 활성

Table 2. Effect of metal ions on the activity of alginate from *Bacillus licheniformis* AL-577 (%)

Metal ion ¹⁾	Relative activity
Control	100
K ⁺	131.3
Li ⁺	124.5
Ba ²⁺	72.40
Ca ²⁺	114.11
Co ²⁺	52.15
Cu ²⁺	58.90
Fe ²⁺	31.29
Mg ²⁺	74.75
Zn ²⁺	20.86
NH ₄ ⁺	83.44

¹⁾Chloride form (2 mM).

Table 3. Effect of chemical reagents on on the activity of alginate from *Bacillus licheniformis* AL-577 (%)

Reagents ¹⁾	Relative activity
Control	100.0
EDTA	4.0
L-Cysteine	9.1
Dithiothreitol	111.4
TLCK	0.8
(N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)	
2-mercaptoethanol	97.1
TPCK	10.6
(Nα-p-Tosyl-L-Lysine chloromethyl ketone)	
O-Phenanthroline	113.1
N-Ethyl maleimide (NEM)	8.5

¹⁾Concentration: 1 mM.

Table 4. Substrate specificity of the alginase from *Bacillus licheniformis* AL-577

Substrate	Relative activity
Na-alginate	100.0
Soluble starch	5.8
Dextrin	6.3
Carrageenan	4.6
Carboxymethyl cellulose	5.5
Pectic acid	4.2
Agar	5.0

이 증가했고 S-S결합 절단제인 2-mercaptoethanol에 의해서는 활성이 약간 억제되었다. 또한 금속 chelate제인 EDTA에 의해서도 활성이 대부분 억제되었다(Table 3).

아울러 전분, 카라기난, 펙틴 등과 같은 여러 다당류에 대해서도 분해활성을 측정하여 본 결과(Table 4), 본 효소는 알긴산에만 특이적으로 작용함으로써 alginase 또는 alginase lyase인 것으로 추정 판단되었다.

요 약

알긴산을 선택적으로 분해하는 *Bacillus licheniformis* AL-577 균주가 생산하는 균체 외 효소를 정제하고 특성을 밝혔다. CM-Cellulose, DEAE-Sepharose 및 Gel 크로마토그래프 등의 순서대로 정제하여 정제도가 약 98배 정도인 효소를 얻었다. 정제효소의 활성 최적 pH 및 온도는 6.0 및 35°C이었고, pH 5.5이하와 pH 9.5이상의 반응조건에서는 불안정하였으며, 20°C이상의 온도에서는 불활성화가 쉽게 일어나는 효소였다. 얻어진 효소를 SDS-PAGE로 분자량을 측정된 결과 25,500 Da으로 추정되었다. NaCl 0.2 M 농도에서 최대의 활성을 나타내었고, 무첨가시에도 활성은 약간 나타내었다. Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} 등과 같은 2가 금속이온에 의해서는 활성이 현저히 억제되었고, K^+ , Li^+ 이온에 의해서 활성이 촉진됨을 알 수 있었다. 화학약품인 dithiothreitol과 *O*-phenanthroline의 첨가로 인하여 약간의 활성 증가를 가져 왔으며 반면 EDTA, L-cysteine는 현저하게 감소하였다. 이 효소는 알긴산에만 특이적으로 작용함으로써 본 효소는 alginase 또는 alginase lyase인 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지정 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터 및 산업자원부 지역산업기술개발 사업 중 중점기술 과제에 의한 것입니다. 이에 감사드립니다.

문 헌

- Hirst EL, Percival E, Wold JK. 1964. The structure of alginic acid. Part IV. Partial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J Chem Soc* 8: 1493-1499.
- Hirst EL, Ress DA. 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, Larsen B, Smidsrød O. 1966. A study of constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. *Acta Chemica Scand* 20: 183-190.
- Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1967. Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chemica Scand* 21: 691-704.
- Haug A, Larsen B, Smidsrød O. 1974. Uronic acid sequence on alginate from different sources. *Carbohydrate Res* 24: 273-282.
- Penman A, Sanderson GR. 1972. A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Res* 25: 273-282.
- Gacesa P. 1988. Alginates. *Carbohydr Polym* 8: 161-182.
- Yang JS, Lee SR. 1997. Effect of ionizing radiation on the extraction yield and viscosity of alginate. *Korean J Food Sci Technol* 9: 194-198.
- Cho HO, Lee SR. 1974. Effectiveness of gamma irradiation of the extraction of algal polysaccharides. *Korean J Food Sci Technol* 6: 36-41.
- Lee SR, Cho HO, Park SK. 1975. Extraction yield and quality attributes of agar from domestic seaweeds according to various pretreatment. *Korean J Food Sci Technol* 7: 109-114.
- Keneko Y, Yonemoto Y, Okayama K, Kimura A, Murata K. 1990. Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. *J Ferment Bioeng* 69: 192-194.
- Boyd J, Turvey JR. 1978. Structural studies of alginic acid, using a bacteria poly- α -L-gulonate lyase. *Carbohydrate Res* 66: 187-194.
- Sawabe T, Ezura Y, Kimura T. 1992. Characterization of an alginolytic marine bacterium from decaying Rishirikombu *Laminaria japonica* var *ochotensis*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 141-145.
- Ahn SJ, Kim YS, Park KP. 2004. Storage of waste-brown seaweed and degradation of alginate using microorganism. *J Environm Sci* 13: 313-318.
- Cho M, Kim BY, Rhim JH. 2003. Degradation of alginate solution and power by γ -irradiation. *Food Engineering Progress* 7: 141-145.
- Kashiwabara Y, Hiroshi S, Nisizawa K. 1969. Alginate lyases of *Pseudomonas* sp. *J Biochem* 66: 503-512.
- Alonso S, Setser C. 1994. Functional replacements for sugars in foods. *Trends Food Sci Technol* 5: 139-146.
- Hidaka H, Hara T, Eida T, Okada A, Shimada K, Mitsuoka T. 1984. Effect of fructooligosaccharides on human intestinal flora. In *Intestinal Microflora and Dietary Factors*. Center for Academic Publications, Tokyo. p 39-64.
- Miyake O, Hashimoto W, Murata K. 2003. An exotype alginate lyase in *Sphingomonas* sp. A1: overexpression in *Escherichia Coli*, purification and characterization of alginate lyase. *Protein Expression Purification* 27: 33-41.
- Jung JY, Hur SS, Choi YH. 1999. Studies on the efficient extraction process of alginic acid in sea tangle. *Food Engineering Progress* 3: 90-97.
- Güven KC, Özsoy Y, Ulutin ON. 1991. Anticoagulant, fibrinolytic and anti aggregant activity of carrageenans and alginic acid. *Botanica Marina* 34: 429-435.
- Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Kim HK, Lee EH. 1996. Preparation of oligosaccharides from alginic acid enzymic hydrolysis. *Korean J Food Sci Technol* 28: 146-151.

23. Sutherland IW. 1995. Polysaccharide lyases. *FEMS Microbiol Rev* 16: 323-347.
24. Wong TY, Proston LA, Schiller NL. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu Rev Microbiol* 54: 289-340.
25. Eller J, Payne WJ. 1960. Studies on bacterial utilization of uronic acid. IV. Alginolytic and mannuronic acid oxidizing isolates. *J Bacteriology* 80: 193-199.
26. Davidson IW, Sutherland IW, Lawson CJ. 1976. Purification and properties of an alginate lyase from marine bacterium. *Biochem J* 159: 707-713.
27. Kim HS, Bae TJ. 2002. Studies on the hydrolysis of seaweed using microorganisms and its application. I. Screening of microfloras involved in hydrolysis of sea tangle (*Laminaria japonica*) and mustard (*Undaria pinnatifida*). *J Korean Fish Soc* 35: 438-444.
28. Kim HS, Choi OS, Kang DS, Park UM, Baek SH, Bae TJ. 2003. Isolation of seaweed hydrolytic strains from microfloras in rice field ditch water. *J Korean Fish Soc* 36: 536-567.
29. Joo DS, Cho SY, Lee EH. 1993. Isolation of alginate-degrading bacteria and production of alginate-degrading activities by bacteria. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 21: 207-213.
30. Joo DS, Lee JS, Park JJ, Cho SY, Ahn CB, Lee EH. 1995. Purification and characterization of the intracellular alginate lyase from *Vibrio* sp. AL-145. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 432-438.
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
32. Somogyi M, Nelsoln N. 1952. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195: 19-23.
33. Davis BJ. 1964. Disc-electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann New York Acad Sci* 121: 404-427.
34. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the bacteriophage T. *Nature* 227: 680-686.
35. Tseng CH, Yamaguchi K, Kitamikado M. 1992. Two types of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-9. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 743-749.
36. Muranmatsu T, Hirose S, Katayose M. 1977. Isolation and properties of alginate lyase from the mid-gut gland of wreath shell *Turbo cornutus*. *Agric Biol Chem* 41: 1939-1946.
37. Tseng CH, Yamaguchi K, Kitamikado M. 1992. Two types of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-9. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 743-749.
38. Tseng CH, Yamaguchi K, Kitamikado M. 1992. Isolation and some properties of alginate lyase from a marine bacterium *Vibrio* sp. AL-128. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 533-538.
39. Yonemoto Y, Mutata K, Kimura A, Yamaguchi K, Okayama K. 1991. Bacterial alginate lyase: characterization of alginate lyase producing bacteria and purification of the enzyme. *J Ferment Bioeng* 72: 152-157.
40. Baxter RM. 1959. An interpretation of the effect of salts on the lactic dehydrogenase of *Halobacterium salinarium*. *Can J Microbiol* 5: 47-57.
41. Min KH, Sasaki SF, Kashiwabara Y, Suzuki H, Nisizawa K. 1977. Multiple components of endo-polyguluronide lyase of *Pseudomonas* sp. *J Biochem* 81: 539-546.

(2005년 12월 13일 접수; 2006년 2월 4일 채택)